

Physik Department



**Kinetik des ATPase-Zyklus von Hsp90
in Einzelmolekülexperimenten**

**Dissertation
von**

Moritz Mickler



Technische Universität München

Technische Universität München
Lehrstuhl für Biophysik E22, Physik Department

Kinetik des ATPase-Zyklus von Hsp90
in Einzelmolekülexperimenten

Moritz Mickler

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. Ralf Metzler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Thorsten Hugel
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 21.10.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 18.11.2008 angenommen.

**Kinetik des ATPase-Zyklus
von Hsp90
in Einzelmolekülexperimenten**

Dissertation am Physik Department
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Moritz Mickler
aus Göttingen

München, den 21. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1 Das Hitzeschockprotein Hsp90	5
1.1 Hitzeschockproteine - Molekulare Chaperone	5
1.2 Hsp90	5
1.3 Kristallstruktur von Hsp90	6
1.4 ATPase-Aktivität	7
1.5 Rolle von Hsp90 in der Tumorentstehung	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Molekularbiologische Methoden	9
2.2 Immobilisierung der Proteine	10
2.2.1 Aminoterninale Biotinylierung	10
2.2.2 Streptag-Antikörper	10
2.2.3 Vesikel	11
2.3 Einzelmolekülmessungen	12
2.3.1 Anregungsstrahlengang	12
2.3.2 Detektionsstrahlengang	13
2.3.3 Epifluoreszenzstrahlengang	14
2.3.4 Zeitliche Auflösungsbegrenzung der smFRET-Messung	14
2.3.5 Auflösungsvermögen in z-Richtung	15
2.3.6 Kontrolle der Temperatur	15
2.3.7 Durchführung der Einzelmolekülmessungen	16
2.3.8 Auswertung	17
2.3.9 Qualität der Einzelmolekülkurven	17
2.3.10 Bestimmung des γ -Faktors	18
2.4 Monte-Carlo Simulation	20
3 Theorie	21
3.1 Totalreflexion	21
3.2 Zwischenmolekularer Energietransfer	23
3.3 Kinetik	25

4	Konformationsänderungen von einzelnen Hsp90-Molekülen	29
4.1	Einzelmolekül-FRET-Kurven	30
4.1.1	FRET zwischen N- und M-Domäne	30
4.1.2	FRET zwischen den N-Domänen	32
4.1.3	Intramonomer-FRET zwischen N- und M-Domäne	33
4.1.4	Anisotropien der Fluorophore	35
4.2	Abschätzung der Distanzen	36
4.2.1	Distanzen zwischen N- und M-Domäne	36
4.2.2	Distanzen zwischen den N-Domänen	38
4.3	Rekonstruktion der Konformationen	38
4.3.1	Positionen der N-Domäne relativ zur M-Domäne	38
4.3.2	Positionen der N-Domänen relativ zueinander	41
4.4	Zusammenfassung	41
5	Kinetik des Hsp90-Zyklus aus den smFRET-Kurven	43
5.1	Kinetik der einzelnen Hsp90-Moleküle	43
5.2	Verteilung der Verweildauern	44
5.3	Monte-Carlo-Simulation	45
5.3.1	SmFRET-Kurven aus der Monte-Carlo-Simulation	46
5.3.2	ATPase-Raten in den Monte-Carlo-Simulationen	47
5.4	Verweildauerverteilungen	48
5.5	Population der Zustände im Zyklus	50
5.6	Autokorrelation der Kurven	51
5.7	Kinetik der N-Domänen	52
5.8	Messung in Anwesenheit von ADP	52
5.9	Messungen mit AMP-PNP	53
5.10	Messung ohne Coiled-Coil in Vesikeln	54
5.11	Der chemomechanische Zyklus von Hsp90	54
5.12	Energielandschaft des ATPase-Zyklus	56
5.13	Zusammenfassung	57
6	Dimerisierung von Hsp90	59
6.1	Erkenntnisse aus Ensemblemessungen	59
6.2	SmFRET-Messungen zur Dimerisierung	60
6.3	Kinetik der Dissoziation	61
6.4	Zusammenfassung	63
7	Ausblick	65
7.1	Drehung der Domänen	65
7.2	Abbildung der Konformation	65
7.3	Co-Chaperone	66
7.4	Klientenproteine	66
7.4.1	Der Steroidhormonrezeptor	66

7.4.2	Der Tumorsupressor p53	66
A	Biochemische Methoden	67
A.1	Das Spektrofluorimeter	67
A.2	Test zur Messung der ATPase-Aktivität der Hsp90-Moleküle	68
A.2.1	Material zur Durchführung des ATPase-Tests	69
A.3	Fluoreszenzmarkierung der Cysteingruppen	70
A.4	Konzentrationsbestimmung	70
A.5	Untergruppenaustausch der Hsp90 Dimere	71
A.6	Einfluss der Nukleotide auf die Fluoreszenzspektren	72
B	Herstellung der Flusskammern	75
B.1	Reinigung der Objektträger	75
B.2	Silanisierung der Objektträger	76
B.3	PEG-Funktionalisierung	76
B.4	Zusammenbau der Flusskammer	76
C	Analytische Lösung des Vier-Zustands-Modells	79
C.1	Lösung für den offenen Zustand	79
C.2	Bestimmung der Konstanten	80
C.3	Allgemeine Lösung der Differentialgleichungen	82
	Danksagung	95

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kristallstrukturen von Hsp90 im geschlossenen/offenen Zustand	6
1.2	Postulierter mechano-chemischer ATPase-Zyklus des Hsp90	8
2.1	Vesikel mit Hsp90 auf PEG-Oberfläche	11
2.2	Schema des Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskops	13
2.3	Fokusabhängigkeit des Signals	15
2.4	Versatz von Donor- und Akzeptorkanal	18
2.5	Alternierende Anregungsmessung	19
2.6	Bestimmung des γ -Faktors	19
3.1	Reflexion eines Strahles - Snellius Brechungsgesetz	22
3.2	Theoretische FRET-Effizienz	24
3.3	Theoretische Energielandschaft des Zwei-Zustands-Modell	27
4.1	SmFRET-kurve der N-Domäne relativ zur Interdimer M-Domäne	31
4.2	Histogramm des Interdimer-FRET der N-M-Domänen	31
4.3	SmFRET-Kurve bei höchster Zeitauflösung	32
4.4	smFRET-Kurve der N-Domänen relativ zueinander	33
4.5	FRET-Histogramm der beiden N-Domänen	33
4.6	Einzelmolekül-Kurve der Intradimer markierten N-M-Domänen	34
4.7	FRET-Histogramm N-M-Intradimer	35
4.8	Abstand von Aminosäuren 61 und 385 in Kristallstruktur	37
4.9	Vergleich der offenen und geschlossenen Kristallstruktur	39
4.10	Restriktion der Bewegung der N-Domäne (N-M)	40
4.11	Restriktion der Bewegung der N-Domäne (N-N)	42
5.1	Schwellenwertkriterium an einer FRET-Kurve	44
5.2	Fit der Verweildauerverteilung	45
5.3	Monte-Carlo-Simulierte Kurve.	46
5.4	Chemo-mechanischer ATPase-Zyklus von Hsp90.	47
5.5	Güte der Monte-Carlo-Simulation.	48
5.6	Integrale Verweildauerverteilung verschiedener Nukleotidbedingungen	49
5.7	Ratenkonstanten mit Fehler	50
5.8	Population der Zustände in der MC-Simulation	51

5.9	FFT der Autokorrelation der smFRET-Kurven	52
5.10	Verweildauerverteilungen der Bewegung der N-Domänen	53
5.11	Verweildauerverteilungen in Anwesenheit von ADP	53
5.12	Kontrollmessung mit AMP-PNP	54
5.13	SmFRET-Kurve der Hsp90 Mutante ohne Coiled-Coil	55
5.14	Verweildauerverteilung von Hsp90 ohne Coiled-Coil	55
5.15	Energielandschaft des ATPase-Zyklus von Hsp90	57
6.1	Schema Dissoziationsexperimente	61
6.2	SmFRET-Kurve der Dissoziation/Assoziation	61
6.3	Histogramm der FRET-Effizienzen des an der C-Domäne markierten Hsp90.	62
6.4	Verweildauer-Histogramm Dissoziation/Assoziation	63
A.1	Schematische Darstellung des Spektrofluorimeters	68
A.2	Kinetik des Untergruppenaustausch	72
A.3	Fluoreszenzspektren bei unterschiedlichen Nukleotidbedingungen	73

Tabellenverzeichnis

4.1	Anisotropien der verschiedenen fluoreszenzmarkierten Mutanten	36
4.2	Abstände aus der Kristallstruktur und den FRET-Effizienzen.	42
5.1	Vergleich ATPase-Raten Experiment/Simulation	49
5.2	Vergleich der Ratenkonstanten des Hsp90-Zyklus.	50
A.1	Teilreaktionen des ATPase-Tests	69
A.2	Spektrale Eigenschaften der Fluorophore.	71
A.3	Absorptionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm	71

Zusammenfassung

Die mechanische Bewegung molekularer Maschinen spielt eine zentrale Rolle bei unzähligen Prozessen in der Zelle. Das Hitzeschockprotein Hsp90 ist eine solche molekulare Maschine, die angetrieben von ATP viele Signalübertragungsproteine stabilisiert und aktiviert. Wirkstoffe, die spezifisch die ATPase-Aktivität von Hsp90 inhibieren, wurden in klinischen Studien als potente Anti-Tumor-Medikamente identifiziert. Dieses deutet auf eine Schlüsselrolle von Hsp90 in der Tumor-Entstehung hin. Unter physiologischen Bedingungen bildet Hsp90 Dimere, die während der ATPase-Aktivität große Konformationsänderungen erfahren.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Konformationsänderungen an einzelnen Hsp90-Dimeren während ihres ATPase-Zyklus mithilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zu vermessen. Dazu wurde ein Prisma-Basiertes Totale-Interne-Reflexions-Mikroskop konstruiert und charakterisiert. Mit molekularbiologischen Methoden wurden Hsp90-Chimären angefertigt, die an spezifischen Aminosäuren fluoreszenzmarkiert werden konnten und aufgrund eines angefügten Coiled-Coil-Motivs unter den Messbedingungen dimerisiert blieben. Die unter verschiedenen Nukleotidbedingungen durchgeführten Einzelmolekül-FRET-Messungen zeigten einen deutlichen Übergang zwischen offenen und geschlossenen Zuständen des Hsp90-Dimers. Unerwarteterweise konnten auch ohne ATP Konformationsänderungen beobachtet werden, die jedoch eine langsamere Kinetik aufwiesen. Zur quantitativen Bestimmung der Raten wurden die Experimente in Monte-Carlo-Simulation nachgestellt. Aus der Simulation resultierte ein minimaler chemo-mechanischer ATPase-Zyklus mit zwei geöffneten und zwei geschlossenen Konformationen. Die Ratenkonstanten der Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen unter verschiedenen Nukleotidbedingungen zeigten, dass die großen Konformationsänderungen von Hsp90 nur schwach an seine ATP-Hydrolyse gekoppelt sind, und vor allem die Übergänge zwischen den beiden offenen und den beiden geschlossenen Zuständen beeinflusst werden. Aus den Distanzen der Fluorophore, die sich aus den FRET-Effizienzen ergaben, konnte mithilfe der Kristallstruktur die bisher unbekannte Bewegung der N-terminalen Domäne von Hsp90 während des ATPase-Zyklus eingegrenzt werden. Durch den Einschluss von Hsp90-Molekülen ohne Coiled-Coil-Motiv in Vesikel konnte deren Dimerisierungs-Kinetik isoliert beobachtet werden. Es zeigte sich, dass ATP- γ -S die Dimerisierung stark erhöht.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten System ist der Weg zur Untersuchung des weitgehend unbekanntem Einfluss von Hsp90 auf seine Klientenproteine in Einzelmolekül-Experimenten bereitet.

Kapitel 1

Das Hitzeschockprotein Hsp90

1.1 Hitzeschockproteine - Molekulare Chaperone

Werden Zellen Umwelteinflüssen ausgesetzt, die zu einer Schädigung ihrer Proteine führen können, so produzieren sie so genannte „Hitzeschockproteine“ (Hsp) oder auch Stressproteine. Diese fungieren als Molekulare Chaperone¹, welche unerwünschte Denaturierung und Aggregation von Proteinen verhindern. Ihre erhöhte Expression unter verschiedenen Stressfaktoren (Hitze, Schwermetalle, Azidose, Hypoxie) ist eine adaptive Antwort der Zelle, die damit ihre Überlebenschance erhöht.[1] Diese Funktionen werden auch in Tumoren benötigt, wo die Zelle in einem feindlichen Umfeld versucht, ihre physiologischen Funktionen aufrecht zu erhalten. Eine Folge der Stabilisierung von Proteinen durch Hsp ist jedoch auch, dass Signalproteine (wie z.B. p53), welche auf Grund einer Mutation normalerweise nicht mehr stabil wären, stabilisiert werden und diese eine fehlerhafte Funktion ausführen. Dieses kann zum Beispiel dazu führen, dass der normal auftretende programmierte Zelltod fehlerhafter Zellen, auch Apoptose genannt, unterbunden wird und diese unkontrolliert wachsen.[2]

1.2 Hsp90

Eines dieser Hitzeschockproteine ist Hsp90 (Hitzeschockprotein mit der Masse 90 kDa), das in allen Zweigen von Eukaryoten und in Bakterien nachgewiesen wurde und hoch konserviert ist.[3] Die Primärsequenz der Hefevariante ist zu 60% identisch mit der humanen. Diese ist wiederum zu 34% mit der bakteriellen identisch. Hsp90 macht mehr als ein Prozent der Gesamtmasse der löslichen Proteine in der Zelle aus. Dieser Anteil kann sich im Falle einer Stresssituation für die Zelle noch stark erhöhen.

¹Von dem Französischen Wort für Haube, welche die Anstandsdamen im England des 19.Jhs zu tragen pflegten, leitet sich der Begriff ab.

1.3 Kristallstruktur von Hsp90

Das Hsp90 Molekül besteht aus drei Untereinheiten: Der N-terminalen Domäne, der Mitteldomäne und der C-terminalen Domäne, die im Folgenden mit N-, M- und C-Domäne abgekürzt werden. Es bildet unter physiologischen Bedingungen Dimere, die an den C-Domänen verbunden sind. Im Laufe seines ATPase-Zyklus bildet es einen geschlossenen Zustand aus, bei dem die N-Domänen wechselwirken. Diese Konformation wird imitiert durch die Bindung des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogs (Adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate, AMP-PNP). Sie liegt als Kristallstruktur vor und ist in Abb.1.1 dargestellt.[4] Der C-Terminus des Hsp90 besteht aus den Aminosäuren MEEVD, die für die spezifische Interaktion mit den Tetratricopeptid Motiven (TPR), die viele Co-Chaperone und sogenannte Klientenproteine aufweisen, verantwortlich sind.[5][3]

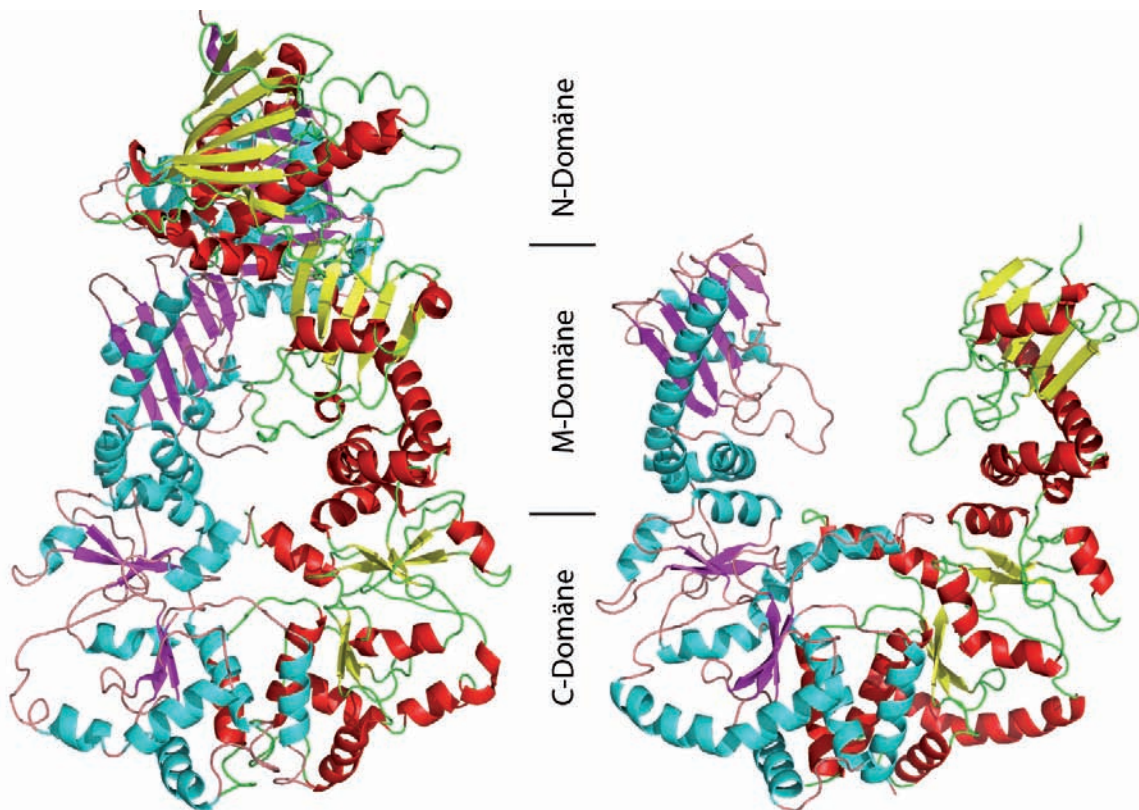


Abbildung 1.1: Kristallstruktur des Hsp90-Dimers im geschlossenem (2CG9, links) und im offenen Zustand (2CGE, rechts). Die Bereiche der drei Domänen sind eingegrenzt, wobei die N-Domäne in der offenen Struktur nicht aufgelöst ist. Die Sekundärstrukturmotive der beiden Monomere sind unterschiedlich farbkodiert.

1.4 ATPase-Aktivität

Hsp90 gehört zur GHKL-Familie der ATPasen, zu denen auch MutL, die DNA Gyrase und die Histidin-Kinase gehören. Diese Enzyme spielen physiologisch sehr unterschiedliche Rollen. So beseitigen die DNA Gyrase und MutL DNA-Fehlstellungen. Die Histidin-Kinase EnvZ phosphoryliert Proteine des His-Asp Signal-Übertragungspfad. [6] Die wesentlichen Gemeinsamkeiten der Mitglieder der GHKL-Familie sind struktureller Natur. So binden alle ATP in einer Form, in der das γ -Phosphat sehr stark angewinkelt ist. Diese ATP-Konformation wird auch *Bergerat-Konformation* genannt. [7]

Um seine native Funktion auszuüben, setzt Hsp90 ATP um. Das Hsp90 von *Saccharomyces cerevisiae* hat unter physiologischen Bedingungen eine Rate von $\approx 1/\text{min}$, was um einen Faktor hundert bis tausend langsamer ist als die ATPase-Rate anderer molekularer Motoren. [8] Bei Substratbindung erfahren andere Motoren eine Beschleunigung ihrer ATPase-Rate um zwei bis drei Größenordnungen. [9] Dieser Effekt konnte bei Hsp90 allein bei dem humanen Hsp90-Homolog beobachtet werden. [10] Zellen mit Mutanten von Hsp90, die nicht die Fähigkeit zur ATPase besitzen, sind nicht lebensfähig. [11]

Die ATP-Bindung findet an der N-Domäne statt, welche im Laufe des ATPase-Zyklus mit der N-Domäne des anderen Monomers dimerisiert. [4][12][13] Die ATP-Bindung hat einen K_M -Wert um $500 \mu\text{M}$. [10] Damit besitzt es im Vergleich zu ATPasen wie Myosin (10 pM) und Kinesin ($10 \mu\text{M}$) eine sehr geringe Affinität zu ATP. Neben den beiden in der Kristallstruktur abgebildeten Konformationen wurden zwei bis drei weitere Zustände postuliert (wie in Abb.1.2 dargestellt). [14][15][16][17] Jedoch basieren viele der vorgeschlagenen Konformationen auf Erkenntnissen aus Experimenten, die Hsp90 im Vakuum (Elektronenmikroskop, EM), an Luft (Raster-Kraft-Mikroskop, AFM) oder im Kristall abbilden. Es muss erst noch gezeigt werden, dass diese Konformationen auch unter physiologischen Bedingungen auftreten.

1.5 Rolle von Hsp90 in der Tumorentstehung

Die essentiellen Aufgaben, die Hsp90 in gesunden Zellen hat, werden für das Überleben von neoplastischen Zellen (potentiellen Tumorzellen) sogar noch wichtiger. Zu diesen Aufgaben zählt unter anderen die Stabilisierung bzw. Reifung verschiedener Klientenproteine, die in Zellwachstum und Differentiation involviert sind. [3] Unter ihnen sind viele onkogene Proteine wie z.B. CRAF, CDK4, AKT und ERBB2. [18] Sind diese Proteine in Tumorzellen so mutiert, dass sie ihre regulative Funktion verlieren, so kann es passieren, dass die Zelle zur Tumorzelle entartet. Die Stabilisierung mutierter Proteine trägt zusätzlich zur Entartung der Zellen bei. [2] Aus diesem Grund wird Hsp90 als Schlüsselprotein in dem Prozess der Veränderung von normalen Zellen zu sich unkontrolliert vermehrenden Zellen angesehen. [19]

Eines der prominentesten Klientenproteine von Hsp90 ist der Tumorsupressorfaktor p53. Dieser bildet Tetramere, welche an geschädigte DNA binden und bei irreparablen Zellschäden zur Apoptose der Zelle führen. [20] In der Hälfte aller Fälle von Krebs beim Menschen ist

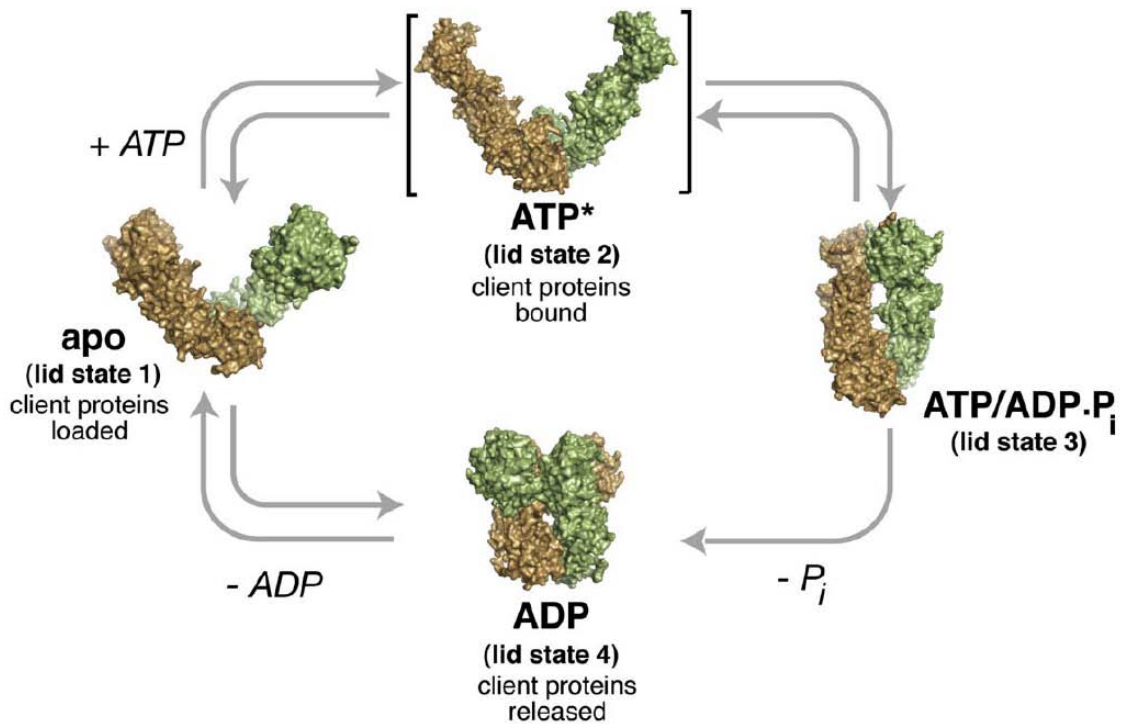


Abbildung 1.2: Postulierter mechano-chemischer ATPase-Zyklus des Hsp90. Es wurden vier unterscheidbare Zustände vorgeschlagen. Bei den Übergängen zwischen diesen finden große Konformationsänderungen statt. Adaptiert aus Ref.[15].

ein p53-Allel mutiert und das andere ist deletiert. Der spezifische Hsp90-Inhibitor Geldanamycin kann in diesen Zellen zur Hochregulation des wild-typ p53 und Herunterregulation von mutiertem p53 in den Zellen führen. Dies hat in *in vivo* Experimenten Apoptose der Tumorzellen zur Folge.[21] Es wurden viele weitere pharmakologisch aktive Stoffe gefunden, die Hsp90 inhibieren.[22] Diese bilden ein neue Klasse von Anti-Tumor-Medikamenten, die durch die spezifische Inhibition eines einzelnen Zielproteins viele der an der Entstehung von Tumoren beteiligten Stoffwechselwege blockieren können.[1] Die ersten klinischen Studien mit diesen Medikamenten zeigen, dass diese Art von Anti-Tumor-Medikamenten das Potential haben, die bestehenden Anti-Krebs-Therapien zu komplementieren.[23] Durch die zentrale Rolle, die Hsp90 in der Krebsentstehung spielt, sind neue Erkenntnisse über Hsp90, insbesondere über dessen ATPase-Funktion, besonders wertvoll.

Kapitel 2

Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Materialien und Methoden beschrieben, die im Verlauf der Arbeit zur Anwendung kamen. Dabei wird zuerst die Herstellung der Proteinkonstrukte beschrieben. Danach werden die verschiedenen Methoden dargelegt, mit denen die Proteine funktionalisiert und auf einer Oberfläche fixiert wurden. Die Beschreibung des zur Messung der einzelnen Proteine konstruierten TIRF-Mikroskops und die Auswertung der Daten bildet den Abschluss des Kapitels.

2.1 Molekularbiologische Methoden

Um den ATPase-Zyklus des Hsp90-Dimers untersuchen zu können, musste sichergestellt werden, dass das Molekül insbesondere bei den für Einzelmolekülmessungen nötigen Konzentrationen von ≈ 100 pM dimerisiert bleibt. Die Dissoziationskonstante beträgt jedoch ca. 60 nM und damit würde das Hsp90-Molekül in den Einzelmolekülmessungen zum größten Teil dissoziiert vorliegen.[13] Deshalb musste eine Möglichkeit gefunden werden, die Dissoziation zu verhindern. Das molekularbiologisch angefügte Coiled-Coil-Motiv des Kinesins von *Drosophila melanogaster* verbindet sich zu stabilen Helices und hält damit die beiden Monomere zusammen.[24][25][26] Bei Raumtemperatur durchgeführte Bestimmungen analog zu [13] zeigten, dass im messbaren Bereich bis \approx nM keine Dissoziation auftritt.[27] Die hierzu nötigen Arbeiten wurden zu einem großen Teil von Christoph Ratzke im Rahmen eines Praktikums durchgeführt.[28] Die so konstruierte Chimäre zeigte in Untergruppenaustausch-Experimenten die erhoffte Stabilität (s.AnhangA.5). Auch im Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskop konnten erstmals mehrere Offen-Geschlossen-Zyklen beobachtet werden.

Die Cystein-Mutanten D61C (mit und ohne Streptag), E333C und Q385C von Hsp90 ohne Coiled-Coil-Motiv wurden freundlicherweise von Martin Hessling vom Chemie-Department der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Die Mutanten S109C, D179C (mit Coiled-Coil-Motiv) und D560C (ohne Coiled-Coil-Motiv) wurden mit Hilfe des Quick-Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach dem zugehörigen Protokoll hergestellt. Die Primer für die Punktmutationen wurden mit Hilfe

des von Stratagene auf seiner Webseite bereitgestellten Skriptes erstellt und bei Metabion synthetisiert (Martinsried, Deutschland). Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte wie in [28] beschrieben.

2.2 Immobilisierung der Proteine

Um die einzelnen Hsp90-Moleküle während ihres gesamten ATPase-Zyklus beobachten zu können, mussten diese, wie in Anhang B beschrieben, an einer funktionalisierten Oberfläche fixiert werden. Dies geschah mit Hilfe der Biotin-Streptavidin-Bindung, bei der es sich um die stärkste bekannte nicht-kovalente chemische Bindung handelt. Sie hat sich in Einzelmolekülmessungen etabliert.[29][30][31] Es wurden drei unterschiedliche Ansätze verwendet, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2.1 Aminoternale Biotinylierung

Neben Cysteinen mit ihren Thiolgruppen besitzen Proteine weitere chemische Klassen von Aminosäureresten. An eine dieser Klassen, die Aminogruppen (Lysine, Arginine), lassen sich mithilfe von N-Hydroxy-Succinimidylestern (NHS-Ester) spezifisch andere Moleküle anbinden. Jedoch befinden sich im verwendeten Hsp90 Konstrukt 86 Lysine und 32 Arginine, eines davon (Arg380) wechselwirkt, wie in der Kristallstruktur ersichtlich, direkt mit dem ATP-Molekül.[32][4] Auch zeigte sich, dass mit einem Standard-Protokoll biotinyliertes Hsp90 keine ATPase-Aktivität mehr aufweist. Der N-Terminus eines Proteins ist ebenfalls eine Aminogruppe. In der Kristallstruktur des Hsp90-Moleküls scheint diese dem Lösungsmittel frei zugänglich zu sein. Um an den N-terminus spezifisch ein Biotin zu befestigen, wurden 20 μ M Hsp90 vor dem Funktionalisieren in einem ATPase-Puffer zehn Minuten mit 2 mM AMP-PNP inkubiert, um das Hsp90-Molekül im geschlossenen Zustand zu halten und somit das Arg380 zu schützen. Der Aminoterminus der ersten Aminosäure Methionin hat einen pKs-Wert von 9,21. Der pKs-Wert der Seitenkette von Lysin ist 10,53 und der von Arginin 12,48.[33] Der Puffer wurde auf pH 6,0 eingestellt, um sicherzustellen, dass vor allem der Aminoterminus des Proteins und weniger die Restgruppen der Arginine und Lysine deprotoniert und damit suszeptibel für das NHS-Biotin wird. Nun wurde äquimolar NHS-Biotin (Sigma, Taufkirchen) zugesetzt und für eine Stunde inkubiert. Ungebundenes Biotin wurde danach mit Hilfe einer G50-Microspin Säule (GE Healthcare, München) in einem EDTA-haltigen Puffer, um das AMP-PNP aus der Bindungstasche herauszulösen, abgetrennt. Das biotinylierte Konstrukt wurde auf ATPase-Aktivität untersucht (s.Abschnitt A.2), welche im Rahmen der Messgenauigkeit der des nicht markierten Proteins entsprach.

2.2.2 Streptag-Antikörper

An das Hsp90-Konstrukt wurde von Martin Hessling vom Chemie-Department mit Hilfe molekularbiologischer Methoden C-terminal ein Streptag (Iba GmbH, Göttingen) an-

gefügt. Dieser bindet an Streptavidin, jedoch nicht mit einer Affinität, die zu Zwecken der Einzelmolekül-Immobilisierung nötig wäre.[34][35] Der Antikörper StrepMab-Immo (Iba GmbH, Göttingen) bindet laut Herstellerangaben mit einer Dissoziationskonstanten von $\approx 10^{-13} M$ an den Streptag. Damit ist er theoretisch in der Lage die Proteine bei den für Einzelmolekülmessungen erforderlichen Konzentrationen zu binden. Die Antikörper wurden mit Hilfe von N-Hydroxy-Succinimidylestern (NHS-Ester) in einem PBS-Puffer bei pH 8,3 unspezifisch an den Aminogruppen der Lysine und Arginine biotinyliert und auf die mit Streptavidin funktionalisierte Oberfläche aufgebracht. Jedoch variierte die Anbindung von fluoreszenzmarkierten Hsp90-Proteinen an die Antikörper in verschiedenen Experimenten stark.[35] Aus diesem Grund kamen andere Ansätze zur Anwendung.

2.2.3 Vesikel

Ein Teil der Messungen erfolgte in eigens dafür erzeugten Lipid-Vesikeln (s.Abb.2.1). Es wurde gezeigt, dass diese sehr gut als Container für Moleküle in Einzelmolekül-Experimenten mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (smFRET) geeignet sind.[36] Werden die Messungen bei der Schmelztemperatur der Lipide durchgeführt, so bilden sich Störstellen in der Membran und sie wird durchlässig für kleine Moleküle (ATP, ADP, ATP- γ -S), bleibt aber undurchlässig für Proteine oder DNA.

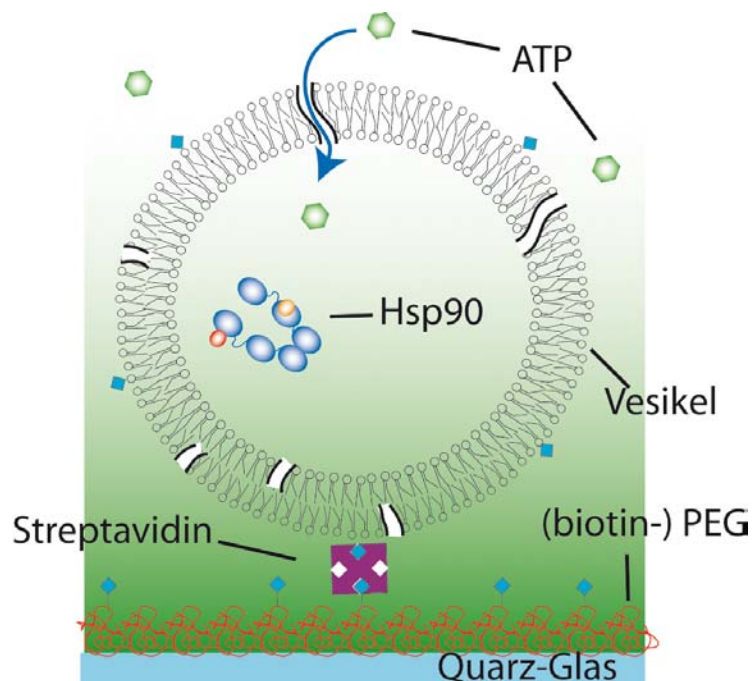


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der an der PEG-Oberfläche angebrachten Vesikel-Behälter. Durch Störstellen in den Vesikeln können kleine Moleküle wie ATP dringen, große werden jedoch zurückgehalten.

In dieser Arbeit wurde das Lipid 1,2-Dipentadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine mit ei-

nem Molprozent 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Cap Biotinyl)(beide von Avanti Lipids, Alabasta, AL, USA) gemischt und mit den, wie in Abschnitt A.5 beschrieben, erzeugten Heterodimeren zu einer ca. 100 nM Protein-Konzentration gemischt. Dabei entspricht ein Vesikel mit 200 nm Durchmesser einem Volumen von $\approx 4,2 \times 10^{-18}$ l. Ein Teilchen in diesem Volumen entspricht also einer Konzentration von 400 nM. Die Lipidmischung wurde bei 37°C (und somit über der Schmelztemperatur von 33°C) für eine halbe Stunde hydratisiert. Um die Effizienz des Einschlusses zu erhöhen, folgten 3-5 Gefrier-Auftau-Zyklen durch wechselseitiges Überführung von flüssigem Stickstoff in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad (dieser Schritt ist nicht zwingend nötig). Nun wurde die Lösung mit Hilfe eines vorgewärmten Mini-Extruders (Avanti Lipids, Alabasta, AL, USA) 20 mal durch eine 200 nm Polycarbonat-Membran (Whatman, Newton, MA, USA) gepresst, was zu einer gut monodispersen Lösung von Vesikeln führte.[37][38]

2.3 Einzelmolekülmessungen

Ein wesentlicher Teil dieser Doktorarbeit bestand im Aufbau eines Einzelmolekül-Totale-Interne-Reflektions-Fluoreszenz-Mikroskops mit Anregung durch ein Prisma (Prism-Type TIRFM). Dieses trennt den Anregungsstrahlengang komplett vom Detektionsstrahlengang. Aus diesem Grund hat es ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis als die ebenfalls mögliche und übliche TIR-Anregung über ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur, was insbesondere bei Einzelmolekül-Fluoreszenz-Experimenten wünschenswert ist.[39][40] Als Basis des Aufbaus, der schematisch in Abb.2.2 abgebildet ist, dient ein schwingungsgedämpfter Tisch (Stabilizer I-2000 series, Newport, Irvine, USA). Sämtliche optischen und optomechanischen Komponenten stammten, wenn nicht anders vermerkt, von Thorlabs (Karlsfeld, Deutschland). Das Objektiv war feinfokussierbar mit einem Piezoverstellelement (PiezoJena, Jena). Der Laser wurde verschlossen mit einem Shutter, der über einen elektromechanischen Aktuator ausgelöst wurde (Thorlabs, Karlsfeld). Dieser ließ sich über das TTL-Signal, welches die EMCCD-Kamera aussandte, auslösen. Die Messkammer war auf einem x-y-Verschiebetisch (Newport, Irvine, CA, USA) montiert und konnte in der Fokusebene verfahren werden. Um den Winkel der Totalreflexion möglichst konstant zu halten, wurde dabei vor allem parallel zu der Oberfläche des Prismas, durch die der Laserstrahl trat, verfahren. Dies geschah mit Hilfe einer piezoangetriebenen Mikrometerschraube (NanoPZ Ultra-High Resolution Actuator, Newport, Irvine, CA, USA).

2.3.1 Anregungsstrahlengang

Als Lichtquelle dienten ein diodengepumpter Festkörperlaser (DPSSL) mit einer Wellenlänge von 473 nm (Roithner, Wien, Österreich), ein frequenzverdoppelter NdYAG-Laser der Wellenlänge 532 nm (Compass 215M Coherent Inc., Santa Clara CA, USA) und ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm (Lasiris, Stocker Yale, Quebec, Kanada). Jeweils zwei dieser Laser ließen sich parallel zur Anregung verwenden, indem sie durch einen geeigneten dichroischen Spiegel (AHF Analysetechnik AG, Tübingen) auf einen

Strahlengang aliniert wurden. Dieser wurde nun mit einer Linse ($f=75$ mm) auf die Oberfläche der Messkammer fokussiert, um eine höhere Leistungsdichte zu erreichen. Um starke Brechung an der Luft-Quarz-Grenzfläche, die die Einstellung erschweren würde, zu vermeiden, koppelt der Strahl in die Messkammer über ein Prisma ein. Das Prisma wurde in der Kristallwerkstatt des Physik-Departments aus einem Suprasil-Rohling (Vogelsberger Quarzglasstechnik, Sonnen) mit einem Winkel von 66° geschliffen, der genau dem Winkel der Totalreflexion an der Quarz-Wasser-Grenzfläche entspricht (s. Abschnitt 3.3). Erst das bei der Totalreflexion erzeugte evaneszente Feld ermöglicht die Anregung einzelner, an der Oberfläche fixierter Fluorophore bei gleichzeitiger Minimierung des Hintergrundsignals (das z.B. durch Ramanstreuung bei 550 nm und 610 nm entsteht, für eine ausführliche Diskussion siehe [41]).

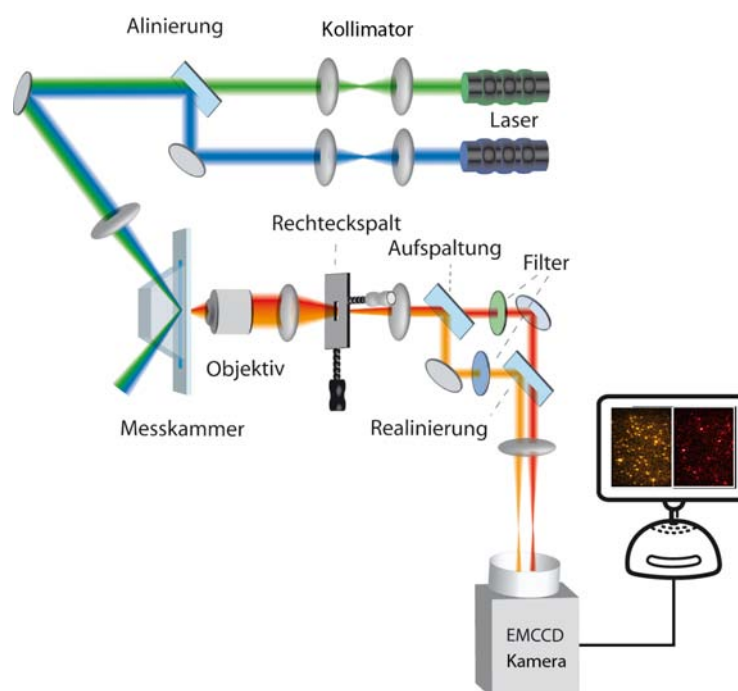


Abbildung 2.2: Schematische Abbildung des Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskops. Die Anregung erfolgte mit einem blauen/grünen Laser. Das Fluoreszenzlicht wurde in den orangenen Donorkanal und den roten Akzeptorkanal spektral und räumlich getrennt. Das Bild wurde mit einer computergesteuerten EMCCD-Kamera detektiert.

2.3.2 Detektionsstrahlengang

Die Vergrößerung des beleuchteten Bereiches erfolgte über ein Wasser-Immersions-Objektiv (60x, N.A. 1,2 CFI Plan Achromat, Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, Niederlande). Um den Einfall von Streulicht zu minimieren, verlief der Detektionsstrahlengang (in Abb.2.2 rot/orange dargestellt) innerhalb einer Kiste aus schwarzem Karton (Thorlabs, Karlfeld). Im Abstand von ca. 30 cm hinter dem Objektiv stand eine Linse ($f=5$ cm,

achromat) gefolgt von einem in Höhe und Breite verstellbaren Spalt (angefertigt von der Werkstatt des Medizintechniklehrstuhles). Hinter dem Spalt folgte im Abstand von fünf cm eine weitere Linse ($f=5$ cm). Diese Kombination von zwei Linsen diente dem Zweck, die Strahlen, die von Punkten der Fokusebene des Objektivs ausgingen und abseits der optischen Achse lagen, nicht zu stark divergieren zu lassen. Der Spalt schnitt aus dem runden Strahlprofil einen rechteckigen Bereich heraus und ermöglichte so die bestmögliche Ausnutzung des rechteckigen Detektorchips der Kamera.

Nun wurde der Strahl durch einen Dichroischen Spiegel (AHF Analysentechnik AG, Tübingen) spektral bei 640 nm in den Donor- und den Akzeptorkanal aufgetrennt. Aus beiden Kanälen wurde mit Hilfe zweier Filter (582/75 und 700/75, extra geblockt bei 532 nm, beide von AHF) jeweils ein spektrales Fenster ausgeschnitten. Beide Kanäle wurden nun mit einem weiteren dichroischen Spiegel wieder aliniert und durch eine 2 Zoll Linse ($f=20$ cm) auf den Chip der EMCCD-Kamera (Andor IXon DV887, Andor, Belfast, Nord Irland) fokussiert. Um das thermische Rauschen des EMCCD-Chips der Kamera minimal zu halten, wurde dieser, unterstützt von einer Wasserkühlung, bei einer Temperatur von -100°C betrieben. Der EM-Gain war auf 3450 eingestellt und die Pixel wurden auf 2×2 gebinnt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Experimente mit 100 ms Belichtungszeit durchgeführt.

2.3.3 Epifluoreszenzstrahlengang

Die Fokussierung der sehr sauberen Oberfläche war ausgesprochen schwierig, da von dieser im Idealfall kein Fluoreszenzsignal ausging. Zusätzlich erschwerend kam hinzu, dass die Beleuchtungstiefe des evaneszenten Feldes nur ca. 100 nm betrug (s. Abschnitt 3.1), die Fokussierungsschritte der Mikrometerschraube jedoch eher im Bereich von $10 \mu\text{m}$ lag. Aus diesem Grund wurde mit einem 50:50 Strahlteiler der Anregungsstrahl in den Detektionsstrahlengang eingekoppelt, und während des Fokussierens der Rückreflex von der Flusskammer beobachtet. Beim Annähern des Objektivs an die Flusskammer erschienen nacheinander die Unterseite des Deckglases, seine Oberseite und die Unterseite des Objektträgers als scharf fokussierte Punkte. Vom letzten Punkt aus waren es noch ca. $20 \mu\text{m}$, welche sich mit dem Piezoverstellelement überwinden ließen.

2.3.4 Zeitliche Auflösungsbegrenzung der smFRET-Messung

Die Messung des FRET zwischen einzelnen Fluorophoren ist im wesentlichen begrenzt durch ihre photophysikalischen Eigenschaften. Im Allgemeinen emittieren Fluorophore nicht mehr als ca. eine Million Photonen (sehr gute Fluorophore wie der ATTO647N auch bis zu 2,5 Millionen [42]). Für eine FRET-Messung mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10/1 benötigt man etwa 100 Photonen. Also lassen sich ungefähr 10^4 unabhängige Messungen mit einem Fluorophorpaar machen. Die maximale zeitliche Auflösung wird begrenzt durch die Triplett-Lebensdauer und ist im sauerstoffarmen Puffer etwa 1 ms.[43]

2.3.5 Auflösungsvermögen in z-Richtung

Aufgrund der geringen Lichtintensität und Größe der einzelnen Fluorophore war es nötig, die funktionalisierte Oberfläche möglichst präzise zu fokussieren. In Abb.2.3 ist der Mittelwert von 350 Einzelmolekülkurven abgebildet, bei denen der Fokus in Ein- μm -Schritten um die Fokusebene verändert wurde. Man erkennt, dass schon Zwei μm von der Fokusebene entfernt die Intensität nur noch halb so groß wie in der Fokusebene ist. Da die Messungen in der Regel mit einem Signal-Rauschen-Verhältnis von 1:4 stattfanden, war es daher nicht möglich, mehr als einen μm von der Fokusebene entfernt zu messen. Dieses war besonders kritisch, da die Erwärmung des Aufbaus, z.B. im Vorfeld der Messung, zu Differenzen in der Ausdehnung der unterschiedlichen Materialien weit über diesen Bereich hinaus führte. Aus diesem Grund wurde die Temperaturkontrolle (s.Abschnitt 2.3.6) mindestens zwei Stunden vor Beginn der Messung eingeschaltet.

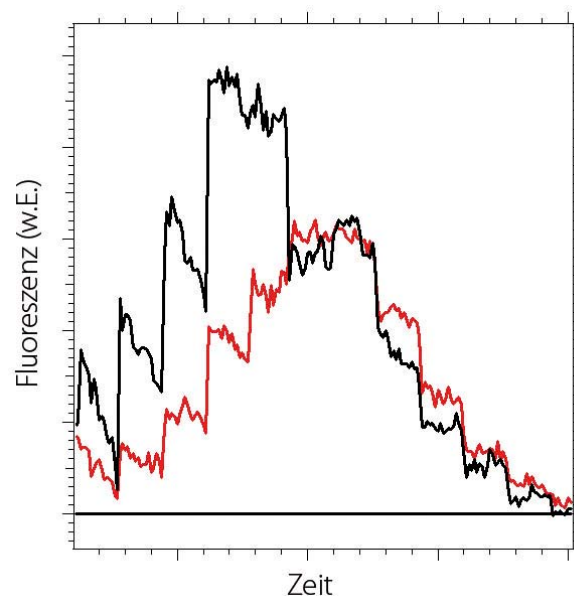


Abbildung 2.3: Mittelwert von 350 Fluorophoren, während der Fokus in Ein- μm -Schritten um die Fokusebene herum verändert wird. Deutlich zu erkennen sind die Sprünge in der Intensität der Fluorophore. Der Fokus des Donorkanals (schwarz) und des Akzeptorkanals (rot) sind um einen μm verschoben.

In der Verteilung 2.3 erkennt man ebenfalls den leichten Unterschied im Fokus zwischen dem Akzeptor- und dem Donor-Kanal. Das Objektiv alleine hat einen Unterschied von ca. zwei μm zwischen den Fokusebenen der beiden Kanäle.

2.3.6 Kontrolle der Temperatur

Auf Grund der ausgeprägten Abhängigkeit der ATPase-Rate von der Temperatur wurden die Messungen bei 30°C durchgeführt.[44] Dieses ist die Standardtemperatur von *Saccharomyces cerevisiae*. Als Heizelemente dienten Peltierelemente (QC-127-1.4-8.5MD, Conrad, Hirschau) wobei CPU-Lüfter (Thermaltake M3 TR2, Conrad, Hirschau) für Konvektion

sorgten. Betrieben wurden beide über ein Netzteil, das bis zu 16 A liefern konnte (Voltcraft EP-925, Conrad, Hirschau). Als Wärmereservoir für die von den Peltierelementen transportierte Wärme diente die Stahloberfläche des optischen Tisches. Ein Thermometer K101 mit einem Temperaturfühler (beide Conrad, Hirschau) an der Messkammer kontrollierte die Temperatur der Probe. Das System aus Messkammer, Objektiv und mechanischen Bauelementen benötigte mindestens zwei Stunden, um vollständig die gewünschte Temperatur einzustellen. Ein zu großer Temperaturgradient innerhalb der Kammer führte zu sich unterschiedlich ausdehnenden Bauelementen und somit zu einer Drift von Fokus und x-y-Position. Nach dem Einbau der Messkammer wurde mindestens eine halbe Stunde gewartet, um zu gewährleisten, dass das Mikroskop sich möglichst vollständig im thermischen Gleichgewicht befindet.

2.3.7 Durchführung der Einzelmolekülmessungen

Die Flusskammern (s. Anhang B) wurden in das Mikroskop eingebaut und die Probenlösung mit Hilfe einer Spritzenpumpe (PHD 22-2000, Harvard Instruments, Holliston, MA, USA) mit 2 ml/min durch die Kammer gepumpt. Zu Beginn der Messung wurde die Kammer mit einem ml des Messpuffers äquillibriert. Das Totvolumen der Messkammer betrug $\approx 100 \mu\text{l}$ ($50 \mu\text{l}$ vom Schlauch und $50 \mu\text{l}$ in der Kammer). Dann wurde die funktionalisierte Oberfläche fokussiert (s. Abschnitt 2.3.3). Manche Flusskammern hatten eine signifikante Hintergrundfluoreszenz, die innerhalb von wenigen Sekunden geblichen werden konnte. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis möglichst für die volle Lebensdauer der Fluorophore zu erreichen, wurde (bevor die fluoreszenzmarkierten Hsp90-Moleküle in die Kammer gebracht wurden) die Kammer langsam ($80 \mu\text{steps/s} \approx 2 \mu\text{m/s}$) durchgefahen und mit dem Laser geblichen.¹ Danach wurden $300 \mu\text{l}$ einer Streptavidin-Lösung (Iba GmbH, Göttingen) mit einer Konzentration von 2 mg/ml in die Kammer gespült und diese für fünf Minuten inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit einem ml Messpuffer aus der Kammer gespült, um sicherzugehen, dass sich kein ungebundenes Streptavidin mehr in der Kammer befindet. Die so präparierte Oberfläche ließ sich sehr gut auf ihre Spezifität testen, indem eine 100 pM Lösung Biotin-Rhodamin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vor und nach der Inkubation mit Streptavidin in die Kammer gegeben wurde. Vor der Inkubation mit Streptavidin sollte keine Anbindung erfolgen, wohin gegen die Oberfläche nach Inkubation mit Streptavidin dicht mit Rhodamin-Fluorophoren besetzt sein sollte. Auf die PEG-Streptavidin-Oberfläche wurde nun die Lösung mit den fluoreszenzmarkierten Proteinen gespült. Da die Anbindung der Proteine (s. Abschnitt 2.2) insbesondere über die Antikörper nicht bei jeder Probe gleich gut funktionierte, wurde zuerst eine relativ geringe Protein-Konzentration (10 pM) in die Kammer gespült. Diese wurde sukzessive verfünffacht bis ca. 100 Moleküle im beobachteten Bereich gebunden waren. Jedem Kanal standen bei 2x2 Binning 256x128 Pixel zur Verfügung, von denen auf Grund von optischer Verzerrung ca. 25.000 ein gutes Signal zu Rauschen aufwiesen. Bei einer Fluorophorgröße von ca. 5x5 Pixeln und einem ebensogroßen Abstand zwischen den einzelnen Fluorophoren

¹Dies geschah mit Hilfe der Tastaturmaus der Eingabehilfen von Microsoft Windows.

konnten somit ca. 100 Fluorophore gut getrennt voneinander beobachtet werden. Die nicht gebundenen Moleküle wurden mit einem halben ml Messpuffer wieder aus der Kammer gespült. Sollte in Anwesenheit von Nukleotiden gemessen werden, so wurde die entsprechende Lösung mit einer geringen Flussrate von $20 \mu\text{l/h}$ durch die Kammer gespült. Dieses geschah, um die Hsp90-Produkte von den Molekülen zu entfernen und so eine möglichst konstante Konzentration der Nukleotide zu erreichen.

2.3.8 Auswertung

Die Auswertung der von der EMCCD-Kamera aufgezeichneten Filme erfolgte mit Hilfe einer selbstgeschriebenen Auswertesoftware für IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA). Hierzu wurde der aufgenommene Film in das Programm eingelesen und in den Donor- und den Akzeptorkanal getrennt. Die Software mittelte die ersten zehn Bilder und bestimmte die hellsten Punkte des jeweiligen Kanals. Sie zeichnete den zeitlichen Verlauf der Signalintensität an diesen Punkten auf (Zeitlinie). Je nach Einstellung wurden die nächsten Nachbarpixel zum Signal hinzugerechnet. Diese Zeitlinien wurden nun mit den entsprechenden Zeitlinien des anderen Kanals verglichen. Aufgrund des besonderen Aufbaus des Mikroskops mit einer einzigen Linse (s.Abschnitt 2.3) gab es optische Verzerrungen zwischen den beiden Kanälen, die jedoch mit Hilfe eines zweidimensionalen Polynom-Fits herausgerechnet werden konnten. Hierzu wurden fluoreszierende Polystyrol-Kugeln (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), welche in beiden Kanälen zu erkennen waren, in die Flusskammer gegeben und die Position der Kugel in den beiden Kanälen verglichen. Die Differenzen in x- und y-Position (Δx und Δy) wurden mit der Formel:

$$\Delta x(x, y)/\Delta y(x, y) = K_0 + K_1 \cdot x + K_2 \cdot y + K_3 \cdot x^2 + K_4 \cdot xy + K_5 \cdot y^2 \quad (2.1)$$

gefittet. Die Fitparameter K_0 bis K_5 wurden nun von der Software verwendet um die Kanäle zu vergleichen. Ein Beispiel für einen solchen Fit von $\Delta x(x, y)$ und $\Delta y(x, y)$ ist in Abb.2.4 dargestellt. Man erkennt, dass die Verschiebung entlang der schmalen Seite des Chips (im Bild grün, etwas unterhalb der x-y-Ebene) deutlich geringer ist als senkrecht dazu (blaue und rote Bereiche deuten eine große Verschiebung an.) Um das Licht einzelner Fluorophore möglichst ohne Verluste auf dem EMCCD-Chip abbilden zu können, musste die Anordnung der optischen Elemente so justiert werden, dass sich eine möglichst geringe optische Verzerrung ergab.

2.3.9 Qualität der Einzelmolekülkurven

Die so aufgezeichneten Zeitlinien wurden durch den Experimentator gesichtet, und die als smFRET-Kurven erkenntlichen ausgewertet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Gesamtsignal von Donor- und Akzeptorkanal konstant blieb. Es ist bekannt, dass die Akzeptorfluorophore flimmern können, d.h. periodisch an- und ausgehen, und so auf starke Änderungen des Abstands schließen lassen, welche jedoch nicht auftreten. Um dieses auszuschließen, wurde der Donor mit dem 532 nm Laser und der Akzeptor mit dem 635 nm Laser

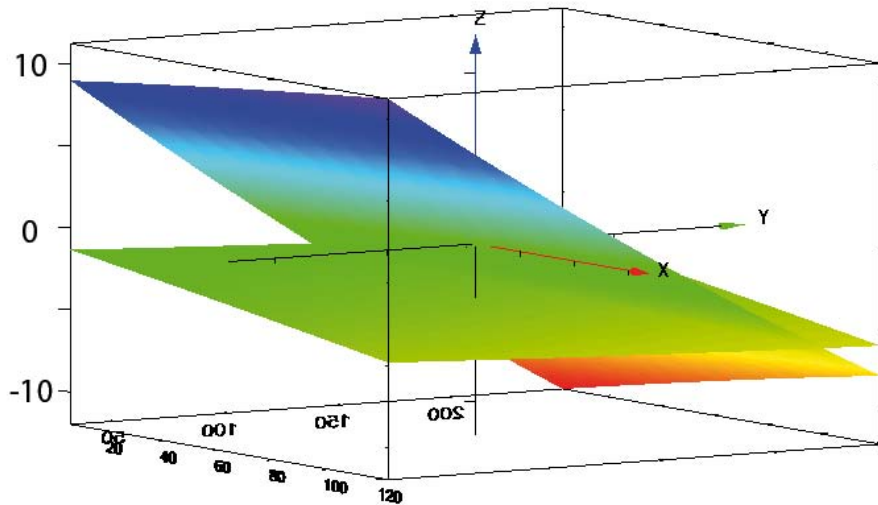


Abbildung 2.4: Versatz von Donor- und Akzeptorkanal entlang der kurzen (flache, grüne Ebene, Δx) bzw. langen Seite (Steile, rot, grün, blaue Ebene, Δy) des EMCCD-Chips in Abhängigkeit von der x-y-Position der Pixel.

alternierend angeregt (ALEX), und die entsprechende Fluoreszenz aufgezeichnet.[45][46] Eine typische, bei alternierender Anregung aufgenommene ALEX-Kurve ist in Abb.2.5 dargestellt. Man erkennt große Änderungen im Abstand und damit in der FRET-Effizienz bei gleichbleibender Fluoreszenz des Akzeptors. Ein Qualitätskriterium der smFRET-Kurven ist das stufenweise Bleichen. Wenn es sich um einzelne Moleküle handelt, so zeigen diese ein binäres Verhalten (fluoreszierend/nicht-fluoreszierend).[31] Aufgrund der Energieerhaltung muss die Summe aus Akzeptor und Donor konstant bleiben.

2.3.10 Bestimmung des γ -Faktors

Durch die unterschiedliche Empfindlichkeit des Mikroskops (als Konstrukt aus Objektiv, Filter, Linsen und EMCCD-Chip) für verschiedene Wellenlängen des Lichts und unterschiedlicher Quanteneffizienzen (s.Tabelle A.2) lässt sich die FRET-Effizienz nicht einfach nach Gleichung 3.12 berechnen. Man kann jedoch einen Korrekturfaktor γ einführen.[47][31] Er wird definiert als das Verhältnis aus Anstieg der Donor-Intensität und Abfall der Akzeptor-Intensität im Falle des Bleichens, also $\gamma = \Delta I_D / \Delta A$. Abb.2.6 zeigt eine Beispielkurve, bei der der Unterschied von ΔI_D und ΔA sehr gut zu erkennen ist. Aufgrund der Energieerhaltung müssen die mit γ korrigierten Kurven eine konstante Summe von Akzeptor- und Donorintensität aufweisen.

Der Gaussfit an die Verteilung des γ -Faktors ergibt einen Mittelwert von 0,395 mit einer Breite von 0,13 (N=47). Es liegt also eine relativ große Streuung von γ -Faktoren vor. Die korrigierte FRET-Effizienz errechnet sich nach $E = (1 + \gamma \cdot (I_D / I_A))^{-1}$. Im Folgenden wird

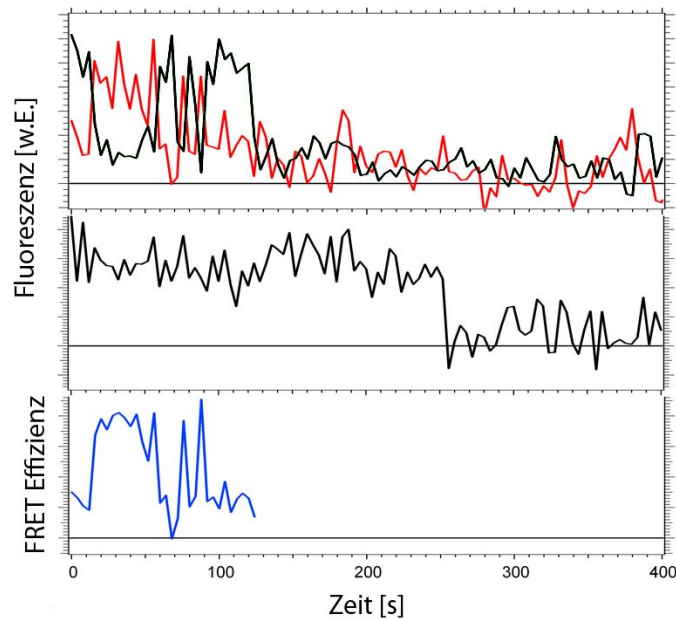


Abbildung 2.5: Darstellung von Kurven, die mit alternierender Anregung (ALEX) von Donor und Akzeptor aufgenommen wurden. Oben: Anregung des Donors und Beobachtung von Donor- (schwarz) und Akzeptor-Kanal (rot). Mitte: Bei Anregung des Akzeptors mit dem 635 nm Laser zeigt dessen Fluoreszenz einen konstanten Wert. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die großen Unterschiede in der FRET-Effizienz (unten) auf Akzeptorflimmern zurückzuführen ist.

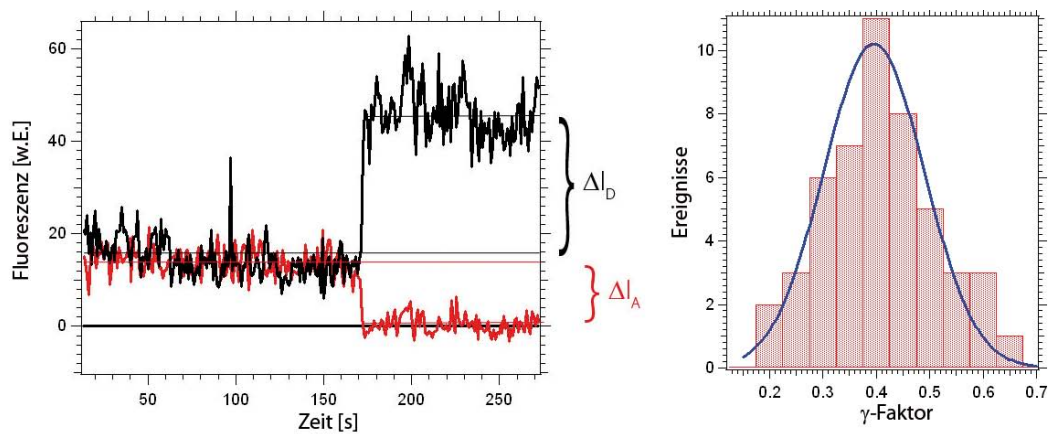


Abbildung 2.6: Bestimmung des γ -Faktors. Links: Typische unkorrigierte Einzelmolekül-Fluoreszenz-Kurve. Deutlich zu sehen ist der Unterschied in der Fluoreszenz-Intensität des Donors (Schwarz) und des Akzeptors (Rot). Rechts: Verteilung des γ -Faktors bei 47 smFRET-Kurven.

die mit dem Mittelwert der γ -Faktoren korrigierte FRET-Effizienz nur als FRET-Effizienz bezeichnet.

2.4 Monte-Carlo Simulation

Zur Interpretation der Verweildauer-Histogramme in Abschnitt 5.3 wurden Monte-Carlo Simulationen verwendet. Hierbei wird der stochastische Charakter der Übergänge zwischen zwei Zuständen mit Hilfe eines Zufallsgenerators simuliert (Die Funktion *enoise* von Igor Pro 6.01 von WaveMetrics, Oregon USA.), der in jedem Zeitintervall Δt eine Zahl ξ zwischen 0 und 1 generiert. Analog zu der in Abb.3.3 skizzierten Situation können bei einem Übergang von einem Zustand mit k_{hin} in den nachfolgenden oder mit k_{rueck} in den vorhergehenden vier Fälle auftreten:

1. $\xi > \Delta t \cdot k_{hin}$ und $\xi > \Delta t \cdot k_{rueck}$
2. $\xi > \Delta t \cdot k_{hin}$ und $\xi < \Delta t \cdot k_{rueck}$
3. $\xi < \Delta t \cdot k_{hin}$ und $\xi > \Delta t \cdot k_{rueck}$
4. $\xi < \Delta t \cdot k_{hin}$ und $\xi < \Delta t \cdot k_{rueck}$

Im Fall 1 sind beide Raten kleiner als ξ und somit erfolgt kein Übergang. Im Fall 2 erfolgt der Übergang in Richtung von k_{rueck} . Im Fall 3 erfolgt der Übergang in Richtung von k_{hin} . Im Fall 4 ist ξ kleiner als beide Raten. Die Entscheidung, welcher Übergang stattfindet, fällt auf Grund der Relation von ξ zur Hälfte der kleineren der beiden Raten. Ist ξ größer als diese, so findet der Übergang in Richtung k_{hin} , ist ξ kleiner, so erfolgt der Übergang in Richtung k_{rueck} .

Kapitel 3

Theorie

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit einem Einzelmolekül-TIRF-Mikroskop durchgeführt. Die diesem zugrunde liegende Totalreflexion und das dadurch erzeugte evaneszente Feld wird im ersten Teil dieses Kapitels vom Snellius Brechungsgesetz abgeleitet. Im zweiten Teil des Kapitels wird das Phänomen des zwischenmolekularen Energieübergangs erläutert. Die für die Interpretation der Messungen unerlässliche Theorie der Kinetik bildet den Abschluss dieses Kapitels.

3.1 Totalreflexion

Das Prinzip der Totalreflexion wird im Folgenden physikalisch abgeleitet und ist im wesentlichen aus [48] adaptiert. Um das Verhalten von Licht an Grenzflächen und somit das Phänomen der Totalreflexion zu verstehen, muss man vom Wellencharakter des Lichts ausgehen. Als Lösung der Maxwellgleichungen lässt sich für das elektrische Feld \vec{E} am Punkt \vec{r} zum Zeitpunkt t durch eine ebene Welle mit Ausbreitungsvektor \vec{k} und Frequenz ω beschreiben:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 \cdot e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)}. \quad (3.1)$$

Fällt nun, wie in Abb.3.1 dargestellt, das Licht vom optischen dichteren Medium Quarz mit dem Brechungsindex n_{Quarz} in das optisch dünnere Medium Wasser mit dem Brechungsindex n_{Wasser} , so wird nach dem Brechungsgesetz von Snellius

$$\frac{\sin \alpha_i}{\sin \alpha_e} = \frac{n_{Wasser}}{n_{Quarz}}, \quad (3.2)$$

das Licht vom Lot weggebrochen. Nach Gleichung 3.2 vergrößert sich der Ausfallswinkel α_e mit größer werdendem Einfallswinkel α_i nicht so schnell wie letzterer. Damit gibt es einen Grenzwinkel α_T ,

$$\alpha_T = \arcsin \left(\frac{n_{Quarz}}{n_{Wasser}} \right) = \frac{\pi}{2}, \quad (3.3)$$

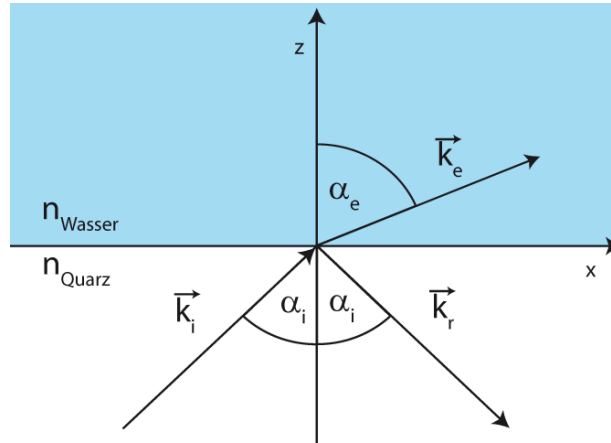


Abbildung 3.1: Reflexion einer einfallenden ebenen Welle mit Wellenvektor \vec{k}_i an der Quarz-Wasser-Grenzfläche. Die Welle wird vom zur z-Achse parallelen Lot weggebrochen.

bei dem sich die gebrochene Welle „streifend“ entlang der Grenzfläche bewegt. Es ist festzustellen, dass für Winkel $\alpha_i > \alpha_T$ der $\sin \alpha_e > 1$ ist. Dieses bedeutet, dass α_e ein komplexer Winkel mit rein imaginärem Kosinus ist:

$$\cos \alpha_e = i \sqrt{\left(\frac{\sin \alpha_i}{\sin \alpha_T}\right)^2 - 1}. \quad (3.4)$$

Um die Bedeutung für die ebene Welle mit Ausbreitungsrichtung k_e ins Medium zu verstehen, setzt man diesen Ausdruck in die Exponentialfunktion aus Gleichung 3.1 ein:

$$\exp(i(\vec{k}_e \vec{r})) = \exp(ik_e(z \cdot \cos \alpha_e + x \cdot \sin \alpha_e)) \quad (3.5)$$

$$= \exp\left(\underbrace{-k_e \sqrt{\left[\left(\frac{\sin \alpha_i}{\sin \alpha_T}\right)^2 - 1\right]}}_{1/d} z\right) \cdot \exp\left(ik_e \left(\frac{\sin \alpha_i}{\sin \alpha_T}\right) x\right). \quad (3.6)$$

Dieser Ausdruck zeigt, dass sich die gebrochene Welle parallel der Grenzfläche in x-Richtung ausbreitet und in z-Richtung, im optisch dünneren Medium, exponentiell mit der charakteristischen Länge d abklingt. Mit einigen trigonometrischen Umformungen und mit Hilfe der Beziehung $k = 2\pi \cdot n/\lambda$, wobei λ die Wellenlänge des Lichts ist, lässt sich für d ein handlicher Ausdruck angeben:

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_{\text{Quarz}}^2 \cdot \sin^2 \alpha_i - n_{\text{Wasser}}^2}} \quad (3.7)$$

Die Dämpfung vollzieht sich, außer für $\alpha_i \cong \alpha_T$, innerhalb eines Bereichs von nur wenigen Wellenlängen. Für den Fall des TIRF-Mikroskops aus Abschnitt 2.3 ergibt sich $d \approx 80 \text{ nm}$.

Es bleibt anzumerken, dass im Falle der Totalreflexion von ebenen Wellen keine Energie in das Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex transportiert wird.[49]

3.2 Zwischenmolekularer Energietransfer

Der zwischenmolekulare Energietransfer wird zu Ehren seines Entdeckers auch *Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)* genannt. Es handelt sich dabei um den unmittelbaren Energieübertrag von einem Fluoreszenzmolekül (Donor) auf ein anderes (Akzeptor). Die Energie des Donors wird dabei nicht einfach in Form eines Fluoreszenzphotons abgestrahlt und durch den Akzeptor reabsorbiert. Das Molekül koppelt über seine elektronischen Oszillator-Eigenschaften mit dem Strahlungsfeld. Dieses führt zu einer unmittelbaren Wechselwirkung zweier solcher molekularer Oszillatoren. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist ein elektrodynamisches Phänomen und kann sowohl mit klassischer Physik [50] als auch quantenmechanisch [51] beschrieben werden. Im Folgenden soll der klassische Weg mit Hilfe des Oszillatormodells nachvollzogen werden.

Hierbei betrachtet man den Energie-Donor (D) und den Akzeptor (A) als Hertz'sche Dipole. Im Bereich des Nahfeldes ist das elektrische Feld des angeregten Donors D am Ort des Akzeptors A durch

$$\vec{E}_{DA} = -\frac{\vec{\mu}_D}{n^2 \cdot r_{AD}^3} \cdot \kappa \quad (3.8)$$

gegeben, dabei ist n der Brechungsindex, μ_D das Dipolmoment des Donors und κ ein Faktor, der der relativen Orientierung der Dipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander Rechnung trägt. Betrachtet man nun eine Lösung von Akzeptoren mit dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_A(\nu)$, so ist die im Frequenzintervall pro Sekunde absorbierte Energie W_A proportional zum molaren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors und der Intensität der Donor-Strahlung I_D am Ort des Akzeptors

$$I_D = \frac{c\nu}{8\pi} \cdot E_{DA}^2 \quad (3.9)$$

mit der Lichtgeschwindigkeit c . Nach [52] ist die exakte Gleichung für die vom Akzeptor absorbierte Energie:

$$W_A = 3 \frac{c\nu \cdot \ln 10}{8\pi \cdot N} \cdot \epsilon_A(\nu) \cdot E_{DA}^2 \quad (3.10)$$

mit der Avogadro-Konstante N . Die vom Donor abgestrahlte Energie, die nicht auf den Akzeptor übergeht, ist durch die Gleichung des Hertz'schen Dipols gegeben:

$$\bar{S} = \frac{16\pi^4 \cdot n\nu^4 \cdot \mu_D^2}{3c^3} \quad (3.11)$$

Der Anteil, der von den Akzeptoren bei der Frequenz ν aufgenommenen Energie entspricht somit dem Energietransfer und ist:

$$E_A = \frac{W_A}{S + W_A} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}. \quad (3.12)$$

Dabei ist der sogenannte Försterradius

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \cdot \kappa^2 c^4 \epsilon_A(\nu)}{128\pi^5 \cdot N \cdot n^4 \nu^4} \quad (3.13)$$

der Abstand der Fluorophore, bei dem die FRET-Effizienz genau 1/2 ist. Die obige Gleichung gilt nur unter Energieresonanz, also unter der Annahme, dass das Fluoreszenzspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors übereinstimmt. Dieses ist im Allgemeinen nicht der Fall, daher muss das Überlappungsintegral des Faktors $\epsilon_A(\nu)/\nu^4$ mit dem Fluoreszenzspektrum des Donors $F_D(\lambda)$ gebildet werden. Weiterhin muss die Desaktivierung des Donors durch strahlungslose Prozesse berücksichtigt werden, die durch die Quantenausbeute des Donors Q_D gegeben ist. Damit folgt die allgemeine Form des Försterradius,

$$R_0^6 = \left(\frac{9000(\ln 10)\kappa^2 \cdot Q_D}{128\pi^2 N \cdot n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (3.14)$$

in der nur experimentell zugängliche Größen auftauchen.

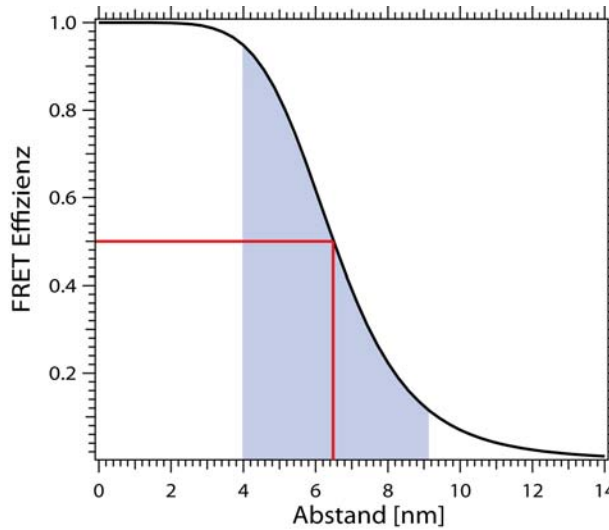


Abbildung 3.2: FRET-Effizienz für die Fluorophore ATTO 550 und ATTO 647N mit dem Förster-Radius von 6,5 nm (rot), berechnet aus Gleichung 3.14. Die blau eingefärbte Fläche zeigt den Bereich der größten Steigung und damit der höchsten Empfindlichkeit auf Abstandsänderungen.

Diese Abhängigkeit der Effizienz von der sechsten Potenz des Abstands macht FRET zu einem hervorragenden Werkzeug zur Bestimmung von Abstandsänderungen um den Försterradius (im Fall von ATTO 550 mit ATTO 647N 6,5 nm). Dieser ist in Abb.3.2 zusammen mit der berechneten FRET-Effizienz in Abhängigkeit des Abstands dargestellt.

3.3 Kinetik

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die kinetische Charakterisierung der ATPase-Funktion von Hsp90. Aus diesem Grund wird die Beschreibung einer einfachen Zwei-Zustands-Kinetik erfolgen, die im Wesentlichen aus [9] und [53] adaptiert ist.

Die Mastergleichung beschreibt die zeitliche Änderung der Wahrscheinlichkeit, ein System in einem bestimmten Zustand N vorzufinden. Die Gleichung setzt sich zusammen aus Gewinn- und Verlusttermen. Die Gewinnterme repräsentieren die möglichen Übergänge aus anderen Zuständen N' in den Zustand N , Verlustterme stehen für Übergänge aus dem Zustand N in einen anderen Zustand N' .

$$\dot{P}_N(t) = \sum_{N'} (k_{NN'}P_{N'}(t) - k_{N'N}P_N(t)) \quad (3.15)$$

Die Übergangswahrscheinlichkeit ist durch die Ratenkonstanten k_{NN} und $k_{N'N}$ gegeben, die die Einheit s^{-1} haben. Ist nur ein Übergang pro Zeiteinheit zwischen benachbarten Zuständen möglich, vereinfacht sich die Mastergleichung:

$$\dot{P}_N(t) = \underbrace{+k_{N(N+1)}P_{N+1}(t) + k_{N(N-1)}P_{N-1}(t)}_{\text{Gewinnterme}} - \underbrace{k_{(N+1)N}P_N(t) - k_{(N-1)N}P_N(t)}_{\text{Verlustterme}} \quad (3.16)$$

Betrachtet man nun eine Reaktion zwischen Zuständen A und B nach folgendem Schema



und nimmt die Besetzungswahrscheinlichkeit des Gesamtsystems als konstant an, also $P_A + P_B = 1$, so ergibt Gleichung 3.16 für die Besetzungswahrscheinlichkeiten:

$$\dot{P}_A = \frac{dP_A}{dt} = -k_{on}P_A + k_{off}P_B = k_{off} - (k_{on} + k_{off})P_A \quad (3.18)$$

und analog

$$\dot{P}_B = k_{on} - (k_{on} + k_{off})P_B. \quad (3.19)$$

Die Lösung der Differentialgleichung 3.18 ist:

$$P_A = P_{A,0} \cdot e^{-(k_{on}+k_{off})t} + \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}}. \quad (3.20)$$

Analog ist die Lösung der Differentialgleichung 3.19

$$P_B = P_{B,0} \cdot e^{-(k_{on}+k_{off})t} + \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}}. \quad (3.21)$$

Die Zeit, die ein Molekül in einem definierten Zustand bleibt, bevor es wechselt, wird auch Verweildauer genannt. Um sie zu bestimmen, muss nur die Rate betrachtet werden, mit der das Molekül aus seinem Zustand herauswechselt. Damit vereinfachen sich die Differentialgleichungen auf:

$$\dot{P}_A = -k_{on}P_A \quad (3.22)$$

und

$$\dot{P}_B = -k_{off}P_B. \quad (3.23)$$

Die Lösungen sind einfache Exponentialfunktionen

$$P_A = P_{A,0} \cdot e^{-k_{on}t} \quad (3.24)$$

$$P_B = P_{B,0} \cdot e^{-k_{off}t}, \quad (3.25)$$

deren Amplitude unter der Annahme, dass sich das Molekül zum Zeitpunkt ($t=0$) im betrachteten Zustand befindet, gleich eins ist. Also ist $P_{A,0} = P_{B,0} = 1$ und somit

$$P_A = e^{-k_{on}t} \quad (3.26)$$

$$P_B = e^{-k_{off}t}. \quad (3.27)$$

Die Erweiterung dieses Zwei-Zustands-Systems auf vier Zustände erfolgt in Anhang C. Die Gleichungen 3.26 und 3.27 bedeuten, dass ein aus dem Gleichgewicht gebrachtes System mit einem exponentiellen Zeitverlauf relaxiert. Im Gleichgewicht ist $\dot{P}_A = 0$ und es gilt

$$\frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{P_B}{P_A} = K_{eq} = \exp\left[-\frac{\Delta G^0}{k_B T}\right], \quad (3.28)$$

wobei ΔG^0 die freie Standardreaktionsenthalpie und k_B die Boltzmann-Konstante ist. Das physikalische Bild hinter einer Reaktion erster Ordnung ist ein sehr schneller Übergang vom Zustand A in den Zustand B. Um sich das Konzept von Reaktionen erster Ordnung zu verdeutlichen, ist es nützlich, sich eine Energielandschaft, wie in Abb.3.3 vorzustellen, in der die Zustände A und B durch einen hochenergetischen Übergangszustand T auf der Reaktionskoordinate getrennt sind, der mit gleicher Wahrscheinlichkeit in Zustand A und B zerfällt. Die Zustände A und T sind miteinander im Gleichgewicht. Nach dem Boltzmann-Gesetz ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Molekül im Zustand T befindet:

$$\frac{P_T}{P_A} = e^{-(G_T - G_A)/K_B T}. \quad (3.29)$$

Also ist die Rate, mit der das Produkt erzeugt wird:

$$\frac{dP_B}{dt} = \lambda P_T = \lambda \cdot P_A e^{-(G_T - G_A)/K_B T}. \quad (3.30)$$

Die Rate ist also linear proportional zu P_A und die Ratenkonstante ist

$$k_{on} = \lambda \cdot e^{-\Delta G_{TA}/K_B T}, \quad (3.31)$$

wobei λ der präexponentielle Faktor ist. Die Gleichung 3.31 wird auch Arrhenius-Gleichung genannt. Sie beschreibt die starke Temperaturabhängigkeit biochemischer Reaktionsraten, die sich in der Regel alle 10°C verdoppeln. Werte für den präexponentiellen Faktor

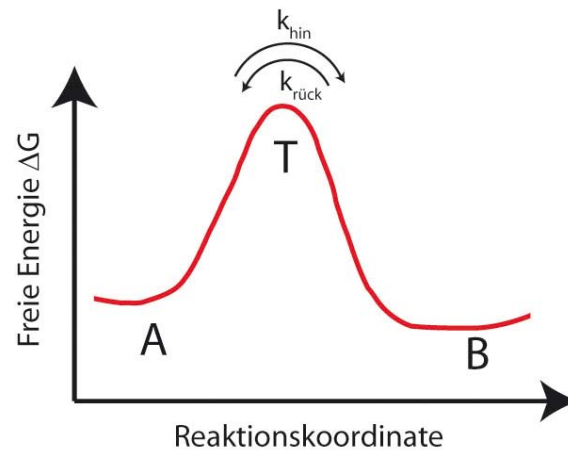


Abbildung 3.3: Energielandschaft einer Reaktion zwischen zwei unterscheidbaren Zuständen A und B. Die Reaktionskoordinate könnte hierbei z.B. der Abstand der N-Termini des Hsp90-Dimers sein.

versuchen die Eyring-Raten-Theorie und die Kramers-Raten-Theorie anzugeben. Erste beschreibt die Reaktion als Zusammenbruch quantenmechanischer Schwingungen und liefert einen Wert von $\lambda \approx k_B T/h \cong 6 \cdot 10^{12} s^{-1}$. Sie findet vor allem bei kovalenten Veränderungen in Proteinen und ihren Liganden Anwendung. Die Kramers-Raten-Theorie ist für große Konformationsänderungen in Proteinen physikalisch realistischer. Das Protein diffundiert in den Übergangszustand mit einer zu der Diffusionszeit reziproken Rate:

$$k_{on} = \frac{\epsilon}{\pi} \frac{1}{\tau} \sqrt{\frac{\Delta G_{TA}}{k_B T}} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_{TA}}{k_B T}\right). \quad (3.32)$$

Hierbei ist ϵ ein Effizienz-Faktor, der die Wahrscheinlichkeit angibt vom Übergangszustand aus in den Zustand B zu diffundieren. Da die anderen präexponentiellen Faktoren etwa eins sind, ist die Ratenkonstante im Wesentlichen abhängig vom Inversen der Relaxationszeit τ . Diese hängt vom Verhältnis des Reibungskoeffizienten γ und der Steifigkeit κ ab: $\tau = \gamma/\kappa$. Man kann sich vorstellen, dass das Protein alle τ Sekunden ein Energie-Niveau abtastet. Mit dem oben beschriebenen Konzept der Energielandschaft einer Reaktion lässt sich die konzertierte Bewegung von tausenden von Atomen, wie sie bei komplexen molekularen Maschinen auftritt, veranschaulichen.[54] Dabei wird die eigentlich hochdimensionale Landschaft auf eine Dimension, die sogenannte Reaktionskoordinate abgebildet.[55] Je weiter man in dieser Energielandschaft Ausschnitte vergrößert, desto rauer wird sie. Diese Rauigkeit lässt sich mit unterschiedlichen Messmethoden auf den diesen zugänglichen Zeitskalen untersuchen.[56]

Kapitel 4

Konformationsänderungen von einzelnen Hsp90-Molekülen

Seit der Entdeckung und Erklärung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers durch Theodor Förster hat dieser sich als „spektroskopisches Lineal“ in der Chemie und insbesondere der Biochemie etabliert.[51][57] Mit seiner Hilfe konnten unter anderem Aussagen über die Ausdehnung von Molekülen, Bindung von Liganden an Enzyme, Bewegung von Molekülen in Membranen und vor allem die Interaktion von DNA/RNA mit Proteinen getroffen werden.[58][59] Auch wurden Konformationsänderungen molekularer Motoren untersucht.[60] Ein wesentlicher Vorteil von FRET ist, dass es sich um eine ratiometrische Methode handelt, bei der Sender und Empfänger molekulare Abstände voneinander haben. Damit ist die Messung nicht sehr anfällig auf vom Messinstrument verursachte Störungen wie Drift und Rauschen.[31] Bei dem Großteil dieser Messungen handelt es sich um biochemische Ensemblemessungen. Diese mitteln über viele Moleküle, deren Bewegungen zwar einem gemeinsamen Schema folgen, aber nicht synchronisiert werden können.[61] Vor nicht einmal zwei Jahrzehnten gelang es erstmals, einzelne Fluorophore bei der Temperatur flüssigen Heliums in Kristallen zu detektieren.[62][63] Es folgten bald die ersten Arbeiten mit biologischen Fragestellungen.[64] Um einzelne Moleküle unter physiologischen Bedingungen beobachten zu können, musste jedoch erst die große Hintergrundstrahlung durch Raman-Streuung an Wasser verringert werden. Die Entwicklung von Totale-Interne-Reflexions- und konfokalen Mikroskopen, die nur einen winzigen Ausschnitt des Probenvolumens beleuchten, ermöglichte es, diese Problematik zu umgehen und sich komplexeren biologischen Fragestellungen zuzuwenden.[65][66]

Die ersten Einzelmolekül-FRET (smFRET) Experimente wurden an DNA in nicht-wässriger Lösung durchgeführt.[67] Seitdem ist die Zahl der Anwendungen von smFRET stetig gestiegen und die Technik hat sich neben anderen Einzelmolekültechniken etabliert.[68] Das Spektrum der mit smFRET untersuchten Systeme reicht von der Faltung von Biopolymeren über die Kinetik von DNA-/RNA-basierten Motoren bis zur Konformations-Kinetik von Proteinen.[69][70][71][45][72] Auch die Sensitivität ist Dank großer Verbesserungen von Kameras, Fluorophoren und Filtern stark gestiegen. Viele Übersichtsartikel befassen sich mit der Thematik der smFRET-Experimente.[73][31][74]

Der größte Fortschritt konnte auf dem Gebiet der DNA-/RNA-basierten molekularen Translationsmotoren erzielt werden. Das liegt unter anderem daran, dass bei diesen Experimenten einer der FRET-Partner, die fluoreszenz-markierten Nukleotide, kommerziell in hoher Qualität und mit unterschiedlichen Funktionalisierungen erhältlich sind. Auf Grund des komplexeren Aufbaus und der komplizierten Herstellung von Proteinen in lebenden Organismen sind Untersuchungen an Protein-Protein-Systemen deutlich schwieriger. Erschwerend kommt hinzu, dass es bisher nur eine praktikable Methode der spezifischen Fluoreszenzmarkierung von Proteinen gibt. Deshalb kann die Funktionalisierung von zwei Aminosäuren an unterschiedlichen Stellen des Proteins nur statistisch erfolgen. Aus diesem Grund sind smFRET-Experimente an Protein-Protein-Systemen bisher nur mit Kinesin und der FoF1-AtPase gelungen.[75][76]

4.1 Einzelmolekül-FRET-Kurven

In dieser Arbeit wurde der chemo-mechanische ATPase-Zyklus von Hsp90 untersucht. Dabei sollten die vermuteten großen Konformationsänderungen, die das Molekül während seines ATPase-Zyklus ausübt, mit Hilfe des spektroskopischen Lineals FRET analysiert werden. Hierzu wurden mit molekularbiologischen Methoden Hsp90 Mutanten erstellt, bei denen definierte Aminosäuren gegen Cysteine ausgetauscht wurden. Diese wurden so ausgewählt, dass die an ihnen spezifisch befestigten Donor- und Akzeptorfluorophore eine große Abstandsänderung in eine gut erkennbare spektrale Änderung der Fluoreszenz übersetzen konnten.

Im nicht-funktionalisierten Zustand wurden die Hsp90 Mutanten von Martin Hessling vom Chemie-Department *in vivo* auf ihre Funktionsfähigkeit in Hefezellen getestet.[27][44] Danach wurden sie fluoreszenzmarkiert (s.Anhang A.3) und mit Biotin funktionalisiert (s.Abschnitt 2.2). Die so markierten Moleküle wurden auf ihre ATPase-Aktivität getestet (s.Anhang A.2). Hatten die Moleküle eine dem wild-typ Hsp90 vergleichbare ATPase-Aktivität, so wurden sie im Einzelmolekül-Mikroskop untersucht (s.Abschnitt 2.3.7). Die von der Mikroskopkamera aufgezeichneten Filme wurden mit der selbst geschriebenen Software ausgewertet (s.Abschnitt 2.3.8).

4.1.1 FRET zwischen N- und M-Domäne

Eine typische smFRET-Kurve eines Hsp90-Moleküls zeigt Abb.4.1. Dabei erfolgte die Dimerisierung mithilfe eines Coiled-Coil-Motivs. Das Donorfluorophor war an der Aminosäure C61 in der N-Domäne des einen Monomers befestigt und das Akzeptorfluorophor an der Aminosäure C385 in der M-Domäne des anderen Monomers.

Deutlich zu erkennen ist das Verweilen des Fluoreszenzsignals im Donorkanal auf einem hohen Intensitäts-Niveau abwechselnd mit niedrigen Intensitäts-Niveaus. Das Signal des Akzeptorkanals verhält sich dazu antikorreliert, was bei Signalen aus zwischenmolekularer Energieübertragung zu erwarten ist.[31] Die Verteilung sämtlicher gemessener FRET-Zustände ist in Abb.4.2 aufgetragen. Dabei ging nur der Bereich der FRET-Kurven in die

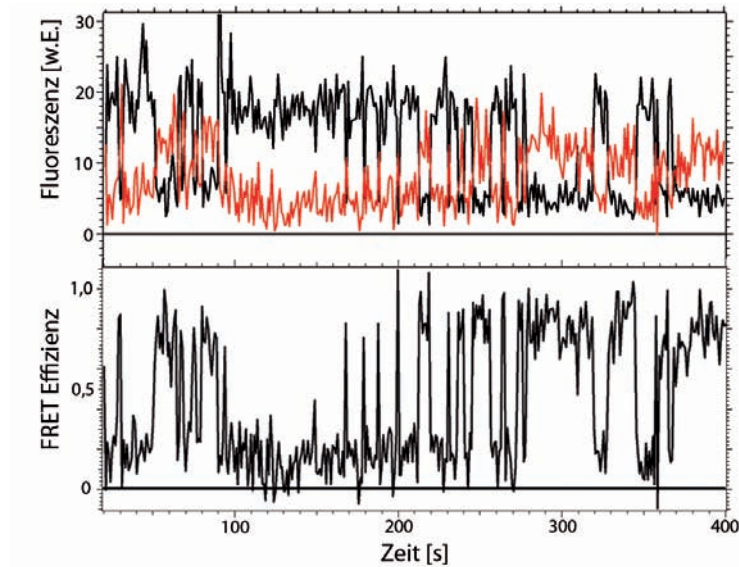


Abbildung 4.1: Oben: Typischer zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität des Donors (schwarz) und des Akzeptors (rot), die jeweils an unterschiedlichen Monomeren des Hsp90zipper-Konstruktes befestigt waren. Unten: Nach Gleichung 3.12 errechnete FRET-Effizienz. Man erkennt deutlich unterschiedliche Niveaus.

Verteilung ein, in dem das Akzeptorfluorophor noch nicht geblichen war, und die Kurve somit eine von null verschiedene Fluoreszenzintensität im Akzeptorkanal aufwies.

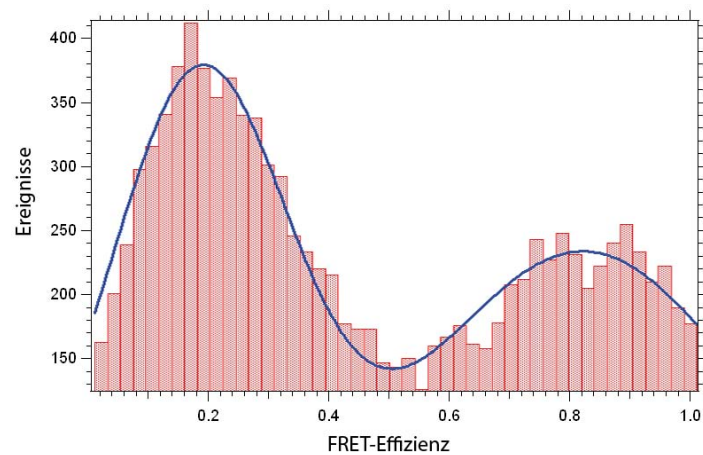


Abbildung 4.2: Verteilung der gemessenen FRET-Effizienzen für die C61-C385-Hsp90 Heterodimere (rot). Jedes Ereignis entspricht einem Zeitpunkt im Verlauf der Effizienz. Die Verteilung lässt sich sehr gut mit zwei Gauss-Kurven annähern (blau).

Die Verteilung entspricht sehr gut zwei Gauss-Kurven. Von diesen hat die eine ihr Maximum bei einer FRET-Effizienz von 0,19 und die andere bei 0,8. Die Konformationsänderungen des Hsp90-Moleküls finden auf Zeitskalen statt, die bis zu zwei Größenordnungen schneller sind als die ATPase-Rate (≈ 1 s zu ≈ 100 s). Das ist konsistent mit Ensemble-Messungen,

die schnelle und langsame Schritte zwischen einzelnen Konformationen postulieren.[14][44] Es sind nur zwei Abstände von N- und M-Domäne zu erkennen, was bedeutet, dass eventuell dazwischen liegende Schritte nicht mit großen Änderungen der Abstände zwischen den hier beobachteten Fluorophoren einhergehen. Auch auf den schnellsten Zeitskalen, die sich auf dem Mikroskop messen ließen, lassen sich keine anderen FRET-Niveaus beobachten (vgl. Abb.4.3). Eine detaillierte Diskussion der Kinetik der beobachteten Konformationsänderungen von Hsp90 erfolgt in Kapitel 5

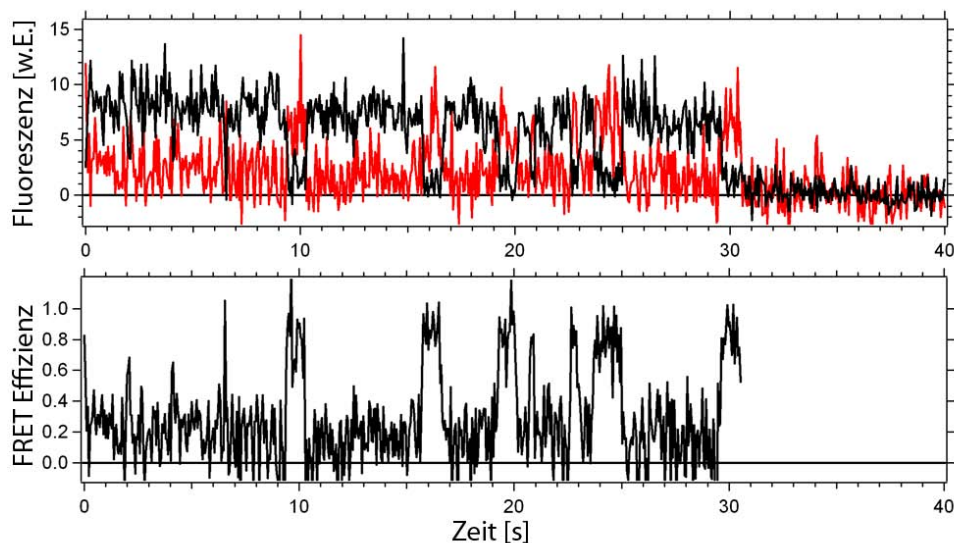


Abbildung 4.3: Oben: Mit einer Zeitauflösung von 55 ms pro Bild aufgenommene Einzelmolekül-Kurve. Das Fluoreszenzsignal des Donorkanals ist schwarz und das des Akzeptorkanals rot markiert. Unten: Auch mit der schnellstmöglichen Zeitauflösung treten nur zwei FRET-Niveaus auf.

4.1.2 FRET zwischen den N-Domänen

Zusätzlich zu dem oben besprochenen Konstrukt wurde ein weiteres, mit molekularbiologischen Methoden, wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, hergestelltes Konstrukt vermessen. Dieses war ein Heterodimer aus zwei Hsp90-Molekülen mit Coiled-Coil-Motiv, bei denen die Aminosäuren Ser109 der N-Domäne des einen Monomers und Asn179 in der N-Domäne des anderen Monomers gegen Cysteine mutiert und mit einem FRET-Paar markiert waren. Beide Konstrukte wiesen eine mit dem nativen Hsp90 vergleichbare ATPase-Aktivität auf. Die smFRET-Kurven hatten den gleichen Charakter wie das an N- und M-Domäne markierte Hsp90.

Die Verteilung der FRET-Effizienzen ist in Abb. 4.5 dargestellt und zeigt ebenfalls zwei Populationen. Davon hat die eine ihr Maximum bei einer FRET-Effizienz von 0,85 und die andere um 0,21. Ein Heterodimer, bei der Donor- und Akzeptorfluorophor an Aminosäure C61 der Monomere befestigt war, zeigt keinen erkennbaren Energietransfer.

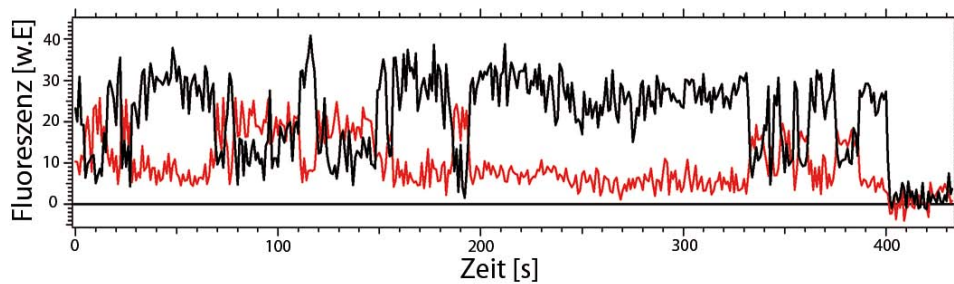


Abbildung 4.4: Verlauf der Fluoreszenzintensität von Hsp90, bei dem die Aminosäuren 109 und 179 mit Fluorophoren markiert waren. Auch bei diesen Kurven erkennt man zwei unterscheidbare Zustände, in denen das Molekül unterschiedliche Zeiten verweilt.

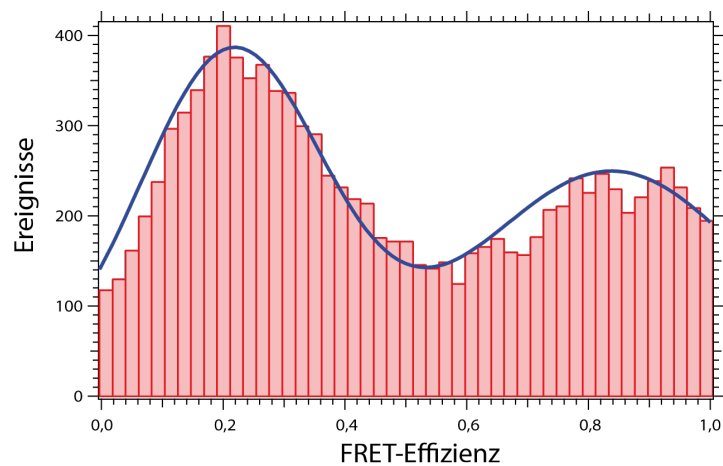


Abbildung 4.5: Die Verteilung der FRET-Effizienzen des an den N-Domänen markierten Hsp90 weist zwei deutlich unterscheidbare Populationen auf. Eine um 0,85 und eine um 0,21.

4.1.3 Intramonomer-FRET zwischen N- und M-Domäne

Als weiteres Konstrukt wurde eine Hsp90 Mutante mit Coiled-Coil-Motiv untersucht, bei der die Aminosäuren Gln385 und Asp61 desselben Monomers gegen Cysteine ausgetauscht worden waren. Mit diesem Konstrukt sollte festgestellt werden, ob die N-Domäne eine Bewegung relativ zur M-Domäne erfährt. Die Markierung der Cysteine durch Fluorophore erfolgte statistisch. Es wurde ein dreifacher Überschuss an Akzeptorfluorophor hinzugegeben, um so die Zahl an doppelt mit dem Donor markierten Hsp90-Molekülen möglichst gering zu halten. Der relativ große Anteil an doppelt mit dem Akzeptor markierten Hsp90-Molekülen spielte keine Rolle, da diese in den Experimenten nicht signifikant von dem 532 nm-Laser angeregt wurden. Im Anschluss wurden die über das Coiled-Coil-Motiv dimerisierten vierfach markierten Hsp90-Moleküle mit einem zehnfachen molaren Überschuss an unmarkierten Hsp90-Molekülen inkubiert, um ein markiertes mit einem nicht-markiertem Monomer zu verbinden und somit einen Energieübertrag zwischen den beiden Monomeren zu verhindern.

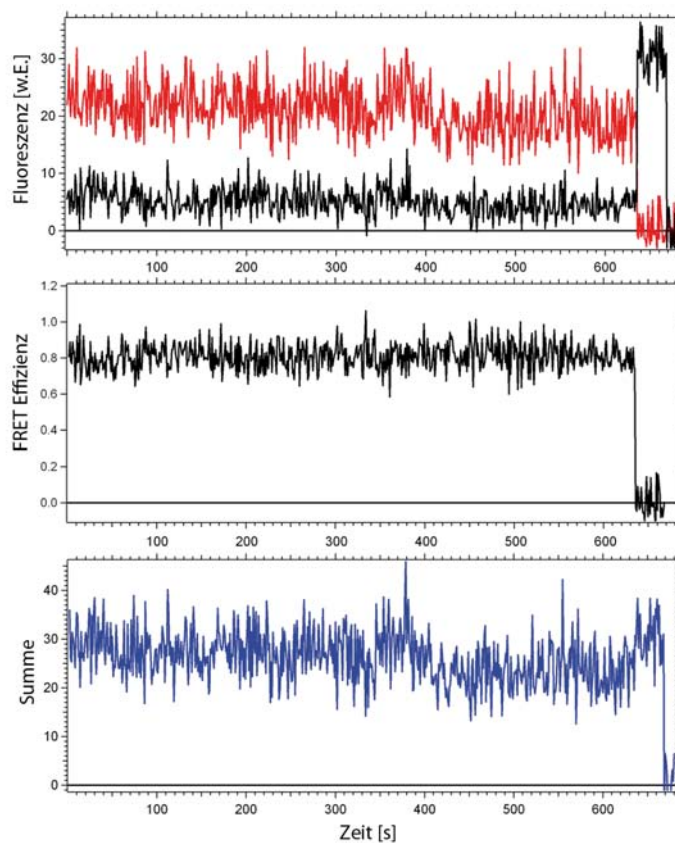


Abbildung 4.6: Typische smFRET-Kurve des Konstruktes mit dem FRET-Paar innerhalb desselben Monomers. Innerhalb der Messgenauigkeit zeigen die Kurven eine konstant hohe FRET-Effizienz, bis das Akzeptorfluorophor bleicht.

Eine typische smFRET-Kurve ist in Abb.4.6 dargestellt. Sie zeigt eine konstant hohe FRET-Effizienz bis zum Bleichen des Akzeptors. Die Verteilung der FRET-Effizienzen ist in Abb.4.7 dargestellt. Die Population um die FRET-Effizienz von 0,81 stellt den Bereich vor dem Bleichen des Akzeptormoleküls dar. In diese Verteilung ging auch der Teil der FRET-Kurven ein, in denen das Akzeptorfluorophor schon gebleichen war. Die Population mit einer geringen FRET-Effizienz von 0,02 repräsentiert den bereits gebleichenen Akzeptorfluorophor.

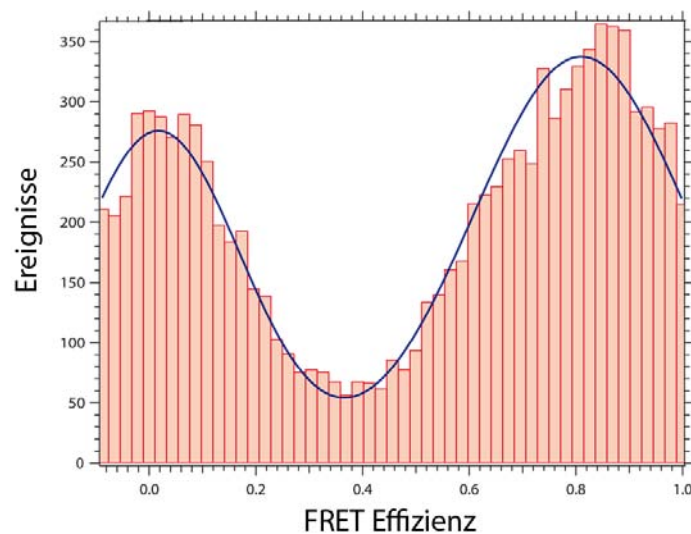


Abbildung 4.7: Verteilung der FRET-Effizienz von Hsp90 mit dem FRET-Paar innerhalb desselben Monomers. Die Population mit niedriger FRET-Effizienz entspricht dem bereits gebleichenen Akzeptorfluorophor.

4.1.4 Anisotropien der Fluorophore

Lange Zeit galt es als schwierig, mit Hilfe von FRET absolute Abstände zu bestimmen.[43] Das wurde vor allem damit begründet, dass die in der Regel sehr hydrophoben Fluorophore sich im Wasser nicht frei bewegen, sondern sich an die Oberfläche des Proteins anlagern würden und somit der Faktor κ^2 nicht mit $2/3$ angenommen werden könne. Das würde es auch unmöglich machen, Abstandsänderungen der Fluorophore voneinander von Rotationen der Dipolmomente relativ zueinander zu trennen. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass dieser Effekt keine so große Rolle spielt, wie früher angenommen wurde.[46][77] Insbesondere kann bei Anisotropien des Fluoreszenzsignals kleiner als 0,2 von einem $\kappa^2 = 2/3$ ausgegangen werden.[31][78] Um zu kontrollieren, ob sich die verwendeten Fluorophore tatsächlich frei am Hsp90-Molekül bewegen konnten, wurde deren Fluoreszenz-Anisotropie gemessen (s.Anhang A.1). Dazu wurden in das Spektrofluorimeter Polarisatoren in den Anregungsstrahlengang und den Detektionsstrahlengang eingebaut. Die Anisotropien der in den Einzelmolekülmessungen verwendeten fluoreszenzmarkierten Proteine sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Aminosäure-Farbstoff	Anisotropie
C61-550	0,18
C385-647N	0,20
C109-550	0,17
C179-647N	0,19

Tabelle 4.1: Anisotropien der verschiedenen fluoreszenzmarkierten Mutanten. Alle Werte sind kleiner als 0,2. Damit kann von frei rotierenden Fluorophoren ausgegangen werden.

Die Anisotropie war bei allen verwendeten Proteinen $\leq 0,2$ und somit wurde das Fluorophor im Rahmen der möglichen Freiheitsgrade eines an einem Protein befestigten Fluorophors als frei rotierend mit einem κ^2 von $2/3$ angenommen.

4.2 Abschätzung der Distanzen

Die beobachteten FRET-Niveaus sind mit einem definierten Abstand der Fluorophore zueinander korreliert. Unter der im vorhergehenden Abschnitt getroffenen Annahme frei rotierender Fluorophore lässt sich mit der Gleichung 3.14 der Förster-Radius $R_0=6,5$ nm berechnen. Damit kann man den theoretischen Abstand d der beiden Fluorophore bestimmen nach:

$$d = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6}. \quad (4.1)$$

Man kann nun versuchen, die FRET-Niveaus mit den unterschiedlichen Zuständen im chemomechanischen Zyklus des Hsp90 in Verbindung zu bringen, die mit anderen Untersuchungsmethoden identifiziert wurden (s.Kapitel 1). Insbesondere zeigen nahezu alle Methoden einen offenen Zustand mit einem großen Abstand der N-Domänen und einen geschlossenen Zustand mit einem geringen Abstand der N-Domänen. Da die Fluorophore direkt an definierte Aminosäuren der N- und der M-Domäne des Hsp90-Moleküls gekoppelt wurden, kann man versuchen, aus der FRET-Effizienz auf die beobachteten Konformationen zu schließen. Im Folgenden wird versucht, die Abstände der fluoreszenzmarkierten Teile des Proteins mithilfe der Kristallstruktur abzuschätzen.

4.2.1 Distanzen zwischen N- und M-Domäne

Aus Gleichung 4.1 folgt, dass in der offenen Konformation die an C61 und C385 (Intermonomer) angebrachten Fluorophore einen Abstand von 8,3 nm und in der geschlossenen einen Abstand von 5,2 nm haben. Die Kristallstruktur 2CG9 zeigt Hsp90 in der geschlossenen AMP-PNP-gebundenen Konformation.[4] In dieser haben die $C\alpha$ -Atome der Aminosäuren 61 und 385 einen Abstand von 4,15 nm. Die Fluorophore befinden sich nicht direkt an den $C\alpha$ -Atomen, sondern sind über einen Linker mit den Seitenketten der Cysteine verbunden. Die Länge des Linkers lässt sich mit 1,0 nm abschätzen.[79] Die Länge der Seitenkette des

Cysteins läßt sich mit 0,5 nm, die Größe der Fluorophore mit 0,5 nm abschätzen. Ein Ausschnitt aus der Kristallstruktur ist in Abb.4.8 gezeigt. Man erkennt, dass die Orientierung der Restgruppen des Asp61 (in der grünen Kette) und des Gln385 (in der türkisenen Kette) eine wichtige Rolle bei der Abschätzung der Fluorophor-Positionen spielt. Da nicht sicher ist, ob die Kristallstruktur exakt der nativen Hsp90-Konformation entspricht, tragen die Restgruppe und der Linker erheblich zum Fehler der Positionsbestimmung bei. Der aus der FRET-Effizienz im geschlossenen Zustand errechnete Abstand zwischen den Fluorophoren liegt also innerhalb des Fehlers, in dem Bereich, den man aus der Kristallstruktur erwarten würde.

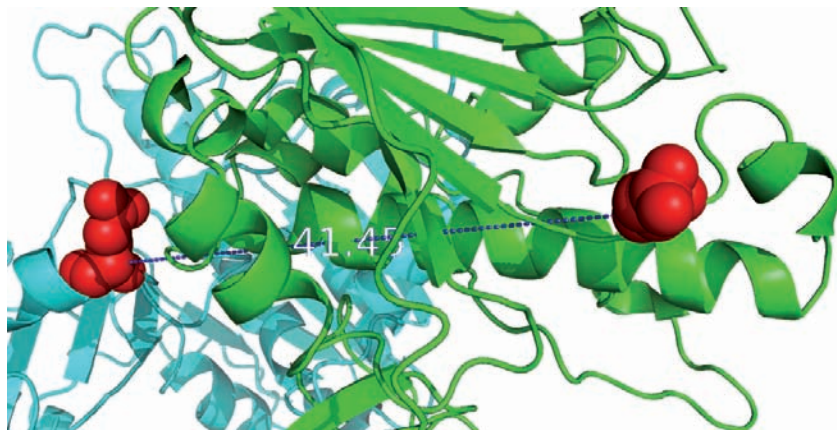


Abbildung 4.8: Ausschnitt der Kristallstruktur 2CG9. Jeweils Rot sind die gegen Cysteine ausgetauschten Aminosäuren 61 und 385 dargestellt. Der Abstand zwischen den $C\alpha$ -Atomen beträgt 4,145 nm. Man erkennt, dass die Restgruppen der Aminosäuren ungefähr parallel zueinander sind.

Für die offene Konformation liegt nur eine Kristallstruktur (2CGE) vor, bei der die N-Domänen nicht aufgelöst sind.[4] Es ist aber auch hier möglich, den Abstand zwischen den beiden an den Cysteinen befestigten Fluorophoren abzuschätzen. Die Kristallstruktur 2CGE ist erst ab Aminosäure Thr273 aufgelöst. Der Abstand von Thr273 zu der gegen das Cystein mutierte Aminosäure Gln385 des anderen Monomers beträgt 5,6 nm. Aus der geschlossenen Kristallstruktur 2CG9, bei der die vollständige Sequenz aufgelöst ist, erhält man einen Abstand von Thr273 zu Asp61, welches gegen eine Cystein mutiert wurde, von 1,8 nm. Nimmt man nun an, dass sich die Geometrie der N-Domäne von Hsp90 während des ATPase-Zyklus nicht dramatisch ändert, so ist der maximal sterisch mögliche Abstand der $C\alpha$ -Atome 7,4 nm. Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Unsicherheit zeigt sich, dass die berechnete Distanz für den geöffneten Zustand, der in den smFRET-Kurven beobachtet wurde, im Bereich der Werte liegt, die aus der Kristallstruktur abgeschätzt werden konnte.

Aus den Messungen der Mutante, bei der innerhalb desselben Monomers die Aminosäuren C61 und C385 fluoreszenzmarkiert waren, errechnet sich ein gleichbleibender Abstand der Fluorophore von 5,0 nm im offenen und im geschlossenen Zustand. Der Abstand der $C\alpha$ -Atome, an denen die Fluorophore befestigt waren, beträgt in der geschlossenen Kristallstruktur 3,9 nm und ist damit im Bereich des aus der FRET-Effizienz errechneten Wertes.

In der offenen Kristallstruktur lässt sich wie oben der sterisch maximal mögliche Abstand in der offenen Konformation als Summe der Abstände der Aminosäuren 385-273 (3,0 nm) und 273-61 (1,8 nm) konstruieren. Diese Werte liegen im Bereich des Abstands von 3,9 nm, den die C α -Atome in der geschlossenen Kristallstruktur haben. Die N-Domäne löst sich also nicht von der M-Domäne während des ATPase-Zyklus von Hsp90.

4.2.2 Distanzen zwischen den N-Domänen

Aus den Messungen der Mutante, die an den Aminosäuren C109 und C179 in der N-Domäne markiert war, ergaben sich FRET-Effizienzen von 0,21 und 0,85. Aus der FRET-Effizienz von 0,85 errechnet sich ein Abstand der Fluorophore von 4,8 nm. Dieses ist größer als der Abstand der beiden C α -Atome in der Kristallstruktur des geschlossenen Zustands, der 3,6 nm beträgt. Diese Distanz liegt jedoch in dem Bereich der FRET-Effizienz-Abstands-Funktion (dargestellt in Abb.3.2), in dem diese nicht mehr sehr empfindlich auf Abstandsänderungen reagiert, somit ist der Fehler auch als größer anzunehmen. Der Abstand von 4,8 nm aus der FRET-Effizienz kann jedoch als obere Grenze angesehen werden. Die FRET-Effizienz von 0,21 entspricht einem Abstand der Fluorophore von 8,1 nm. Aus der Kristallstruktur im offenen Zustand (2CGE) ergibt sich ein Abstand der Aminosäuren 273, der „Angelpunkte“ der N-Domäne, von 6,8 nm. In der Kristallstruktur im geschlossenen Zustand 2CG9 sind die Aminosäuren 109 und 179 2,9 nm bzw. 3,2 nm von der Aminosäure 273 entfernt. Damit ergibt sich ein maximal sterisch möglicher Abstand der Aminosäuren von 12,9 nm. Da aber ein Energieübertrag entsprechend eines Abstandes von 8,1 nm gemessen wurde, lässt sich schließen, dass die beiden Aminosäuren 109 und 179 sich nicht maximal voneinander entfernen.

4.3 Rekonstruktion der Konformationen

Die oben beschriebenen Experimente ermöglichen es nun, zusammen mit der Kristallstruktur die Bewegung der N-Domänen relativ zueinander und relativ zur M-Domäne zu rekonstruieren. Aus den Kristallstrukturen im offenen und geschlossenen Zustand wird deutlich, dass sich die M-Domänen voneinander entfernen und drehen (s.Abb.4.9). Die N-Domänen sind in der Kristallstruktur im offenen Zustand nicht aufgelöst, weswegen sie im Abb.4.9 auch in der geschlossenen Kristallstruktur nicht dargestellt sind. Die Angelpunkte der N-Domäne sind die Aminosäuren Thr237 (blaue Kugeln). Da diese eine starke Bewegung ausführen, ist anzunehmen, dass auch die N-Domänen eine große Bewegung ausüben.

4.3.1 Positionen der N-Domäne relativ zur M-Domäne

Mit einer Reihe von Restriktionen kann man versuchen, durch Triangulation der Positionen der FRET-Paare die Bewegung der N-Domäne gegen die M-Domäne zu rekonstruieren. Das Prinzip ist dabei vergleichbar der Ortsbestimmung mittels GPS (Global Positioning System). Bei dieser wird die Kenntnis des eigenen Abstands zu mindestens vier Satelliten

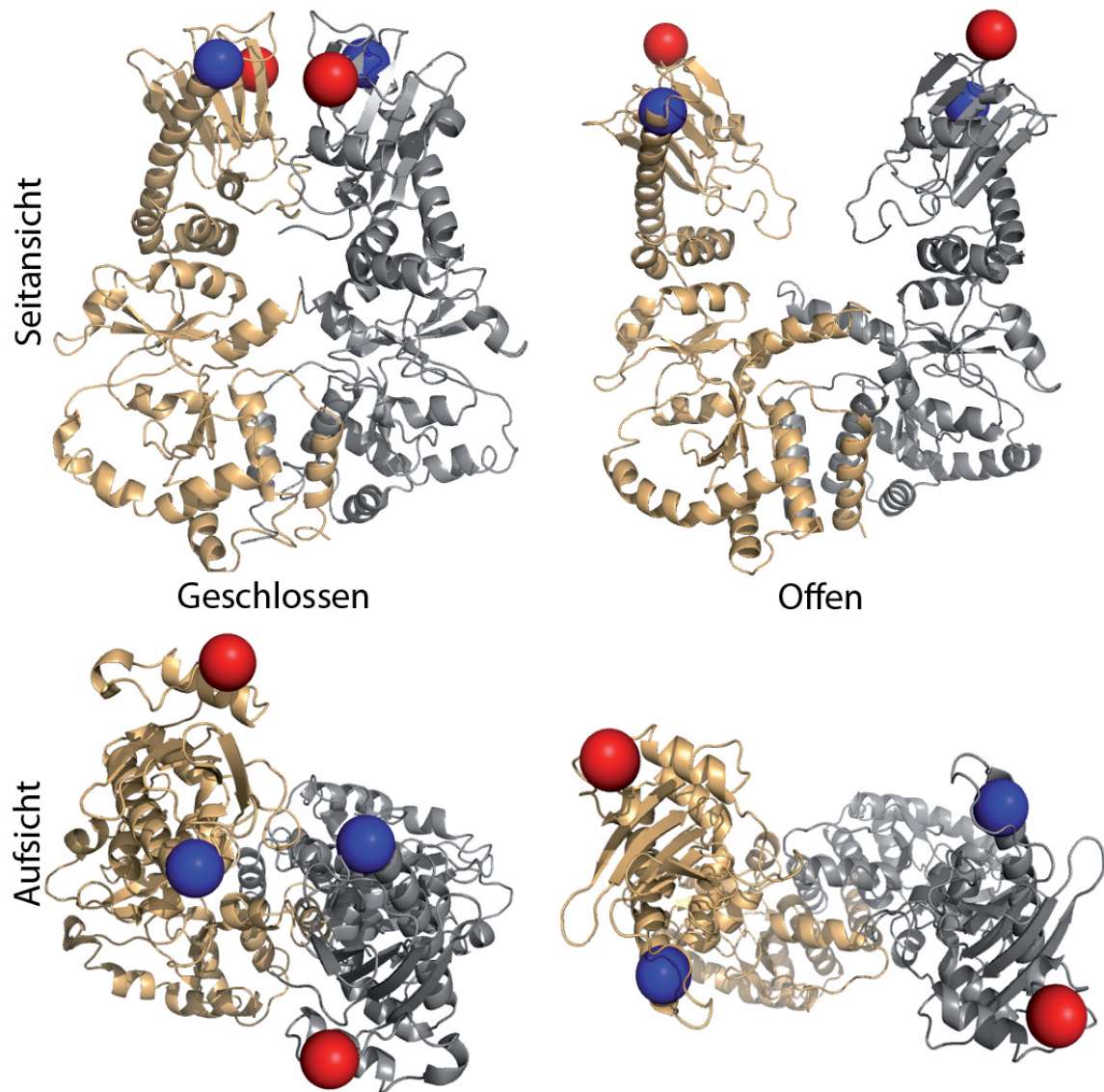


Abbildung 4.9: Vergleich der Kristallstrukturen im geschlossenen (links) und im offenen Zustand (rechts). Die C-Domänen der beiden Strukturen wurden in gleicher Orientierung dargestellt (Seitenansicht). In der Aufsicht wurde das Molekül auf den Betrachter zu gekippt. Zur Verdeutlichung der Bewegung der Domänen des Moleküls sind die C α -Atome der Aminosäuren 273 als blaue Kugeln und die der Aminosäuren 385 als rote Kugeln dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die M-Domänen ihren Abstand in der offenen Konformation vergrößert und sich gedreht haben.

genutzt, um die eigene Position auf der Erdoberfläche mit einer Genauigkeit von wenigen Metern zu bestimmen (bei einer Flughöhe der Satelliten von etwa 20.000 km). In Abb.4.10 wurde versucht, die aus den besprochenen FRET-Experimenten gewonnenen Daten mit den Erkenntnissen aus der Kristallstruktur zu verbinden. Dazu wurden Abbildung mit

dem Programm FRETnps der Gruppe von Jens Michaelis erzeugt.[77] In dieser wurde, ausgehend von den aus der Kristallstruktur bekannten Positionen der Aminosäuren an denen die Fluorophore befestigt waren, der Abstand, der aus den FRET-Effizienzen errechnet wurde, angetragen. In der Abbildung sind die beiden Monomerketten des offenen Hsp90-Dimers in grün bzw. türkis eingefärbt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Kristallstruktur von Hsp90 im geschlossenen Zustand dargestellt. Der Gittertorus gibt den aus den FRET-Effizienzen errechneten Bereich an, indem das an C61 befestigte Fluorophor innerhalb der Standardabweichung σ zu finden ist. Berücksichtigt man noch die Restriktionen der Kristallstruktur, so erhält man den Aufenthaltsbereich des Fluorophors innerhalb der blauen Oberfläche. Dabei sind die Aufenthaltsbereiche durch die Varianz der FRET-Effizienz dominiert. Der Vergleich der Position von C61 in der Kristallstruktur und dem aus der FRET-Effizienz errechneten Aufenthaltsbereich des Fluorophors ergibt eine gute Übereinstimmung der beiden Abstände.

Der mittlere und rechte Teil der Abbildung stellt zwei Ansichten der Kristallstruktur von Hsp90 im offenen Zustand dar. Das C385 ist wieder als graue bzw. lila Kugel dargestellt. Die N-Domäne mit C61 ist nicht in der Kristallstruktur aufgelöst. Die Gitterfläche stellt den aus den FRET-Effizienzen berechneten Aufenthaltsbereich des an C61 befestigten Fluorophors dar. Nimmt man als sterische Einschränkung der Bewegung noch den Abstand von C61 von Aminosäure 273 aus der geschlossenen Kristallstruktur mit hinzu, so lässt sich der Aufenthaltsbereich des Fluorophors mit der gelben Fläche begrenzen.

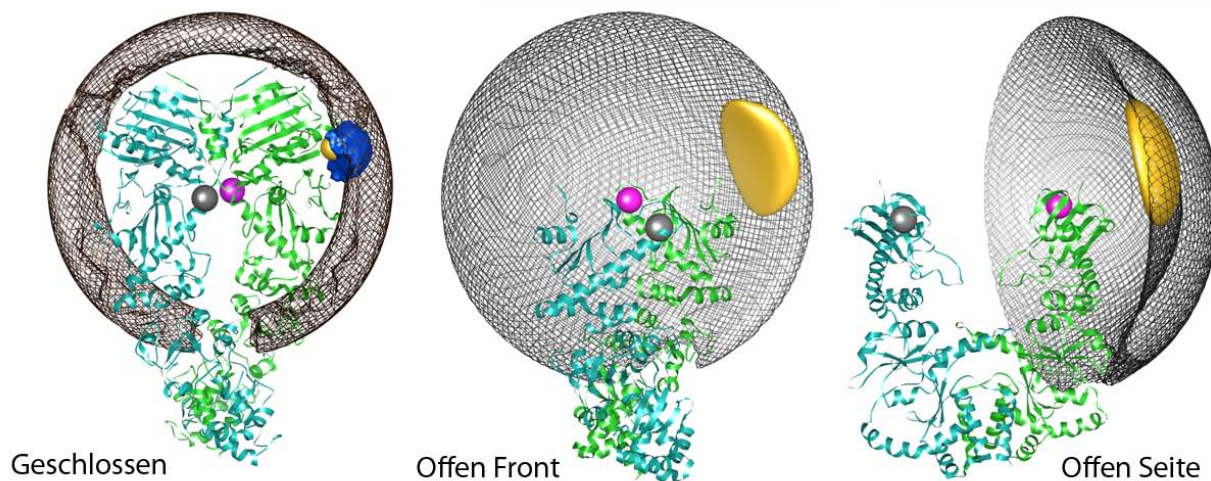


Abbildung 4.10: Rekonstruktion der Bewegung der N-Domäne vom geschlossenen Zustand (links) in den offenen (mitte, rechts). Als graue Kugel ist C385 Intermonomer und als lila Kugel Intramonomer markiert. Die Gittersphäre (links, mitte, rechts) stellt den Abstand des an C61 (gelbe Kugel, links) befestigten Fluorophores von C385 (Intramonomer) dar. Die blaue Wahrscheinlichkeitsverteilung berücksichtigt zusätzlich die Restriktionen der Kristallstruktur. Im offenen Zustand ist der Abstand aus den FRET-Effizienzen als Gittersphäre dargestellt. Nimmt man die sterischen Einschränkungen von C61 hinzu, so ist der dem Fluorophor zugängliche Bereich die gelbe Fläche.

4.3.2 Positionen der N-Domänen relativ zueinander

Die Erkenntnisse aus den Messungen, in denen die Aminosäuren C109 und C179 mit einem FRET-Paar markiert waren, lassen sich in äquivalenter Weise interpretieren. Hierbei kommt jedoch als Schwierigkeit hinzu, dass sich beide Aminosäuren in der N-Domäne befinden, die in der offenen Kristallstruktur nicht aufgelöst ist. Im linken Teil von Abb.4.11 ist die geschlossene Kristallstruktur mit C109 als gelbe Kugel dargestellt. Die Gittersphäre stellt den aus der FRET-Effizienz errechneten Bereich dar. Die blaue Fläche begrenzt den Aufenthaltsbereich von C179 inklusive des Fehlers des Linkers und der Größe des Fluorophores. Es ist ersichtlich, dass sich die blaue Fläche und die Gittersphäre überschneiden und somit die FRET-Effizienz im geschlossenen Zustand mit der Kristallstruktur in Einklang zu bringen ist. Im rechten Teil der Abbildung sind die Ankerpunkt-Aminosäuren 273 in beiden Ketten als graue Kugeln markiert. Um eine dieser Kugeln ist eine gelbe Sphäre mit einem Radius von 3,2 nm angetragen. Diese repräsentiert die sterischen Einschränkungen von C179, die sich aus dem Abstand von Aminosäure 273 in der geschlossenen Kristallstruktur ergeben. Um die andere graue Kugel ist eine blaue Sphäre mit einem Radius von 2,9 nm angetragen, die die sterischen Einschränkungen von C109 darstellt. Auf die blaue Sphäre ist eine sterisch mögliche, neutrale Position von C109 als gelbe Kugel angetragen. Diese neutrale Position entspricht einer nicht-extremalen Drehung der N-Domäne. Um diese ist eine Sphäre von 8,1 nm gezogen, die den aus den FRET-Effizienzen errechneten Abstand der beiden Fluorophore repräsentiert. Man erkennt, dass sich C109 und C179 nicht maximal voneinander entfernen, da schon eine, hier angetragene, neutrale Stellung von C109 nur einen Teil der Bewegungssphäre von C179 zulässt. Sämtliche hier verwendete Abstände sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Wie oben beschrieben, scheint sich der Abstand von C61 zu C385 zu maximieren. Die Analyse des Abstands von C109 zu C179 in der geöffneten Konformation zeigt, dass nicht der maximal sterisch mögliche Abstand eingenommen wird. Durch die in Abb.4.9 ersichtliche Drehung der M-Domänen würden sich starr fixierte N-Domänen so drehen, dass sich C61 und C385 näher kommen würden. Gleichzeitig würden sich C109 und C179 voneinander entfernen. Eine zusätzliche Drehung der N-Domäne um 90° würde die aus den FRET-Effizienzen berechneten Abstände erklären. Der Vergleich mit dem bakteriellen Homolog HtpG, von dem eine vollständige Kristallstruktur im offenen Zustand bekannt ist, legt diesen Schluss nahe.[16]

4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die smFRET-Kurven von an unterschiedlichen Positionen mit einem FRET-Paar markierten Hsp90-Mutanten charakterisiert. Die unterscheidbaren FRET-Niveaus ließen eine strukturelle Interpretation der Konformationen auf Grundlage der Kristallstruktur zu. Dabei konnte gezeigt werden, dass die gemessenen, geschlossenen Positionen der FRET-Paare mit den aus der Kristallstruktur bestimmten Positionen übereinstimmen. Aus den Abständen der Fluorophore in den geöffneten Konformationen konnte die Posi-

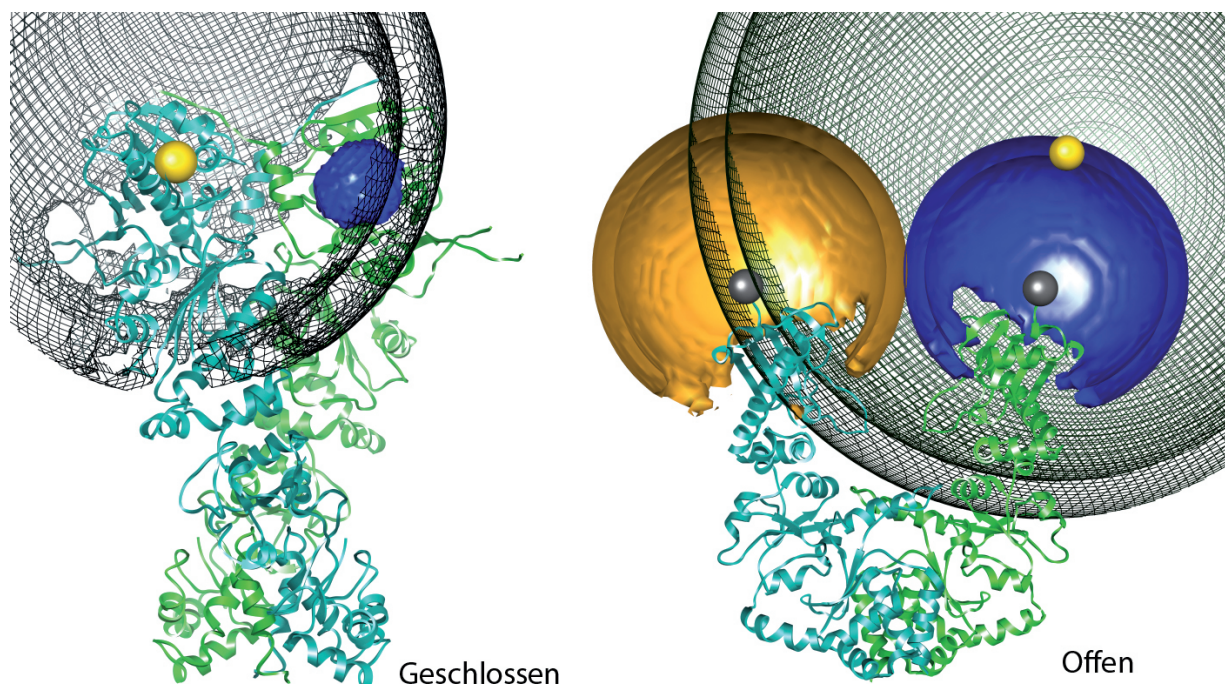


Abbildung 4.11: Bewegung der N-Domänen gegeneinander. Links: Im geschlossenen Zustand bezeichnet die FRET-Effizienz eine Gittersphäre um C109 (gelbe Kugel). Den Bereich von C179 mit Fehler gibt die blaue Fläche an. Rechts: Im offenen Zustand beschränkt der Abstand von Aminosäure 273 (graue Kugeln) die Bewegung von C109 (blaue Sphäre) und C179 (gelbe Sphäre). Um eine neutrale Position auf dieser Sphäre (gelbe Kugel) ist der FRET-Abstand als Gittersphäre angetragen. C109 und C179 entfernen sich nicht maximal voneinander.

Aminosäurepaar	KS(offen)	FRET(offen)	KS (geschlossen)	FRET (geschlossen)
61-385	7,4 ¹	8,3	4,2	5,2
109-179	12,9 ¹	8,1	3,6	4,9
61-385 ²	4,8 ¹	5,0	3,9	5,0
273-273	6,8		5,6	
273-61 ²			1,8	
273-109 ²			2,9	
273-179 ²			3,2	
273-385			5,6	
273-385 ²			3,0	

Tabelle 4.2: Tabelle der verwendeten Abstände aus der Kristallstruktur (KS) und den FRET-Effizienzen in nm. Mit ¹ versehene Werte sind maximale Abstände aus der Rekonstruktion der geschlossenen und offenen Struktur. Die mit ² versehenen Abstände sind innerhalb desselben Monomers.

tion der N-Domänen eingegrenzt werden. Die Messung einer Mutante, bei der innerhalb desselben Monomers N- und M-Domäne markiert waren, zeigte, dass sich die N-Domäne im Bereich der Zeitauflösung nicht von der M-Domäne löst.

Kapitel 5

Kinetik des Hsp90-Zyklus aus den smFRET-Kurven

Die Kinetik des ATPase-Zyklus spielt eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Funktion von Hsp90.[11] Es wurde gezeigt, dass die ATPase-Rate unter bestimmten Umständen stark beschleunigt wird. So ist die ATPase-Rate von Hsp90 bei einer Temperatur von 44°C fünfzig mal schneller als bei 17°C.[44] Die Zugabe des Stereoid-Hormon-Rezeptors, der von Hsp90 gebunden und aktiviert wird, beschleunigt die ATPaserate von humanem Hsp90 um einen Faktor Zweihundert. Die Ergebnisse der Ensemble-Messungen bezüglich der komplexen Kinetik des ATPase-Zyklus wurden in Abschnitt 1.4 umrissen. Der statistische Charakter dieser Ensemble-Messungen macht es unmöglich, sämtliche beobachteten Moleküle zu synchronisieren. Außerdem lassen sich zwei unterschiedliche Prozesse, die sich auf ähnlichen Zeitskalen abspielen, nicht ohne weiteres voneinander trennen. Deshalb ist immer ein erheblicher Interpretationsaufwand nötig, um die einzelnen Ratenkonstanten aus den Ergebnissen zu extrahieren. Da in smFRET-Experimenten einzelne Moleküle beobachtet werden können, ist diese Methode sehr gut geeignet, um die Kinetik des ATPase-Zyklus von Hsp90 zu untersuchen. Aus diesem Grund wird im Folgenden der zeitliche Verlauf der Einzelmolekülkurven analysiert und ein Modell für die zugrunde liegende Kinetik aufgestellt.

5.1 Kinetik der einzelnen Hsp90-Moleküle

Durch ihre Fixierung an der Oberfläche war es möglich, einzelne Hsp90-Moleküle bis zu zehn Minuten lang zu beobachten. Aus dem dabei aufgezeichneten zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität in Donor- und Akzeptorkanal und der daraus errechneten FRET-Effizienz konnten in Kapitel 4 Rückschlüsse auf die Positionen von N- und M-Domäne in der offenen und der geschlossenen Konformationen gezogen werden. Dabei stellte sich heraus, dass die beobachteten FRET-Effizienzen mit den aus der Kristallstruktur postulierten Konformationen in Übereinstimmung zu bringen sind. In den smFRET-Kurven ist neben der Abstandsinformation der Fluorophore auch die zeitliche Veränderung dieser Abstände

enthalten. Da die Fluorophore an definierten Stellen der N- und M-Domäne befestigt waren, lassen sich aus dem zeitlichen Verlauf kinetische Aussagen über die Bewegung der Domänen von Hsp90 während seines ATPase-Zyklus treffen.

Da die Verteilung der FRET-Effizienzen in Abb.4.2 zwei deutlich separierte Populationen aufweist, kann als einfaches und objektives Kriterium ein Schwellenwert von 0,48 festgelegt werden. Über diesem wird die FRET-Effizienz zu der Population mit hohem FRET gezählt und gilt somit als geschlossen. Analog zählen FRET-Effizienzen unterhalb des Schwellenwertes zu der Population mit niedrigem FRET und werden als offen gewertet. Somit lassen sich Ereignisse definieren, an denen sich die Positionen der Fluorophore zueinander, und damit auch der Domänen des Hsp90-Moleküls, an dem diese befestigt sind, ändern (rote senkrechte Striche in der FRET-Effizienz in Abb.5.1). Zwischen den Ereignissen verweilt das Protein in der jeweiligen Konformation. Um Artefakte durch diese Art der Auswertung zu minimieren, wurden nur Zeiten, die größer als das Messintervall von einer Sekunde waren, gewertet.

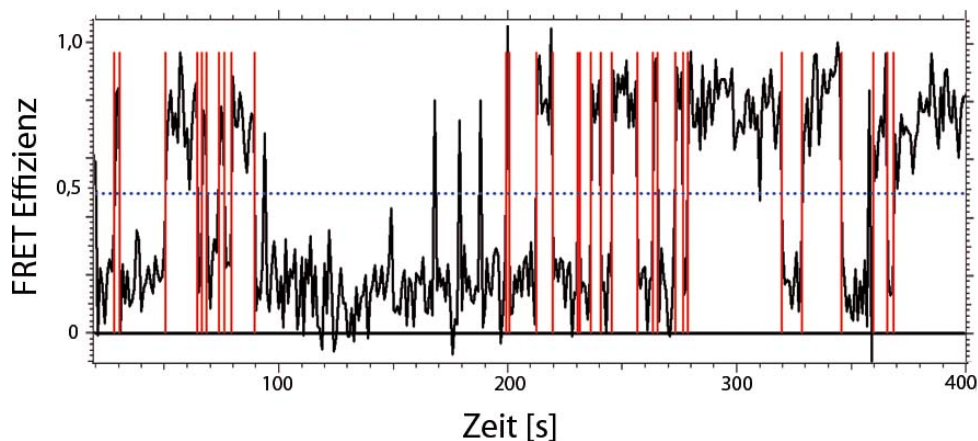


Abbildung 5.1: Die errechnete FRET-Effizienz einer exemplarischen smFRET-Kurve (schwarz). Die Unterscheidung von offenem und geschlossenem Zustand erfolgte über Anlegen eines Schwellenwertes (blau gestrichelt). Von der Auswerterroutine wurden die Zeitpunkte des Öffnen/Schließens erkannt (rote vertikale Striche). Verweildauern mit einer vergleichbaren Zeit wie das Messintervall (i.d.R. 1 s) wurden nicht in die Auswertung einbezogen (z.B. bei 170 s, 180 s, 190 s und 310 s)

5.2 Verteilung der Verweildauern

Die Verteilung der Verweildauern in beiden Konformationen in Anwesenheit von 2 mM ATP ist in Abb.5.2 aufgetragen. Hierbei wurde die Darstellungsform des integrierten Histogramms gewählt, da diese keinen Informationsverlust durch Zusammenfassen der Daten in „bins“ aufweist.[80][81] Neben diesen Messungen wurde noch in Anwesenheit von 2 mM ATP- γ -S und ohne Nukleotid gemessen. In beiden Fällen wurden Konformationsänderungen beobachtet.

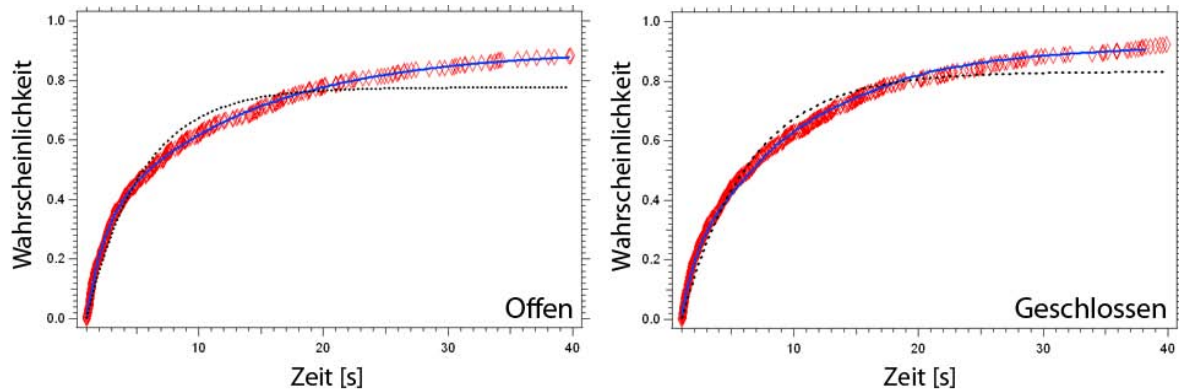


Abbildung 5.2: Mit roten Karos ist die Integrierte Verteilung der Verweildauer im offenen (links) und geschlossenen Zustand (rechts) dargestellt. Diese wurden mit einer einfach-exponentiellen Kurve gefittet (schwarz gestrichelt). Die doppelt-exponentielle Kurve fittet die Verteilung deutlich besser.

Ein Zwei-Zustands-System mit den beiden Zuständen Offen und Geschlossen würde zu einer einfach-exponentiellen Verteilung der Verweildauern führen (vergl. Gleichungen 3.26 und 3.27). Die best-mögliche Repräsentation der Verteilung mit einer einfach-exponentiellen Funktion ist in Abb.5.2 als schwarze gestrichelte Kurve dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Verteilung nur sehr schlecht angenähert wird. Hingegen repräsentiert eine doppelt-exponentielle Kurve die Verteilung deutlich besser. Das Chi-Quadrat ist um einen Faktor 57 (geschlossen) bzw. 45 (offen) besser.[82] Doppelt-exponentielle Verteilungen von Verweildauern wurden unter Anderem auch bei Myosin V beobachtet, welche durch die analytische Beschreibung eines Drei-Zustandsmodells erklärt werden konnten.[80] Die Verteilungen von Hsp90 sind jedoch qualitativ verschieden von den Verteilungen von Myosin V. Als minimales chemo-mechanisches Modell für den Hsp90-Zyklus wurde daher ein Modell mit vier Zuständen angenommen. Eine analytische Lösung für ein solches Modell ist in Anhang C gegeben. Allerdings ist die Lösung ausgesprochen unhandlich, sie ist unpraktisch an die Kurven zu fitten. Aus diesem Grund wurde das System mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation nachgestellt.

5.3 Monte-Carlo-Simulation

Um den Verlauf komplexer biochemischer Reaktionsnetzwerke numerisch zu analysieren, existiert seit langem das Werkzeug der kinetischen Monte-Carlo-Simulation.[83][84] Dabei wird der statistische Charakter des Übergangs von einem Zustand in zugängliche Nachbarzustände (wie in Abschnitt 3.3 theoretisch behandelt) mit Hilfe von Zufallszahlen simuliert. Für große Reaktionsnetzwerke mit vielen tausend Proteinen und entsprechend vielen Zuständen ist die kinetische Monte-Carlo-Simulation im wesentlichen durch die Leistungsfähigkeit moderner Computer beschränkt. Es sollte also möglich sein, die Hsp90-Kinetik mit vier Zuständen mithilfe der Monte-Carlo-Simulation nachzustellen.

5.3.1 SmFRET-Kurven aus der Monte-Carlo-Simulation

Um das Experiment nachzustellen, wurde eine smFRET-Kurve simuliert. Die Details sind in Abschnitt 2.4 ausgeführt. Ein Ausschnitt aus dieser Kurve ist in Abb.5.3 dargestellt. Vergleicht man die Kurve mit der experimentellen Kurve im unteren Teil von Abb.4.1, so erkennt man die Ähnlichkeit der beiden Kurven. Die Kurven waren $5 \cdot 10^7$ Punkte lang und hatten ein Δt von 50 ms. Damit ergab sich eine Messdauer von $2,5 \cdot 10^6$ s. Bei einer durchschnittlichen Messdauer von ca. 200 s in den smFRET-Experimenten entspricht diese Monte-Carlo-Kurve 10^4 experimentellen Messkurven mit ca. 10^5 Konformationsänderungen. Die in den Monte-Carlo-Simulationen direkt zugänglichen Verweildauern im offenen und geschlossenen Zustand werden ebenfalls in ein integriertes Histogramm aufgetragen und normiert.

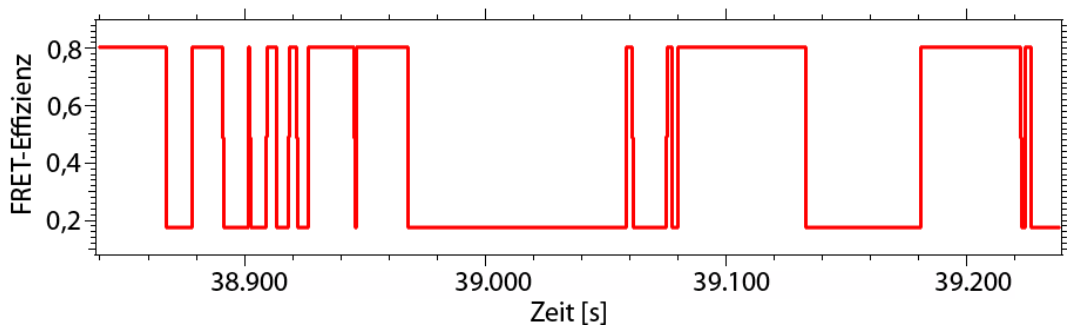


Abbildung 5.3: Ausschnitt aus der smFRET-Kurve aus der Monte-Carlo-Simulation. Die Parameter wurden so gewählt, dass die simulierte Kurve den experimentellen Kurve entsprach.

Die Monte-Carlo-Simulation stellt ein System mit vier Zuständen nach, von denen Übergänge in jeweils benachbarte Zustände möglich waren. Dieses System ist schematisch in Abb.5.4 dargestellt. Es werden zwei offene und zwei geschlossene Zustände angenommen. Dabei führen nur die Übergänge mit den Ratenkonstanten $k_{\pm 0}$ und $k_{\pm 2}$ zu Änderungen in der FRET-Effizienz.

Als Ausgangswert für die Monte-Carlo-Simulation dienten die Zerfallsraten der doppelt-exponentiellen Funktion wie oben beschrieben. Diese sind allerdings eine Summe der Raten $k_{\pm 1}$ und $k_{\pm 3}$, die Übergänge zwischen den beiden geschlossenen bzw. offenen Zustände beschreiben, und der Raten $k_{\pm 0}$ und $k_{\pm 2}$, der Übergänge zwischen den offenen und geschlossenen Zuständen. Aus diesem Grund wurden diese nachher ebenfalls variiert.

Nun wurden die vier Vorwärts- und vier Rückwärtsratenkonstanten des Modells so angepasst, dass die Abweichung der Verteilung der Monte-Carlo-Simulation von der experimentellen möglichst gering war. Im oberen Teil der Abb.5.5 ist exemplarisch die Verteilung der Verweildauer im offenen Zustand in Anwesenheit von 2 mM ATP (rote Karos) mit einer guten (schwarze Linie) und einer schlechten Reproduktion (blau gestrichelt) durch den Monte-Carlo-Simulationen dargestellt. Die Abweichung der simulierten Verteilung von der experimentellen ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Besonders wurde darauf geachtet, dass die Verteilung bei den kurzen Zeiten gut reproduziert wurde, da hier die meisten Datenpunkte liegen und sie damit höher gewichtet sind. Als weiteres Kriterium

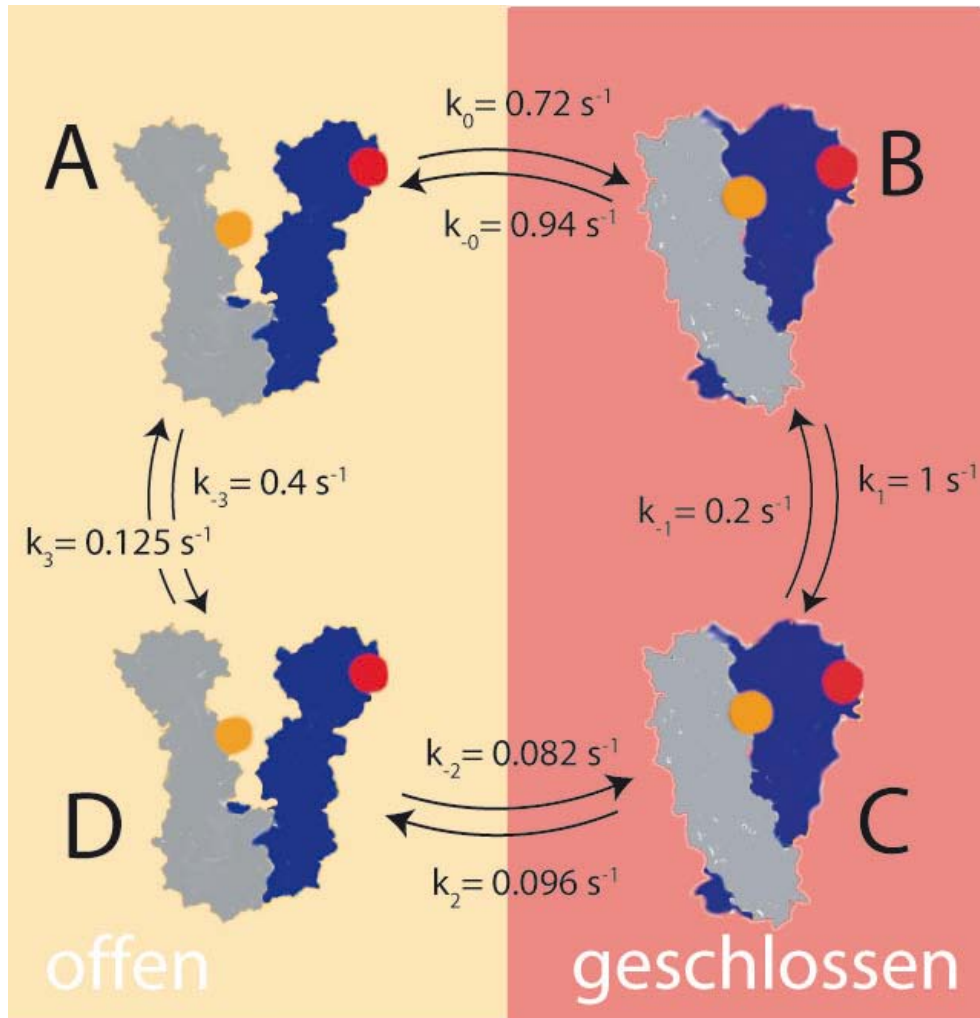


Abbildung 5.4: Chemo-mechanischer ATPase-Zyklus von Hsp90. Die Aminosäuren 61 und 385 sind als rote bzw. orange Kugeln dargestellt. Es wurden zwei offene und zwei geschlossene Zustände angenommen. Angetragen sind die Ratenkonstanten in Anwesenheit von 2 mM ATP aus der Monte-Carlo-Simulation.

für die Güte der Simulation musste die ATPase-Rate unter den entsprechenden Nukleotidbedingungen möglichst gut mit den Raten aus den Ensemble-Messungen übereinstimmen.

5.3.2 ATPase-Raten in den Monte-Carlo-Simulationen

Ein wichtiges Kriterium bei der Monte-Carlo-Simulation war die ATPase-Rate von Hsp90 aus Ensemble-Messungen. Bei den Messungen konnten jedoch nur mechanische Konformationsänderungen des Moleküls beobachtet werden. Es war also nicht möglich zu bestimmen, wann ATP gebunden, hydrolysiert und wieder freigesetzt wurde. Um eine Verbindung zu den Ensemble-Messungen herzustellen, wurde in der Simulation eine ATPase-Rate festgelegt. Das war die Zeit, die das Molekül benötigt, um einmal den Zyklus zu durchlaufen. Die Ratenkonstanten wurden so gewählt, dass sie mit der aus den Ensemble-Messungen

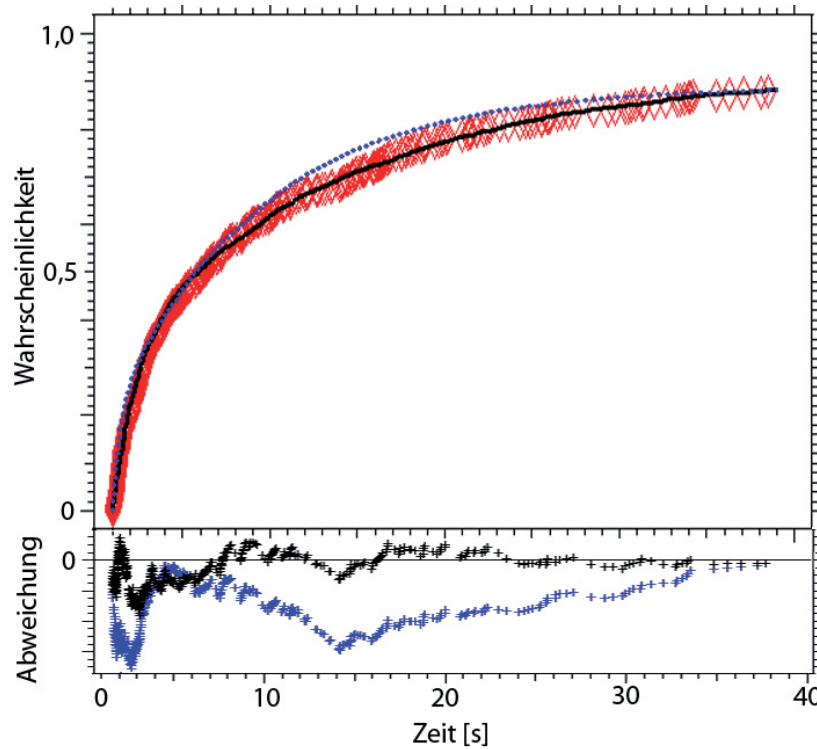


Abbildung 5.5: Oben: Verweildauerverteilung im offenen Zustands mit 2 mM ATP (rote Karos). Die Parameter für die Monte-Carlo-Simulation wurden so gewählt, dass die entstandenen Verteilungen möglichst wenig von der experimentellen Verteilung abweichen (schwarze Linie). Ein Beispiel schlechter Repräsentierung zeigt die blaue gestrichelte Kurve. Unten: die Abweichung der Monte-Carlo-Verteilung von der experimentellen Kurve.

bekanntes Rate in Übereinstimmung gebracht werden konnten. Die ATPase-Raten aus den Ensemble-Messungen und die Raten aus den Monte-Carlo-Simulationen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Da der in Anhang A.2 beschriebene Test zur Bestimmung der ATPase-Rate auf der Regeneration von ADP zu ATP basiert, konnte er auch für die Bestimmung der Rate mit der ATP- γ -S umgesetzt wird verwendet werden. Die ATPase-Rate für ATP war $\approx 1/\text{min}$ bei einer Temperatur von 30°C , bei der auch alle smFRET-Experimente durchgeführt wurden. Die Rate, mit der ATP- γ -S umgesetzt wird, ist um einen Faktor acht langsamer.[27][44] Für die Experimente ohne ATP konnte keine sinnvolle Ensemble-ATPase-Rate bestimmt werden. In den Monte-Carlo-Simulationen wurde ebenfalls ein Umlauf als ATPase-Rate gewertet. Dieser erfolgte ohne ATP einen Faktor Hundert langsamer als mit ATP.

5.4 Verweildauerverteilungen

Die durch Monte-Carlo-Simulation reproduzierten Verweildauerverteilungen für die unterschiedlichen Nukleotidbedingungen sind zusammen mit den entsprechenden experimentellen

Nukleotid	Ensemble	Simulation
ATP	60 s	80s
ATP- γ -S	480 s	700 s
ohne Nukleotid	nicht messbar	8000 s

Tabelle 5.1: Vergleich der Zeiten, die Hsp90 benötigt, einen vollen Zyklus zu durchlaufen, aus Ensemble-Messungen und aus der Monte-Carlo-Simulation.

len Verteilungen in Abb.5.6 dargestellt. Zusätzlich sind die Abweichungen der Verteilung aus der Simulation von den experimentellen Verteilungen angegeben. Man erkennt eine gute Übereinstimmung der Verteilungen mit ihren jeweiligen Monte-Carlo-Simulationen. Als zusätzliches Kriterium wurde die ATPase-Rate aus den Simulationen mit der Rate aus den Ensemble-Messungen verglichen (s. auch Abschnitt 5.3.2). Die Ratenkonstanten, die in den Monte-Carlo-Simulationen die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Verteilungen ergaben, wurden in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

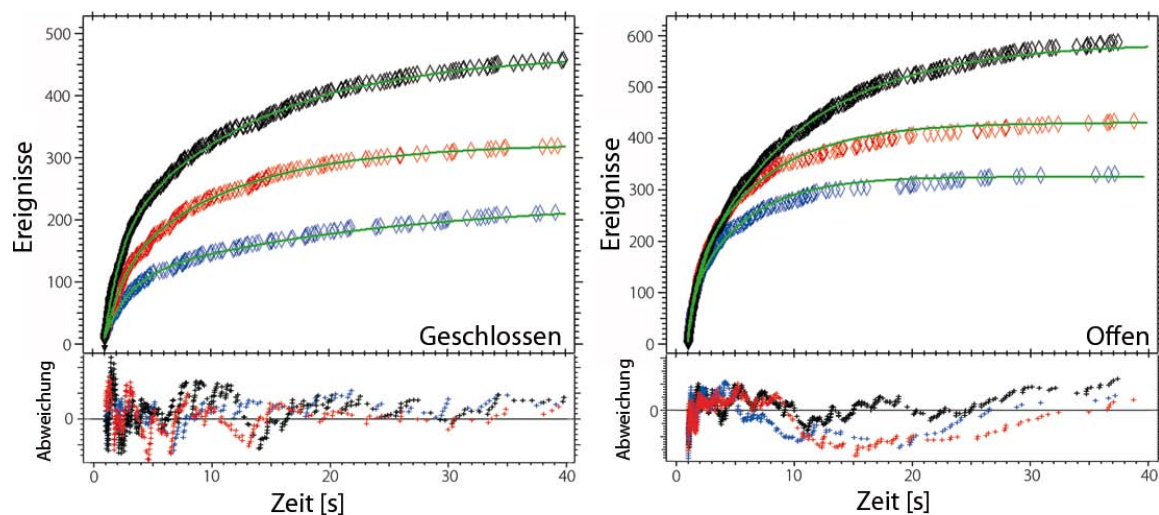


Abbildung 5.6: Integrale Verweildauerverteilung im offenen (links) und im geschlossenen Zustand (rechts). Die experimentellen Verteilungen sind als Karos dargestellt: 2 mM ATP (schwarz), 2 mM ATP- γ -S (rot) und ohne Nukleotid (blau). Dazu jeweils die am Besten passenden Monte-Carlo-Simulationen (grün) und die Abweichung von den Messdaten (unten).

Zusammen mit dem Fehler sind sie graphisch in Abb.5.7 dargestellt. Die Fehler wurden, wie in Abb.5.5 angedeutet, bestimmt. Dabei sind die Fehler für die schnellen Ratenkonstanten ($k_{\pm 0}, k_{\pm 2}$) kleiner als für die langsameren. Dies folgt aus der Lösung der gekoppelten Differentialgleichungen. Die Lösung sind die Eigenwerte der Matrix des Gleichungssystems Gl.C.1-Gl.C.4, von denen die größten die Lösung dominieren und folglich den kleineren Fehler haben.[85] In die Verteilungen mit ATP gingen 261 Kurven ein (ATP- γ -S: 132, ohne Nukleotid: 131). Dabei wurden 507 Verweildauern im offenen Zustand (ATP- γ -S: 331, ohne Nukleotid: 221) und 624 Verweildauern im geschlossenen Zustand berücksichtigt

(ATP- γ -S: 447, ohne Nukleotid: 340).

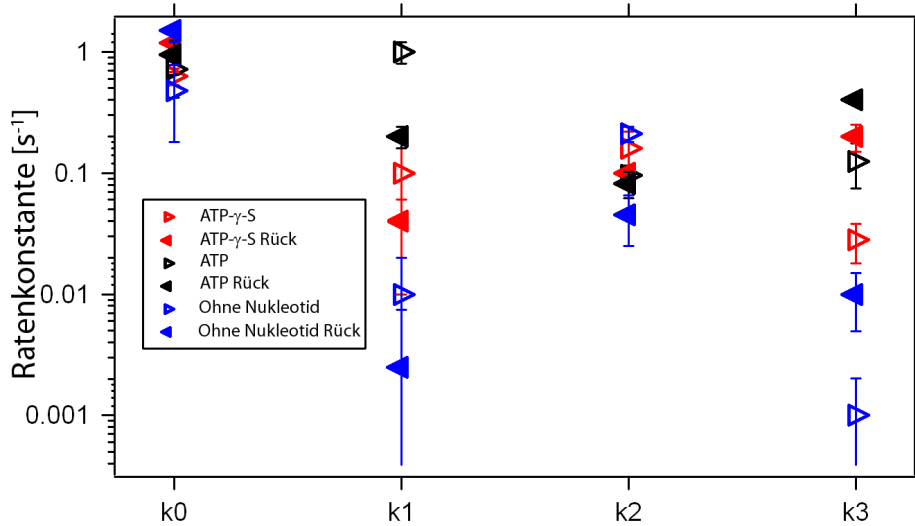


Abbildung 5.7: Alle acht Ratenkonstanten des Vier-Zustands-Modells des ATPase-Zyklus von Hsp90. Die Fehlerbalken geben die Empfindlichkeit der Simulation auf Veränderungen der Ratenkonstanten an.

	ATP	ATP- γ -S	ohne Nukleotid
k_0	$0,72 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,3$
k_{-0}	$0,94 \pm 0,3$	$1,18 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,3$
k_1	$0,8 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,09$	$0,01 \pm 0,01$
k_{-1}	$0,16 \pm 0,04$	$0,04 \pm 0,02$	$0,0025 \pm 0,005$
k_2	$0,096 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,03$
k_{-2}	$0,082 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,01$	$0,045 \pm 0,02$
k_3	$0,4 \pm 0,05$	$0,028 \pm 0,01$	$0,001 \pm 0,001$
k_{-3}	$0,1 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,005$

Tabelle 5.2: Vergleich der Ratenkonstanten des Hsp90-Zyklus. Die Fehler geben die Güte der Monte-Carlo-Simulation an.

5.5 Population der Zustände im Zyklus

In den Monte-Carlo-Simulationen ist die Population der Zustände A, B, C und D direkt zugänglich. Deren Verteilung ist in Abb.5.8 dargestellt. Dabei ist erkenntlich, dass vor allem ohne Nukleotid eine Häufung der offenen Zustände A und D auftritt. Mit ATP- γ -S werden die geschlossenen Zustände etwas weniger stark populiert als mit ATP, jedoch stärker als ohne Nukleotid.

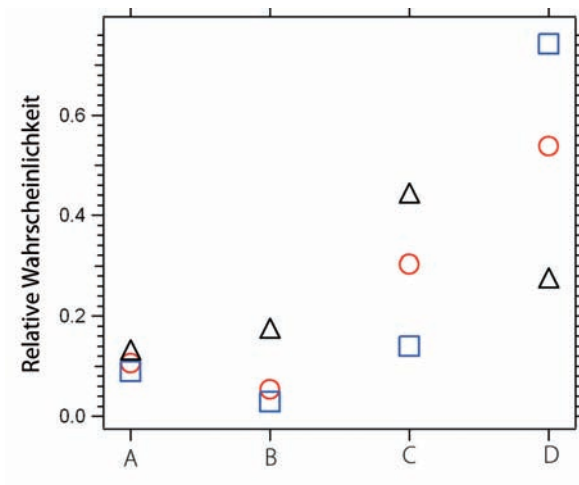


Abbildung 5.8: Population der Zustände in der Monte-Carlo-Simulation: ATP (schwarz), ATP- γ -S (rot) und ohne Nukleotid (blau). Es tritt vor allem ohne Nukleotid eine Häufung der offenen Zustände auf.

5.6 Autokorrelation der Kurven

In dem hier verwendeten Vier-Zustands-Modell bestimmen die Ratenkonstanten $k_{\pm 1}$ und $k_{\pm 3}$ die Häufigkeit der Abfolge von kurzen Verweildauern im offenen Zustand A auf kurze Verweildauern im geschlossenen Zustand B (mit $k_{\pm 0}$) und von langen Verweildauern im offenen Zustand D auf lange Verweildauern im geschlossenen Zustand C (mit $k_{\pm 2}$). Da diese Ratenkonstanten auch diejenigen sind, die am meisten von den Nukleotiden beeinflusst werden, sollte eine solche Häufung erkenntlich sein. Um das zu untersuchen, wurde eine Analyse mit Hilfe der Autokorrelation durchgeführt. Die Autokorrelation ist ein mächtiges mathematisches Instrument aus der Statistik und Signalverarbeitung.[86] In Einzelmolekülexperimenten wird sie vor allem benutzt, um die Daten von konfokalen Fluoreszenzmikroskopen zu analysieren.[87][88][89] Weist eine Signalkurve $E(t)$ ein Signal auf, welches periodisch im Abstand von Δt wiederkehrt, so hat die Autokorrelation der Kurve bei Δt ein Extremum. Die Autokorrelation $\xi(\Delta t)$ einer Signalkurve $E(t)$ errechnet sich nach

$$\xi(\Delta t) = \int_0^{\infty} E(t) \cdot E(t + \Delta t) dt. \quad (5.1)$$

Damit hat z.B. die Autokorrelation eines verrauschten sinus-förmigen Signals Maxima bei geraden ganzzahligen Vielfachen von π und Minima bei ungeraden ganzzahligen Vielfachen. Die Fourier-Transformierte dieser Autokorrelationsfunktion hat ein Maximum bei der Frequenz der Sinus-Schwingung $1/2\pi$.

Fügt man nun sämtliche smFRET-Kurven zu einer Kurve $E(t)$ zusammen, so zeigt die Autokorrelation die am häufigsten auftretenden Zeitintervalle von Konformationsänderungen. Die Fourier-Transformierte dieser Autokorrelationsfunktion sollte im Falle der oben angesprochenen Häufung von kurzen auf kurze oder langen auf lange Zeitintervalle ein Maximum bei den entsprechenden Frequenzen haben. In Abb.5.9 ist diese zusammen mit den

Raten k_1 , k_2 und k_3 in Anwesenheit von ATP- γ -S dargestellt. Es lässt sich keine Häufung bei bestimmten Ratenkonstanten erkennen.

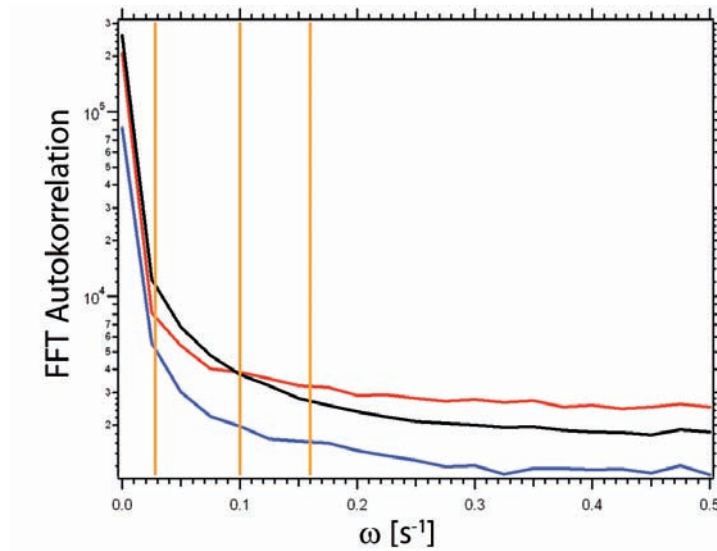


Abbildung 5.9: Fourier-Transformierte der Autokorrelation der smFRET-Kurven ohne ATP (blau), ATP- γ -S (rot) und 2 mM ATP (schwarz). Zusätzlich sind die Raten k_1 , k_2 und k_3 in Anwesenheit von ATP- γ -S angetragen (orange). Es ist keine Häufung bei bestimmten Ratenkonstanten ersichtlich.

5.7 Kinetik der N-Domänen

Aus den smFRET-Kurven der Hsp90 Mutante, welche mit einem FRET-Paar an den Aminosäuren 109 und 179 der N-Domäne markiert war, wurden nun, wie oben beschrieben, die Verweildauern in den Zuständen mit niedrigen FRET und dem mit hohen FRET in Anwesenheit von 2 mM ATP bestimmt. Auf Grund der Messungen mit dem Intramonomer FRET-Paar zusammen mit dem Intermonomer FRET-Paar ist die gleiche Kinetik der nur an den N-Domänen markierten Mutante zu erwarten. Beide Verteilungen werden in Abb.5.10 verglichen. Man erkennt eine gute Übereinstimmung der beiden Verteilungen.

5.8 Messung in Anwesenheit von ADP

Um zu kontrollieren, ob die Verweildauern von ADP beeinflusst werden, wurden die Messungen an dem Heterodimer mit Coiled-Coil-Motiv, bei dem Aminosäure 61 und 385 mit einem FRET-Paar markiert waren, in Anwesenheit von 2 mM ADP durchgeführt. Da ADP keine Energie durch Hydrolyse freisetzen kann, wurde die gleiche Kinetik wie in Abwesenheit von Nukleotiden erwartet. Der Vergleich der Verteilungen der Verweildauern mit ADP und ohne Nukleotid ist in Abb.5.11 dargestellt. Man erkennt, dass die beiden Verteilungen gut übereinstimmen.

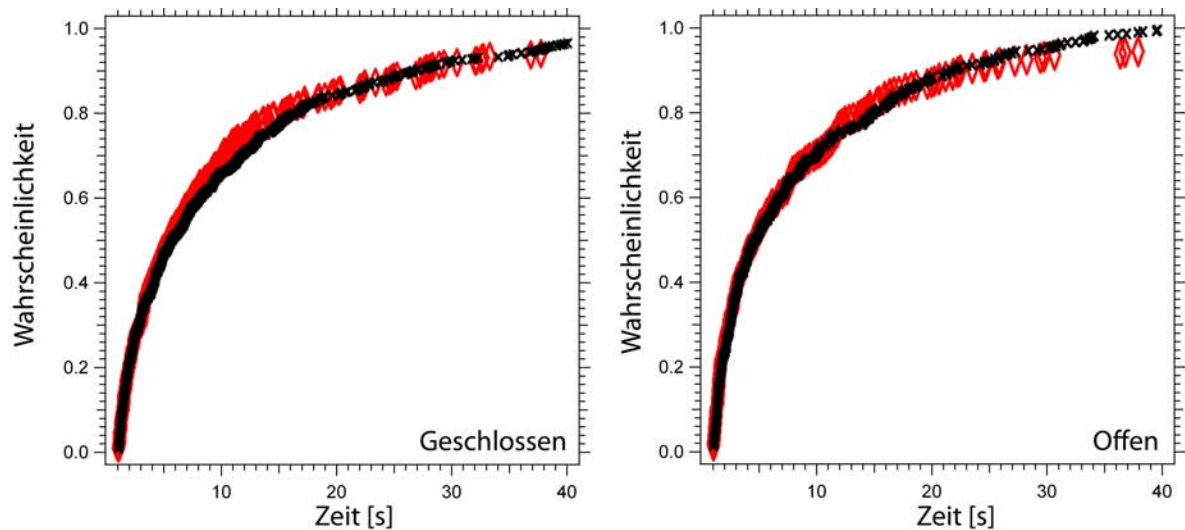


Abbildung 5.10: Verweildauerverteilungen der Bewegung der N-Domänen in Anwesenheit von 2 mM ATP (rote Karos). In die Verteilung der geschlossenen Zustände (links) und der offenen (rechts) wurde die Verteilung der N-M-Bewegung mit ATP eingetragen (schwarze Kreuze).

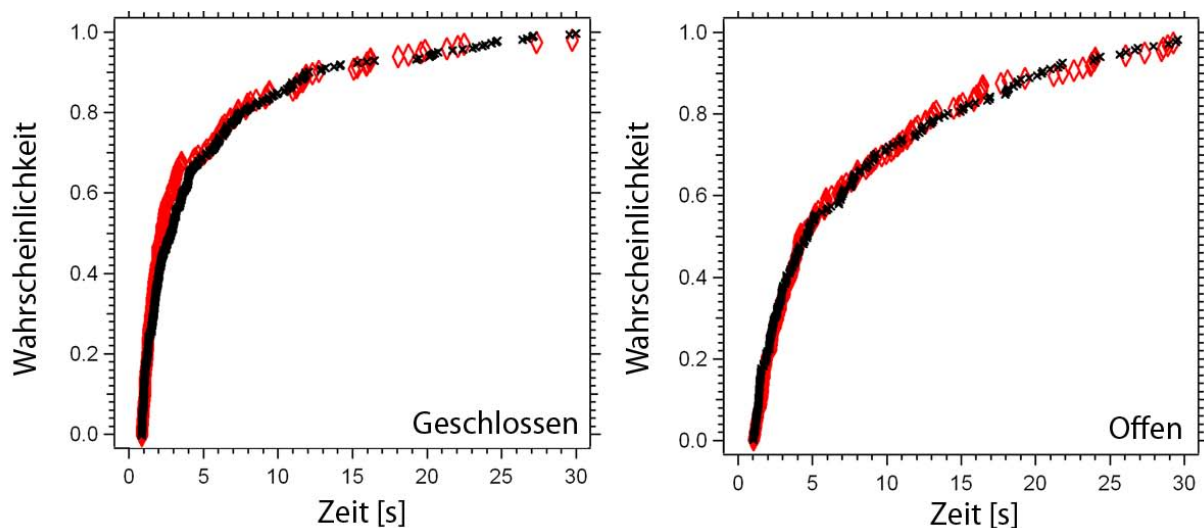


Abbildung 5.11: Verweildauer-Verteilungen in Anwesenheit von 2 mM ADP (rote Karos). Zum Vergleich ist die Verteilung ohne ATP angetragen (schwarze Kreuze). Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

5.9 Messungen mit AMP-PNP

Zur Kontrolle wurde die Messung auch mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen AMP-PNP (Adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphat) durchgeführt. Dieses bindet in die ATP-Tasche des Hsp90 und fängt es im geschlossenen Zustand ein.[4] Eine typische Kurve in Anwesenheit von AMP-PNP ist in Abb.5.12 dargestellt. Das Molekül ist zuerst in der

geöffneten Konformation, bindet dann AMP-PNP und schließt. In dieser Konformation verweilt Hsp90, bis zuerst das Akzeptorfluorophor und dann das Donorfluorophor bleichen. Die Detektion der Verweildauer des Moleküls im geschlossenen Zustand ist in den hier durchgeführten Experimenten nicht zugänglich.

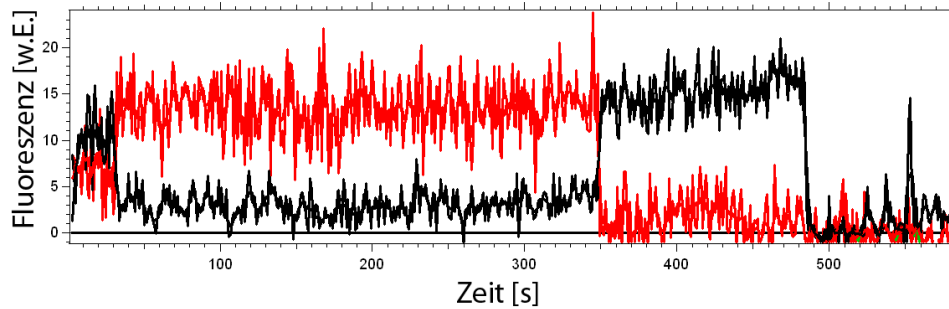


Abbildung 5.12: Kontrollmessung mit AMP-PNP. Die Hsp90-Moleküle befinden sich während der gesamten Messdauer im geschlossenen Zustand. Bei Sekunde 350 bleicht das Akzeptorfluorophor.

5.10 Messung ohne Coiled-Coil in Vesikeln

Die oben beschriebenen Messungen wurden wie erwähnt mit einer Hsp90-Mutante durchgeführt, an die C-terminal ein Coiled-Coil-Motiv angefügt war. Um sicherzustellen, dass diese Veränderung keinen wesentlichen Einfluss auf die hier beobachteten Konformationsänderungen hat, wurde die Messung in Anwesenheit von 2 mM ATP mit einer Hsp90-Mutante ohne Coiled-Coil-Motiv, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, in Vesikeln durchgeführt. Eine typische smFRET-Kurve zeigt Abb.5.13. Die Kurven zeigen einen Bereich, in dem ein deutlich von null verschiedenes Signal im Akzeptorkanal zu erkennen ist (in Abb.5.13 blau hinterlegt). Weiterhin erkennt man bei einigen Kurven einen Bereich, in dem der Energietransfer null ist. Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 6 kann man davon ausgehen, dass Hsp90 zu den Zeiten, zu denen ein Energieübertrag sichtbar ist, dimerisiert und zu den anderen Zeiten dissoziiert ist.

Wird nur die Zeit der smFRET-Kurven, während der das Molekül im dimerisierten Zustand vorliegt, ausgewertet, so ergibt sich eine Verteilung der Verweildauern, wie in Abb.5.14 dargestellt. Diese entspricht der Verteilung der Hsp90-Mutante mit Coiled-Coil-Motiv in Anwesenheit von 2 mM ATP.

5.11 Der chemomechanische Zyklus von Hsp90

Das Vier-Zustandsmodell, das die Ergebnisse gut beschreibt, ist in Abb.5.4 dargestellt. Auf Ensemble-Messungen basierende Modelle gehen davon aus, dass der Hsp90-Zyklus sich aus vier bis fünf unterscheidbaren Zuständen zusammensetzt.[14][15][16][17] Bei allen diesen Modellen wird ein irreversibler Schritt, in dem das ATP gespalten wird, angenommen.

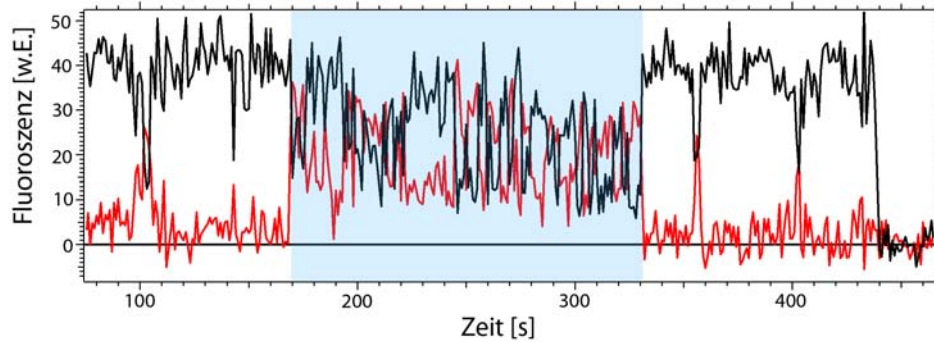


Abbildung 5.13: SmFRET-Kurve der Hsp90 Mutante ohne Coiled-Coil-Motiv, bei dem die Aminosäuren C61 und C385 mit einem FRET-Paar markiert waren. Die Kurven zeigen keinen qualitativen Unterschied zu den Kurven der Mutante mit Coiled-Coil-Motiv.

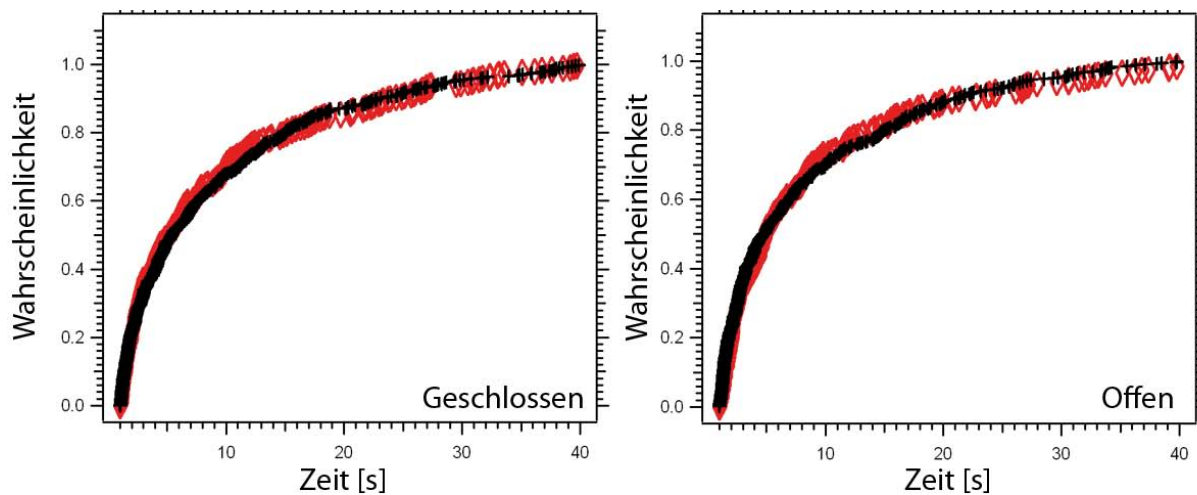


Abbildung 5.14: Verweildauerverteilung von Hsp90 ohne Coiled-Coil-Motiv in Anwesenheit von ATP (rote Karos). Die Verteilung unterscheidet sich nicht von der Verteilung der Mutante mit Coiled-Coil-Motiv in Anwesenheit von ATP (schwarze Kreuze).

Natürlich ist die ATP-Hydrolyse von Hsp90 auf den hier untersuchten Zeitskalen irreversibel, jedoch muss die Konformationsänderung, die mit der Hydrolyse einhergeht, nicht irreversibel sein. Die oben beschriebenen Experimente zeigen, dass Hsp90 auch ohne ATP in der Lage ist, den Zyklus zu durchlaufen, wenngleich auch viel seltener. Messungen, die mit SAXS und TEM am bakteriellen Hsp90-Homolog HtpG durchgeführt wurden, zeigen ebenfalls, dass in Lösung auch ohne Nukleotid mehrere Konformationen vorliegen.[90][91] Das hier vorgestellte Modell mit vier Zuständen impliziert, dass die Übergänge mit den Ratenkonstanten $k_{\pm 3}$ und $k_{\pm 1}$ keine großen Konformationsänderungen zur Folge haben. Das sind jedoch die Übergänge auf die veränderte Nukleotid-Bedingungen wie das nur langsamer hydrolysierbare ATP-Analog ATP- γ -S oder kein Nukleotid den größten Einfluss haben. Offensichtlich spielt die ATP-Hydrolyse und die Freisetzung der Produkte bei diesen Schritten die größte Rolle.

Der Einfluss der ATP-Hydrolyse auf mehrere Raten tritt auch bei anderen molekularen Maschinen wie Myosin auf. Bei diesem dient die ATP-Bindung der Dissoziation vom Aktinpolymer, auf dem es sich fortbewegt. Durch die ATP-Hydrolyse baut das Molekül eine Vorspannung im dissoziierten Zustand auf, wodurch es wieder an das Polymer binden kann. Dadurch wird das Phosphat aus der Bindetasche gedrückt und das ermöglicht den eigentlichen Arbeitsschritt, in dem das Myosin eine Kraft ausübt.[9]

Beim ATPase-Zyklus von Hsp90 erfolgt keine Translation oder Rotation wie bei anderen molekularen Maschinen. Die großen Bewegungen der Monomere dienen vielmehr dazu, Konformationsänderungen in Klientenproteinen herbeizuführen und diese so zu stabilisieren oder zu aktivieren.[3][92] Dabei muss das zwischen den N- und M-Domänen gebundene Klientenprotein beim Schließen des Hsp90-Dimers seine Position ändern. Dies könnte zu Konformationsänderungen in den Klientenproteinen führen, wie sie für die physiologische Funktion von Hsp90 nötig sind.[32] Analog zum Myosin könnten dabei die ATP-Hydrolyse und die Freisetzung von ADP und Phosphat unterschiedliche Rollen spielen.

5.12 Energielandschaft des ATPase-Zyklus

Wie in Abschnitt 3.3 ausgeführt, lassen sich die, aus den Einzelmolekül-Experimenten gewonnenen kinetischen Daten von Protein-Bewegungen direkt in Form einer Energielandschaft visualisieren. Dabei können molekulare Fluktuationen, die auf schnellen Zeitskalen ablaufen, mit der in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden Messmethode nicht aufgelöst werden. Diese wurden mit Hilfe der Molekular-Dynamik-Simulation untersucht.[93] Die aus der oben besprochenen Monte-Carlo-Simulation erhaltenen Ratenkonstanten wurden mit der Arrhenius-Gleichung 3.31 in eine Energielandschaft übersetzt. Dabei wurde als präexponentieller Faktor $\lambda \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ verwendet.[94][95] Die resultierende Energielandschaft unter dem Einfluss verschiedener Nukleotide ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Man erkennt, dass der Einfluss von ATP im Wesentlichen darin besteht, die Energiebarrieren zwischen Zustand B und C und die Barriere zwischen D und A' zu erniedrigen. Die absolute Barrierenhöhe ist abhängig von der Wahl des Anfangsniveaus und dem präexponentiellen Faktor λ . Änderungen der Raten sowie von λ gehen nur logarithmisch in die Höhe der

Energiebarriere ein.

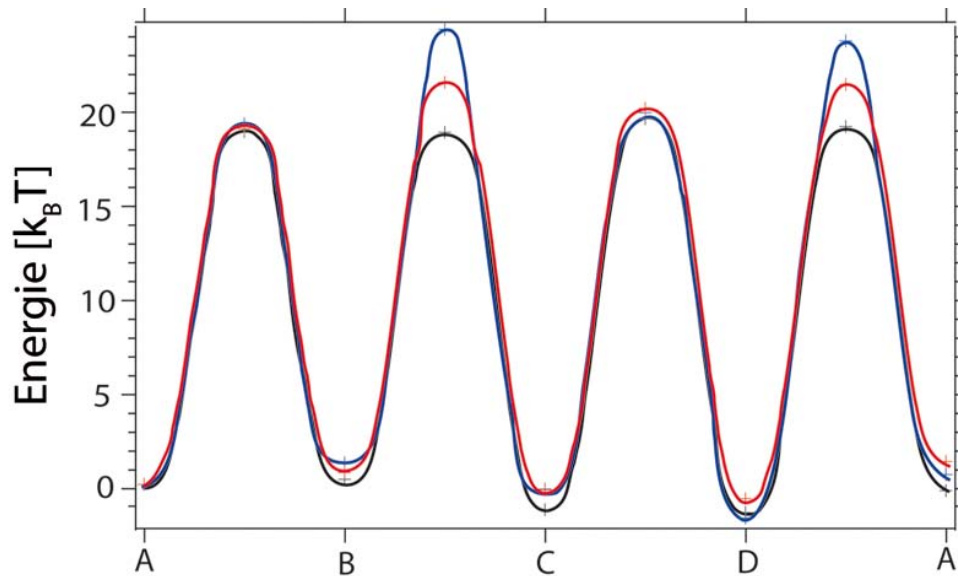


Abbildung 5.15: Energielandschaft des ATPase-Zyklus von Hsp90 in Anwesenheit von ATP (blau), ATP- γ -S (rot) und ohne Nukleotid (schwarz). Besonders stark erniedrigt werden die Barrieren zwischen den Zuständen B und C sowie D und A'.

5.13 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde aus den smFRET-Kurven die Kinetik der Domänenbewegung, die Hsp90 während seines ATPase-Zyklus ausübt, abgeleitet.[96] Die Verteilung der Verweildauer in der offenen und in der geschlossenen Konformation führte zur Annahme eines Vier-Zustands-Modells mit zwei geschlossenen und zwei offenen Zuständen. Es wurde mithilfe von Monte-Carlo-Simulationen nachgestellt, und die Ratenkonstanten wurden bestimmt. Die Messungen mit verschiedenen Konstrukten unter verschiedenen Nukleotid-Bedingungen festigen das Modell.

Kapitel 6

Dimerisierung von Hsp90

Die in den letzten beiden Kapiteln beschriebenen Messungen wurden mit der eigens dafür konstruierten Hsp90-Coiled-Coil-Chimäre durchgeführt. Das war notwendig, um bei den notwendigen Konzentrationen Hsp90-Dimere in ausreichender Zahl beobachten zu können. Des Weiteren konnte dadurch die Beobachtung auf die relative Bewegung der N-terminalen Domänen zueinander und relativ zu den Mitteldomänen eingeschränkt werden. Insbesondere die Dissoziation des Hsp90-Dimers konnte dadurch ausgeschlossen werden. Sie spielt eine wichtige Rolle wie Ensemble-Messungen nahelegen.[13][97]

6.1 Erkenntnisse aus Ensemblemessungen

Es ist bekannt, dass das Hsp90 Dimer mit einer Dissoziationskonstanten K_D von ca. 60 nM dimerisiert ist (siehe auch AnhangA.5). Diese entspricht dem Verhältnis aus der Dissoziationsrate k_{off} und Assoziationsrate k_{on} , wobei k_{off} unabhängig von der Konzentration ist und sich auf Grund der viel höheren k_{on} als der Austauschkonstanten gleich also $k_{off}=0,025 \text{ s}^{-1}$ abschätzen lässt. Bei einer Konzentration von 400 nM ergäbe sich damit eine $v_{on} = 400 \text{ nM} \cdot k_{on} = 0,17 \text{ s}^{-1}$. Dabei ist bei der Konzentration von ca. 400 nM, bei der der Untergruppenaustausch gemessen wurde, der mittlere Abstand der Hsp90-Moleküle ca. 200 nm. Wenn nun ein Dimer monomerisiert, lassen sich die Monomere als Kugeln mit einem Radius $R = 3,5 \text{ nm}$ annähern. Deren Diffusionskonstante lässt sich abschätzen nach

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (6.1)$$

wobei die Viskosität von Wasser bei 30°C $\eta = 0,798 \text{ mPas}$ und $k_B T = 4,2 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ ist. [98] Damit ergibt sich eine Diffusionskonstante von $D = 50 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$. Die diffusionslimitierte Kollisionsrate k_1 zweier Kugeln mit Radius R_1 und R_2 sowie den Diffusionskonstanten D_1 und D_2 ergibt sich aus der Lösung des Fickschen Gesetzes (siehe [9]) und lautet

$$k_1 = \frac{2 k_B T}{3 \eta} \frac{(R_1 + R_2)}{R_1 R_2}. \quad (6.2)$$

Für zwei gleich große Kugeln bei $T = 30^\circ\text{C}$ ist $k_1 = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Beim Hsp90-Monomer kommt als Einschränkung hinzu, dass die Kugeln nur an ihrem C-Terminus dimerisieren können, also mit einer Fläche von $s \approx 1 \text{ nm}$. Die auf die Rotationsdiffusion korrigierte Rate ist

$$k_{on} = k_1 \cdot \left(\frac{s}{2,6 \cdot R} \right)^4. \quad (6.3)$$

Damit ergibt sich bei 400 nM eine korrigierte Kollisionsrate von $400 \text{ nM} \cdot k_{on} = 0,11 \text{ s}^{-1}$, was gut mit dem aus den Ensemble-Messungen abgeschätzten Wert übereinstimmt. In den in smFRET-Messungen verwendeten Vesikeln ist die Konzentration von Hsp90 ebenfalls ca. 400 nM. Da ein dissoziiertes Hsp90-Molekül allerdings bei der Diffusion im Vesikel nur auf das andere Monomer treffen wird, und nicht wie im Ensemble auf andere Dimere, wird der Anteil der Hsp90-Monomere künstlich hochgehalten. Der Anteil von Hsp90-Monomeren bei 400 nM im Ensemble lässt sich als ca. 1/8 abschätzen.[13] Damit wäre nur jedes achte Hsp90-Dimer monomerisiert und damit fähig, mit einem anderen freien Monomer zu dimerisieren. Also muss die Einzelmolekülrate k_{on} um einen Faktor acht schneller sein als die Ensemble-Raten. Die Ensemble-Austauschrate von Hsp90 in Anwesenheit von ATP- γ -S ist ca. 3600 s, die für ATP hingegen nur ca. 40 s.[44]

6.2 SmFRET-Messungen zur Dimerisierung

Um den Effekt der Dimerisierung am einzelnen Molekül zu untersuchen, wurde im Wild-Typ-Hsp90 die Aminosäure Asp560 durch ein Cystein ersetzt. Der Abstand in der Kristallstruktur beträgt im offenen und im geschlossenen Zustand ca. 4,3 nm. Nach der Markierung mit Donor- und Akzeptorfluorophoren wurden wieder die ATPase-Aktivitäten gemessen. Es konnte keine Beeinträchtigung der ATPase-Rate festgestellt werden. Nun wurden, wie in Anhang A.5 beschrieben, Heterodimere hergestellt. Um bei den für smFRET-Experimente notwendigen Konzentrationen in der Messkammer Hsp90-Dimere vorliegen zu haben, wurden die Heterodimere, wie in Abbildung 6.1 dargestellt, in Vesikel eingeschlossen.

Die resultierenden Einzelmolekülkurven (s.Abb.6.2) zeigen zwei deutlich unterscheidbare FRET-Niveaus. Die Verteilung der FRET-Effizienzen in Abb.6.3 zeigt eine hohe FRET-Effizienz bei ca. 0,56. Dieses entspricht einem Abstand der Fluorophore von 6,2 nm. Rechnet man wie oben beschrieben die Länge der Restgruppe von Cystein und die Länge des Maleinimid-Linkers mit ein, so liegt der Abstand im Bereich der Abstände aus der Kristallstruktur.

Der Zustand mit mittlerer FRET-Effizienz lässt sich also mit Hsp90 im dimerisierten Zustand in Verbindung bringen. Das dissoziierte Hsp90-Molekül entspricht demnach der Population, in der nahezu kein Energie-Transfer messbar ist.

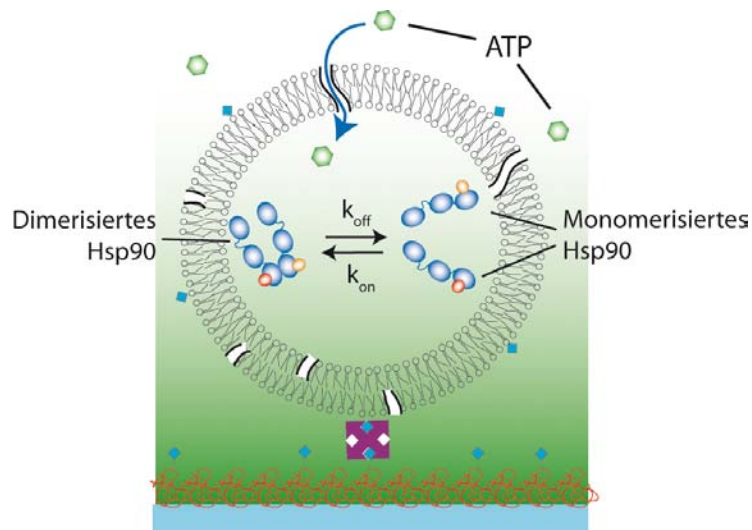


Abbildung 6.1: Um die Dimerisierungskinetik von Hsp90 in smFRET-Experimenten zu untersuchen, wurde das markierte Protein in ein Vesikel eingeschlossen. Dadurch wurde die Diffusion der Monomere eingeschränkt.

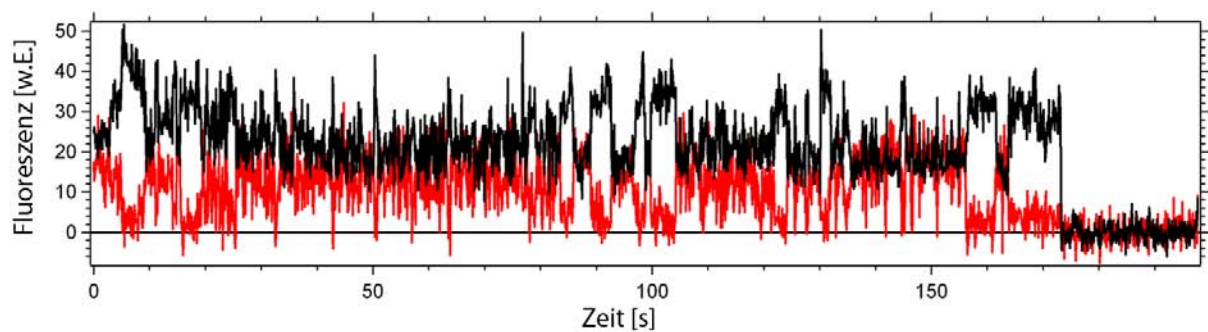


Abbildung 6.2: Einzelmolekülkurve des Konstruktes, bei dem an der C-Domäne ein FRET-Paar angebracht war. Die Intensität des Donorkanal ist schwarz und die des Akzeptors ist rot dargestellt. Man erkennt deutlich längere Verweildauern im dimerisierten Zustand als im dissoziierten.

6.3 Kinetik der Dissoziation

Aus den smFRET-Kurven wurde mit dem obigen Schwellenwertkriterium die Verweildauer im dimerisierten Zustand, mit mittlerer FRET-Effizienz und im monomerisierten Zustand ohne Energie-Transfer bestimmt. Deren Verteilung ist in Abb.6.4 aufgetragen. In die Verteilungen von ATP gingen 84 Kurven (ATP- γ -S: 62 Kurven) mit mindestens 157 Ereignissen ein. Die Verteilungen der Zeiten im dissoziierten Zustand gleichen einfach-exponentiellen Verteilungen mit den Zerfallsraten $v_{on} = 0,8 \text{ s}^{-1}$ (ATP- γ -S) bzw. $v_{on} = 0,7 \text{ s}^{-1}$ (ATP). Im Bereich der Verweildauer größer als 10 s kommt es zu Abweichungen von der einfach-exponentiellen Verteilung. Es ist davon auszugehen, dass nicht exakt zwei Hsp90-Monomere in jedem beobachteten Vesikel eingeschlossen wurden. Wenn ein nicht fluoreszenzmarkiertes oder ein mit einem geblichenen Fluorophor markiertes Monomer mit eingekapselt wur-

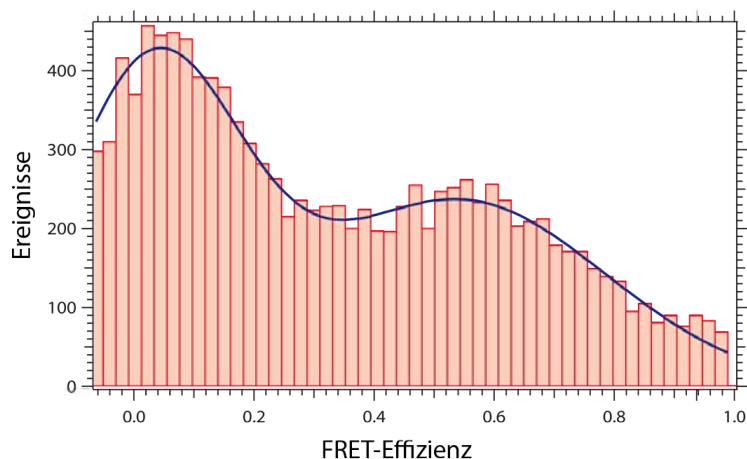


Abbildung 6.3: Histogramm der FRET-Effizienzen des an der C-terminalen Domäne fluoreszenzmarkiertem Hsp90. Die Population mit geringer FRET-Effizienz repräsentiert den monomerisierten Zustand und die Population mit mittlerer FRET-Effizienz den dimerisierten Zustand.

de, so könnte es zu einer apparenten Verweildauer im dissoziierten Zustand kommen, die tatsächlich eine Verweildauer im dimerisierten Zustand wiedergibt.

Die Verteilungen der Verweildauer im geschlossenen Zustand in Anwesenheit von ATP ist einfach-exponentiell mit $k_{off} = 0,3 \text{ s}^{-1}$. In Anwesenheit von (ATP- γ -S) zerfällt das Dimer mit $k_{off} = 0,04 \text{ s}^{-1}$. Die Austauschrate von Hsp90 in Anwesenheit von 2 mM ATP- γ -S ist ca. 3600 s.[44] Diese Raten liegen im Bereich der am Anfang des Kapitels aus Ensemble-Messungen abgeschätzten Werte. Die Raten des ersten Schrittes des ATPase-Zyklus von Hsp90 $k_{\pm 0} \approx 0,8 \text{ s}^{-1}$ (s.Kap.5) und für k_{off} in Anwesenheit von ATP liegen in der gleichen Größenordnung. Das bedeutet, dass die Werte für k_{off} eine Mischung aus Dissoziationsraten der offenen Zustände von Hsp90 (A und D) und den Dissoziationsraten der geschlossenen Zustände (B und C) darstellen. Da ATP- γ -S k_{off} signifikant verringert, ist davon auszugehen, dass Hsp90 in Zuständen gehalten wird, die ein ausgesprochen langsames k_{off} besitzen. Der verlangsamende Einfluss von ATP- γ -S auf die ATPase-Rate wird im Allgemeinen darauf zurückgeführt, dass das weniger elektronegative Schwefelatom am γ -Phosphat die Bindung zwischen γ - und β -Phosphat nicht so stark polarisiert und es damit weniger gut hydrolysiert werden kann.[27] Bei der Untersuchung der Kinetik der ATPase-Rate von Hsp90 im vorigen Kapitel wurde ein verlangsamender Effekt von ATP- γ -S auf die Raten $k_{\pm 1}$ und $k_{\pm 3}$ festgestellt. Diese halten das Hsp90 sowohl länger in den geschlossenen Zuständen B und C als auch in den offenen Zuständen A und D. Es ist also ein alleiniger Effekt durch eine höhere Verweildauer in einem N-terminal geschlossenen Zustand wenig wahrscheinlich. Zusätzlich könnte durch einen Einfluss des Nucleotids auf die M- und C-Domäne das Molekül im N-terminal offenen Zustand die C-terminale Dimerisierung stabilisiert werden.

Bei den mit ATP- γ -S durchgeführten Experimenten wurden viele Kurven gemessen, die eine sehr lange Verweildauer im dimerisierten Zustand aufwiesen. Die Verteilung wurde auf

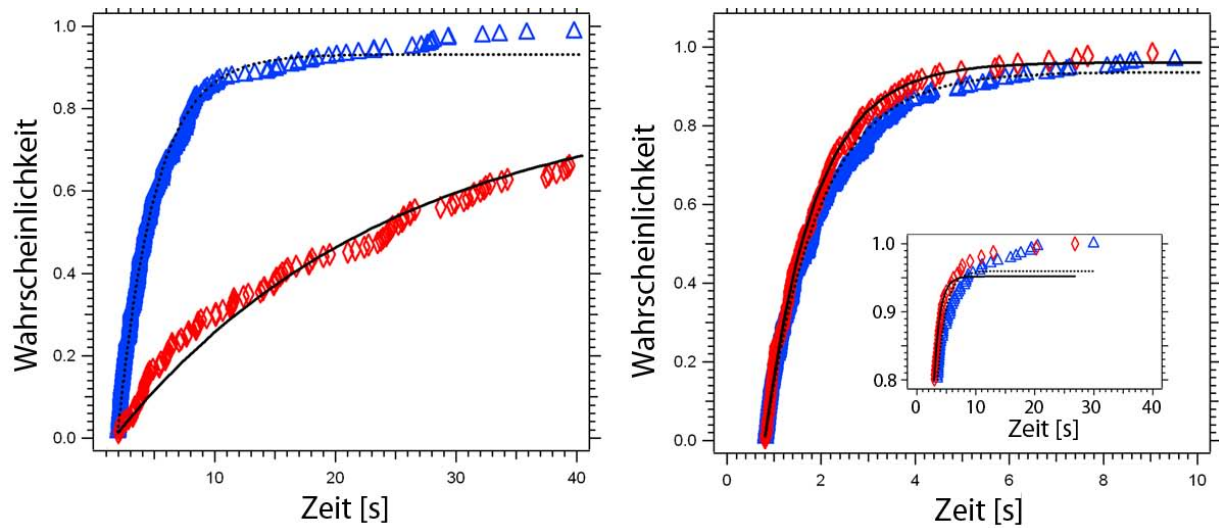


Abbildung 6.4: Verteilungen der Verweildauer im dimerisierten (links) und im dissoziierten Zustand (rechts). Die Messungen in Anwesenheit von ATP (blaue Dreiecke) und ATP- γ -S (rote Karos) liefert ähnliche k_{on} -Werte aber stark unterschiedliche k_{off} -Werte. Der beste Fit einer einfach-exponentiellen Kurve ist als schwarze Linie angetragen (gestrichelt: ATP, durchgezogen: ATP- γ -S). Inset: Der Bereich langer Lebensdauern weicht von der einfach-exponentiellen Verteilung ab.

die Gesamtzahl der Ereignisse normiert, ist in Abb.6.4 aus Gründen der Übersichtlichkeit nur bis 40 s gezeigt. Eine längere Dunkelzeit zwischen den jeweils 100 ms Beleuchtungszeit (vgl. Abschnitt 2.3.2) würde dazu führen, dass über die kurzen Zeiten gemittelt werden würde. Aus diesem Grund stellt k_{off} aus den Einzelmolekülexperimenten nur eine untere Grenze dar. Die Dimerisierungsratenkonstante k_{on} ist im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Das zeigt, dass der Einfluss von ATP- γ -S auf die Raten des Untergruppenaustauschs vor allem von k_{off} dominiert wird.

6.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Dissoziations-/Assoziationskinetik der Hsp90-Dimere betrachtet. Dabei zeigte sich, dass deren Kinetik durch die Dissoziationskonstante k_{off} dominiert wird.

Kapitel 7

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET erstmals eine Methode am Hsp90-System etabliert, den ATPase-Zyklus direkt zu beobachten. Es konnten strukturelle Rückschlüsse auf die bisher unbekannte Bewegung der einzelnen Domänen gezogen werden. Die komplexe Kinetik der N-terminalen Domänen ist eingehend untersucht worden. Auch wurde die Dissoziations-/Assoziationskinetik der Hsp90-Dimere charakterisiert.

7.1 Drehung der Domänen

In Kapitel 4 wurden die großen Konformationsänderungen charakterisiert, die Hsp90 im Laufe seines ATP-Zyklus ausübt. Dabei konnte bei den untersuchten FRET-Paaren kein Unterschied in den FRET-Effizienzen der Zustände A und D bzw. B und C beobachtet werden. Die Mitteldomäne scheint im Laufe des Zyklus eine Drehung um 90° zu erfahren.[16] Mit Hilfe von Einzelmolekül-Polarisations-Experimenten, bei denen der Dipol-Charakter der Fluorophore ausgenutzt wird, könnte diese Drehung visualisiert werden.[99][68] Hierzu ist eine Anbindung an die Oberfläche nötig, bei der das Hsp90-Molekül möglichst wenig rotieren kann. Dies könnte mit Hilfe der Streptag-Antikörper und den zwei C-terminalen Streptag-Sequenzen des Dimers gelingen.

7.2 Abbildung der Konformation

An dem wie Hsp90 zur GHKL-Familie der ATPasen gehörenden Protein MutL α konnten große Konformationsänderungen mit Hilfe eines abbildenden AFMs visualisiert werden.[17] An Hsp90 wurden ähnliche Experimenten mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) durchgeführt.[91] Die Abbildung von Hsp90 in einem Puffer mit einem AFM auf einer atomar glatten Oberfläche ist physiologischer als im Vakuum eines TEM. Deshalb ist davon auszugehen, dass mit dem AFM abgebildete Konformationen, eher mit denen in Lösung vergleichbar sind. Da Hsp90 ebenfalls Konformationsänderungen im Bereich einiger nm ausübt, sollte es mit einem AFM möglich sein, diese Zustände zu unterscheiden.

7.3 Co-Chaperone

Die in Kapitel 6 diskutierten Ergebnisse belegen die Relevanz der Dimerisierung für die ATPase-Funktion. Die Bindung des Co-Chaperones Sti1 an den C-terminus von Hsp90 in der offenen Konformation inhibiert seine ATPase-Rate und verhindert die Dissoziation.[100] Es dient dazu, den Hsp90-Hsp70-Komplex zu assoziieren und somit die Faltungsmaschinerie zusammenzuhalten.[3] Mit der an C560 markierten Hsp90-Mutante kann der Einfluss von Sti1 auf die Dissoziation in Einzelmolekül-Experimenten beobachtet werden.

7.4 Klientenproteine

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ohne Substratproteine durchgeführt. Der in Kapitel 5 charakterisierte ATP-Zyklus von Hsp90 stellt also den Leerlauf-ATP-Zyklus dar. Die physiologisch essentielle Wirkung von Hsp90 wird jedoch über seine Klientenproteine vermittelt.[3][1] Aus diesem Grund wäre es interessant, den Einfluss von Hsp90 auf seine Substrate zu untersuchen.

7.4.1 Der Steroidhormonrezeptor

Der Einfluss von Hsp90 auf die Reifung des Steroidhormonrezeptors (SHR) gilt als eines der am Besten untersuchten Hsp90-Klienten-Systeme.[3] Es wurde gezeigt, dass der SHR die ATPase-Rate von humanem Hsp90 zweihundertfach erhöht.[10] Es ist davon auszugehen, dass es auch in der Hefe-Variante Klientenproteine gibt, die den ATP-Zyklus beeinflussen. Die Untersuchung dieses Einflusses könnte dazu beitragen, die physiologisch essentielle Rolle der ATPase-Funktion von Hsp90 zu verstehen.

7.4.2 Der Tumorsuppressor p53

Es wurde gezeigt, dass die Hsp90-Aktivität die Stabilität von p53 moduliert.[101] Vermutlich hat sich diese Funktion evolutionär entwickelt, um eine direktere Kontrolle der zellulären Protein-Niveaus zu erreichen.[102] Mit Triple-FRET-Partnern an verschiedenen Stellen von p53 und an Hsp90 könnte die Bindungsstelle der Klienten an Hsp90 trianguliert werden, wie dies schon bei der RNA-Polymerase gelang.[46][77] Die Analyse der Faltung/Entfaltung von Proteinen war eine der ersten Anwendungen von smFRET.[70] Mit einem FRET-Paar am Klientenprotein (z.B. 550/647N) und einem weiteren FRET-Partner am Hsp90 (z.B.488) ließen sich Bindung und Faltung/Stabilisierung von p53 simultan beobachten, und so besser verstehen.

Anhang A

Biochemische Methoden

Um das Hsp90-System für die Einzelmolekülexperimente vorzubereiten und seine Funktionalität zu testen, war es nötig eine Reihe von biochemischen Kontrollexperimenten durchzuführen.

A.1 Das Spektrofluorimeter

Die Fluoreszenz-Ensemblemessungen der vorliegenden Arbeit wurden mit einem FP-6500 von Jasco durchgeführt, wie es in Abb.A.1 schematisch dargestellt ist. Von der Xenonlampe fällt das kontinuierliche Spektrum auf das erste Beugungsgitter, von welchem es abhängig von der Wellenlänge gestreut wird. Der Anregungsmonochromatorspalt schneidet nun ein spektrales Fenster aus, welches zu einem definierten Teil auf einen Referenzphotomultiplier fällt. Der Rest des Lichts regt nun in der Küvette die Probe an. Alle Fluorimeter detektieren das Fluoreszenzlicht im rechten Winkel zum Anregungslicht, da das letztere viele Größenordnungen intensiver ist als das Fluoreszenzlicht. Man spricht hier von L-Geometrie, im Gegensatz zur T-Geometrie, bei der auch das nicht absorbierte Anregungslicht detektiert wird. Das Fluoreszenzlicht wird nun wieder über einen Monochromator spektral aufgetrennt, und es wird mit Hilfe des Emissionsmonochromatorspaltes erneut ein spektrales Fenster herausgeschnitten, welches vom letzten Photomultiplier-Tube detektiert wird.

Bei den Anisotropie-Messungen wurden in den Anregungs- und Detektionsstrahlengang Polarisatoren eingebaut. Diese ließen sich unabhängig voneinander in Positionen senkrecht und parallel zur Anregungsebene einstellen. Die Korrektur für die Empfindlichkeiten des Instrumentes ist der sogenannte G-Faktor. Er berechnet sich nach

$$G = \frac{I_{PS}}{I_{PP}}. \quad (\text{A.1})$$

Dabei ist I_{PS} die Intensität bei einer parallelen Stellung des Anregungspolarisators und einer senkrechten Stellung des Detektionspolarisators. Entsprechend ist I_{PP} die Intensität bei einer parallelen Stellung beider Polarisatoren. Nach [41] errechnet sich die Anisotropie

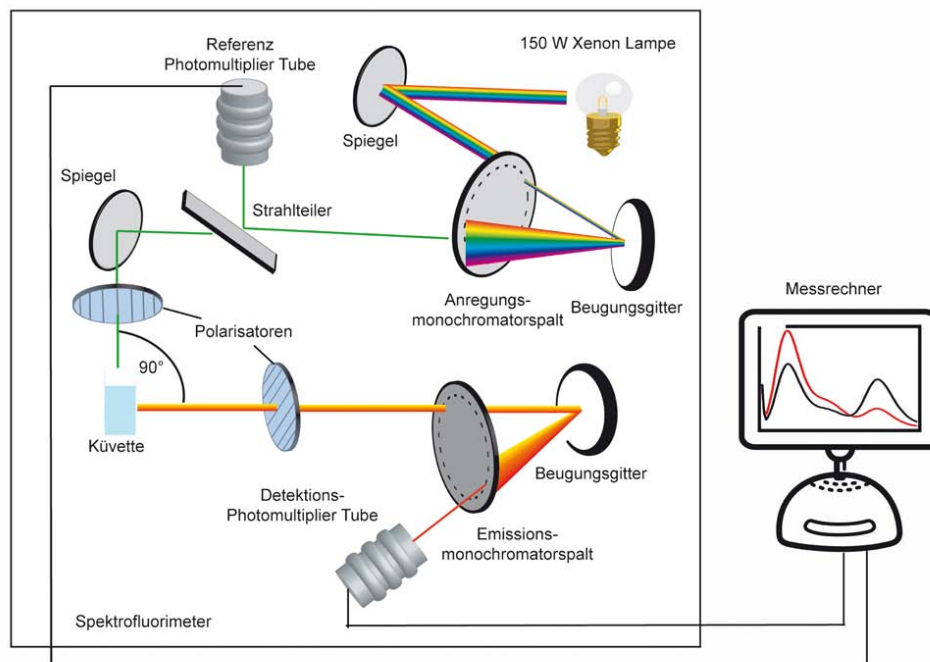


Abbildung A.1: Schematische Darstellung des Spektrofluorimeters FP-6500 von Jasco. Anregungs- und Fluoreszenzlicht sind im rechten Winkel zueinander angeordnet. Das Fluoreszenzsignal setzt sich zusammen aus dem Signal des Detektions-Photomultipliers und dem des Referenz-PMT.

r nach

$$r = \frac{I_{SS} - GI_{SP}}{I_{SS} + 2GI_{SP}}. \quad (\text{A.2})$$

A.2 Test zur Messung der ATPase-Aktivität der Hsp90-Moleküle

Zur Untersuchung der ATPase-Aktivität der Hsp90 Moleküle wurde ein NADH-gekoppelter ATPase-Test verwendet, wie in [103][104] beschrieben. Das durch Hydrolyse des ATPs entstandene ADP (s.Tab.A.1 Reaktionsgleichung (I)) wird mit Phosphoenolpyruvat in einer von Pyruvatkinase katalysierten Reaktion zu ATP und Pyruvat regeneriert (II). Das Pyruvat wird durch die Laktatdehydrogenase mit NADH als Co-Substrat zu Laktat reduziert. Die Kinetik der NADH-Umsetzung zu NAD⁺ lässt sich über die Absorption von NADH ($6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) im UV-Vis-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgen. Dieses System hat den Vorteil, dass durch ATPase-Aktivität entstandenes ADP wieder regeneriert wird und somit nicht inhibierend wirkt. Der Test eignet sich auch für das langsamer hydrolysierbare ATP- γ -S solange die ATPase langsam genug ist, so dass die Messung beendet ist, bevor die Konzentration des regenerierten ATPs zu hoch wird.[27]

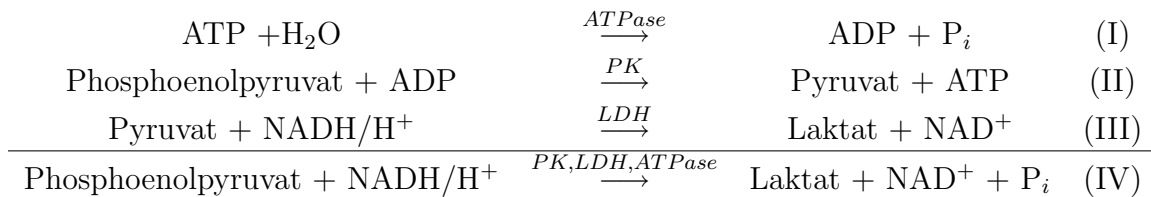


Tabelle A.1: Teilreaktionen des ATPase-Tests (I-III) und Gesamtreaktion (IV). Als Katalysatoren wirken Laktatdehydrogenase (LDH) und Pyruvatkinase (PK).

A.2.1 Material zur Durchführung des ATPase-Tests

Die benötigten Reagenzien sind:

- NADH di- Na^+ -Salz (MW 709,4; Roche, Mannheim), Phosphoenolpyruvat K^+ -Salz (MW 206,1; Roche, Mannheim),
- L-Laktatdihydrogenase aus dem Hasenmuskel in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ≈ 550 U/mg (Roche, Mannheim),
- Pyruvatkinase aus dem Hasenmuskel in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ≈ 220 U/mg (Roche, Mannheim),
- ATP Na_2^+ -Salz (MW 551,1; Serva, Heidelberg),
- ADP Na_2^+ -Salz (MW 471,2; Serva, Heidelberg).

Für die Messung wird ein Hepes-Puffer (40 mM Hepes, 150 mM KCl und 10 mM MgCl_2 bei pH 7,5) verwendet. Dieser wird im Folgenden immer Messpuffer genannt werden.

Für den ATPase-Test wird ein sogenannter Pre-Mix angefertigt. Dafür wurden 8656 μL Messpuffer mit 240 μL Phosphoenolpyruvatlösung (100 mM in Messpuffer), 48 μL NADH-Lösung (50 mM in Messpuffer), 12 μL Pyruvatkinase (2000 U/ml) und 44 μL Laktatdehydrogenase (2750 U/ml) angesetzt und eingefroren. Die Messung wurde in einer 100 μL -Quarzküvette mit einem UV-Vis-Spektrometer in einem Peltier-Temperatur-Kontroll-Modul (DU700 von Beckmann-Coulter, Krefeld) bei 30 °C durchgeführt. Zuerst wurde durch Zugabe von 2 μL 100 mM ADP-Lösung sichergestellt, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des ATPase-Tests deutlich über der erwarteten ATPase-Rate liegt. Nun wurden 300 μL des Pre-Mix' mit der ATPase in der Küvette gemischt und für ca. 5 min temperiert. Eventuell vorhandene Reduktionsmittel hätten schon zu einer ATPase-Rate geführt. Der ATPase-Test wurde nun durch Zugabe von 2 μL 100 mM ATP-Lösung gestartet und über ca. 15 min aufgezeichnet. Die Konzentration von ATP wurde dabei im UV-Spektrometer bestimmt. Der Absorptionskoeffizient von ATP beträgt $15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. [105] Die Lösung musste mit einigen Tropfen 1M KOH auf einen pH von 7,5 eingestellt werden. Die Konzentration der ATPase in der Lösung war 2 μM . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM des spezifischen Hsp90-Inhibitors Radicol (Sigma, Taufkirchen) gestoppt, um eine eventuell vorhandene, nicht von Hsp90 stammende ATPase-Aktivität zu erkennen. Da bei der Reaktion pro Mol ATP ein Mol NADH umgesetzt wird, ließ sich aus der Steigung der Kurve direkt die ATPase-Aktivität von Hsp90 ablesen.

A.3 Fluoreszenzmarkierung der Cysteingruppen

Die molekularbiologisch in der Hsp90-Sequenz gegen Cysteine ersetzten Aminosäuren (s. Abschnitt 2.1) wurden zuerst mit zehnfachem molarem Überschuss von DTT (Dithiothreitol) eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden eventuell oxidierte Schwefelgruppen reduziert und somit reaktiver gemacht. Das überschüssige DTT wurde mit Hilfe von NAP-5 G-25-Säulen (GE Healthcare, München) abgetrennt.¹

Die Probe wurde mit einer Vivaspin 500/10000 MCVO PES Säule ca. 5 min in einer Tischzentrifuge (F45-12-11 Rotor, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei höchster Drehzahl bis auf eine Konzentration von mindestens 30 μM aufkonzentriert. Die Maleinimid-Fluorophore ATTO550 und ATTO647N (ATTO-Tec, Siegen) wurden in DMSO gelöst und im dreifachen molaren Überschuss in die Proteinlösung gegeben. Die Lösung mit dem Fluorophor wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann der nicht gebundene Farbstoff mit Hilfe einer G-50 Micro-Spin-Column (GE Healthcare, München) abgetrennt. Der Labelgrad L bezeichnet das molare Verhältnis von Fluorophor und Protein und berechnet sich nach

$$L = \frac{[\text{Fluorophor}]}{[\text{Protein}]} = \frac{A_{\text{max}} \cdot \epsilon_{\text{Protein}}}{(A_{280} - A_{\text{max}} \cdot K F_{280}) \epsilon_{\text{max}}}. \quad (\text{A.3})$$

Dabei muss die Absorption des Proteins bei 280 nm korrigiert werden, da das Fluorophor ebenfalls bei 280 nm absorbiert. Die Absorptionskoeffizienten der Fluorophore wurden in Tabelle A.2 zusammengefasst.

A.4 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der verwendeten Komponenten wurde mit einem Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 2 μl Lösung verwendet. Die verwendeten Absorptionskoeffizienten der Fluorophore laut Hersteller stehen in Tabelle A.2.

Die Konzentration der Proteine wurde analog hierzu bestimmt. Die Absorptionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm berechnen sich nach

$$\epsilon_{\text{Protein}} = N_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + N_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + N_{\text{Cys}} \cdot \epsilon_{\text{Cys}} \quad (\text{A.4})$$

mit der Anzahl der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystein (N_{Tyr} , N_{Trp} und N_{Cys}) und deren Absorptionskoeffizienten in Wasser ($\epsilon_{\text{Tyr}} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Trp}} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{Cys}} = 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).^[106] Die Zahlenwerte für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tab.A.3 zusammengefasst.

¹Bei Applikation von 50 μl kommen mehr als 90% des Proteins zwischen 200 μl und 800 μl Elutionsvolumen von der Säule.

	ATTO 550	ATTO 647N
Absorptionsmaximum λ_{abs}	554 nm	644 nm
Emmissionsmaximum λ_{Em}	576 nm	669 nm
Max. Absorptionskoeffizient ϵ_{max}	120000 M ⁻¹ cm ⁻¹	150000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Korrekturfaktor KF_{280}	0,12	0,05
Quanteneffizienz η	0,80	0,65
Fluoreszenzlebensdauer τ	3,2 ns	3,4 ns

Tabelle A.2: Spektrale Eigenschaften der in der Arbeit verwendeten Fluorophore. Sämtliche Werte beziehen sich auf freies Fluorophor in Wasser. Der Korrekturfaktor der Proteinabsorption bei 280 nm ist der Anteil an der Maximalabsorption des Fluorophors.

	$\epsilon_{Protein}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Molekulargewicht [D]
Hsp90	57300	81406
Streptag-Hsp90	62800	82464
Dmkhc-Zipper-Hsp90	75290	87481

Tabelle A.3: Absorptionskoeffizienten der verwendeten Proteine bei 280 nm. Berechnet nach <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.

A.5 Untergruppenaustausch der Hsp90 Dimere

Zur Herstellung von Hsp90-Heterodimeren wurden die einzelnen fluoreszenz-markierten Mutanten inkubiert. Als Inkubationstemperatur wurde für die Mutanten ohne die C-terminale Coiled-Coil-Sequenz 37°C (10 min) und für die Mutante mit der Zipper-Sequenz 47°C (30 min) gewählt. Der Austausch wurde im Spektrofluorimeter durch Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors verfolgt (s.Abb.A.2). Dieser Messmodus hat eine deutlich höhere Zeitaufösung als die gleichzeitige Detektion der Donorfluoreszenz. Die ATPase-Aktivität war nach der Inkubation von zehn Minuten bei 47°C unverändert. Nach der Inkubation von 30 min bei 47°C betrug die ATPase-Aktivität noch 90% des vorher gemessenen Wertes. Um eventuelle Aggregate aus der Probe zu entfernen, wurde die Lösung 20 min in einer Air-Fuge bei $\approx 10^5$ G abzentrifugiert und der Überstand für die Einzelmolekülmessungen verwendet.

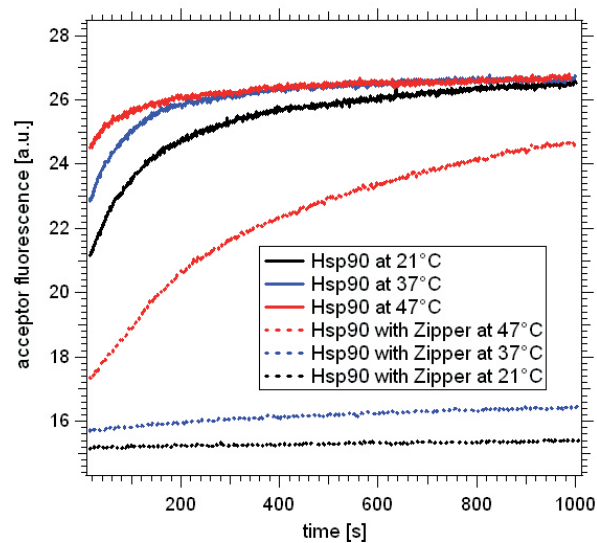


Abbildung A.2: Kinetik des Untergruppenaustausches zwischen Hsp90 C61 ATTO555 und Hsp90 C385 ATTO647N bei verschiedenen Temperaturen. Die Hsp90 Mutante mit dem C-terminalen Coiled-Coil-Motiv ist signifikant stabiler dimerisiert als die Wildtyp-Mutante.

A.6 Einfluss der Nukleotide auf die Fluoreszenzspektren

Vor der Messung der fluoreszenz-markierten Hsp90-Konstrukte im Einzelmolekül-Mikroskop wurden von ihnen im Spektrofluorimeter Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dadurch konnte untersucht werden, wie sich das Verhältnis der Population der einzelnen Zustände unter verschiedenen Nukleotid-Bedingungen ändert. Die Fluoreszenzspektren des Hsp90-Konstruktes mit Coiled-Coil-Motiv, bei dem die Aminosäuren C61 und C385 mit einem FRET-Paar markiert waren, angeregt durch Licht der Wellenlänge 532 nm, sind in Abb.A.3 dargestellt. Man erkennt nur bei Zugabe von AMP-PNP einen signifikanten Anstieg der FRET-Effizienz. In diesen Ensemble-Messungen tragen sowohl Heterodimere, die mit Donor und Akzeptor markiert waren, als auch Homodimere, die nur mit Donor oder Akzeptor markiert waren, zum Fluoreszenzsignal bei. Deshalb entspricht das Maximum der Fluoreszenzintensität bei 575 nm nur etwa zur Hälfte der Fluoreszenz der Heterodimere.

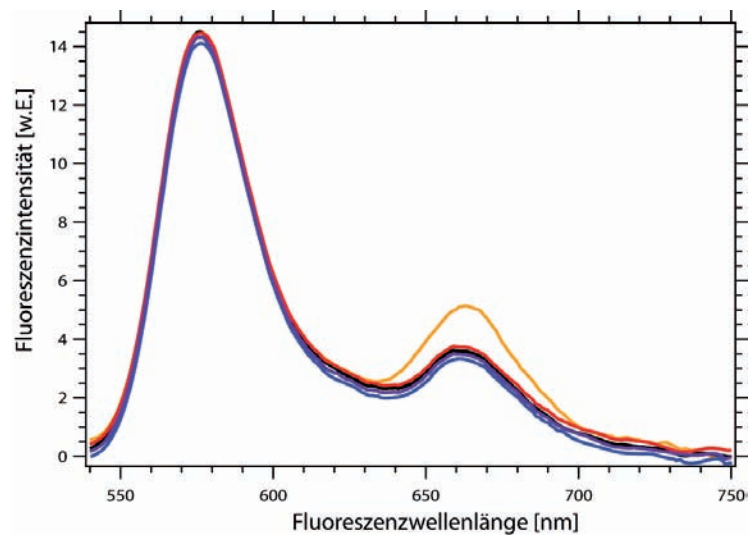


Abbildung A.3: Fluoreszenzspektren der Hsp90 Mutante mit Coiled-Coil-Motiv, bei der die Aminosäuren C61 und C385 mit einem FRET-Paar markiert waren, bei der Anregungswellenlänge 532 nm. Dabei hat AMP-PNP (orange) den größten Einfluss auf die FRET-Effizienz. Die Spektren von ATP (schwarz), ADP (lila), ATP- γ -S (rot) und kein Nukleotid (blau) zeigen keinen signifikanten Anstieg der FRET-Effizienz.

Anhang B

Herstellung der Flusskammern

Entscheidend für die in dieser Arbeit durchgeführten Einzelmolekülmessungen war die spezifische Anbindung der einzelnen Moleküle an der Oberfläche, welche mit dem TIR-Feld beleuchtet wurde. Hierzu war eine sehr saubere Oberfläche nötig, die die spezifische Anbindung ermöglichte, unspezifische jedoch verhinderte. Dies wurde erreicht durch eine Beschichtung der Oberfläche mit biotinyliertem Polyethylenglykol.[31] Die Oberfläche sollte bis zu mindestens nanomolaren Konzentrationen des Fluorophors keine unspezifische Anbindung zeigen.

B.1 Reinigung der Objektträger

Die Quarzglas-Objektträger (Finkenbeiner Waltham, MA) wurden mit einem Diamantbohrer (\varnothing 1,0 bis 1,2 mm) mit zwei Löchern versehen. Vor dem Funktionalisierungsprozess wurden die Slides gründlich gereinigt. Zuerst wurden etwaige Reste der Fertigung bzw. bei schon benutzten Objektträgern Reste von Nesco-Film mit Alkohol unter mäßigem Druck abgerieben. Waren mit bloßem Auge keine Verschmutzungen mehr zu erkennen, so wurden die Träger wie folgt gereinigt:

1. sechs Mal spülen mit Millipore-Wasser
2. 15 min Ultraschall in zweiprozentiger Hellmanex-Wasser-Lösung (Hellma, Mühlheim)
3. sechs Mal spülen mit Millipore-Wasser
4. 15 min Ultraschall in ddH_2O

Nach dem Ultraschallbad wurde darauf geachtet, dass die auf der Oberfläche des Reinigungsmittels schwimmenden Verunreinigungen nicht in Kontakt mit den sauberen Objektträgern kamen. Nun wurde eine sogenannte *Piraña*-Lösung aus drei Teilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Teil Wasserstoffperoxid (beide Fluka, Taufkirchen) hergestellt. Es war zu beachten, die Schwefelsäure auf das Wasserstoffperoxid zu geben, nicht umgekehrt! Die Lösung wurde mit einem Glasstab gerührt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren.

Nun wurde die Lösung in die schon vorgewärmten Färbebehälter mit Objektträgern gegeben und konnte im Wasserbad bei 60°C für eine Stunde reagieren. Anschließend wurden die Behälter abkühlen gelassen und die *Piraña*-Lösung ordnungsgemäß entsorgt. Die Objektträger wurden, wie oben aufgezählt, gereinigt und im Anschluss über Nacht im Hellmanex stehen gelassen, um letzte Reste von Schwefelsäure, die die nachfolgende Silanisierung beeinträchtigen würden, zu entfernen.

B.2 Silanisierung der Objektträger

Die gereinigten Objektträger wurden erneut 15 min. in Wasser beschallt, mit Millipore-Wasser gespült und zwei weitere Male mit Millipore-Wasser beschallt. Die nun sauberen Objektträger wurden mit Stickstoff möglichst kurz trocken geblasen. Hierbei war es wichtig, auch letzte Reste von Wasser vollständig zu entfernen, da die Silanisierung sehr anfällig auf Wasser ist. Die augenscheinlich trockenen Objektträger wurden zuerst 5 min in sauberem HPLC-Aceton (Sigma, Taufkirchen) inkubiert und dann in eine Lösung von 100 ml HPLC-Aceton mit einem ml *Vectabond* (Axxora, Lörrach) transferiert. In dieser wurden sie nun 15 min inkubiert. Dies führte zu einer hydrophoben, amino-aktivierten Oberfläche, die suszeptibel für N-Hydroxy-Succinimidylester ist. Nun wurde der Objektträger mit einer Pinzette aus dem Behälter genommen und wiederholt in ein Becherglas mit ca. 500 ml Millipore-Wasser getaucht und wieder herausgezogen. Dabei sollte die Hydrophobizität des Objektträgers deutlich erkennbar sein und mit wiederholtem Transfer über die Luft-Wasser-Grenzfläche zunehmen.

B.3 PEG-Funktionalisierung

Für die PEG-Funktionalisierung wurde eine 1:16 molare Mischung von 5 kD α -Methoxy- ω -NHS-PEG (80 mg) mit 3 kD Biotin-NHS-PEG (3 mg) (beide Rapp-Polymere, Tübingen) in 600 μ l 100 mM $NaHCO_3$ bei pH 9,5 hergestellt. Diese Lösung wurde eine Minute bei höchster Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und dann je 60 μ l auf die Objektträger verteilt. Auf die Träger wurde ein Deckglas (Carl Roth, Karlsruhe) gelegt, und die Lösung zur Reaktion für drei Stunden unter Lichtabschluss in eine Kiste gegeben. In dieser befand sich ein Wasserreservoir, um die PEG-Lösung vor dem Austrocknen zu schützen. Danach wurden die Träger gründlich mit Millipore-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Am Schluss wurden sie in einem Färbeglas an Luft bis zur Herstellung der Flusskammer aufbewahrt.

B.4 Zusammenbau der Flusskammer

Auf einem Stück Aluminiumfolie wurde ein Sandwich aus einem funktionalisierten Objektträger, einer aus Nesco-Film (Carl Roth, Karlsruhe) mit einem Laser-Cutter (Speedy

300 von Trotec, München) ausgeschnittenen Maske für einen Kanal und einem mit zwei-prozentiger Hellmanex-Lösung gereinigtem Deckglas gebaut. Zur besseren Verteilung des Drucks wurde nun ein Glas-Objektträger (Carl Roth, Karlsruhe) auf das Deckglas gelegt und das Sandwich auf einer Heizplatte bei 80°C für ca. 5 min erwärmt. Dabei wurde leicht mit einer glattgeschliffenen Metallschraube über den Glas-Objektträger gerieben, um die Anhaftung des weichen Nescofilms an Deckglas und Quarz-Objektträger zu verstärken. Die Flusskammer war fertig, wenn der Nescofilm angeschmolzen war. Dies wurde durch eine optische Veränderung von milchig-trüb zu durchsichtig ersichtlich.

Diese Flusskammern wurden nun in den eigens dafür angefertigten Halter eingebaut, der an den Stellen der Bohrlöcher Gewinde für Zu- und Ablauf der Probenlösung besaß. An diese wurde ein PE-Mikro-Schlauch (Außen \varnothing 0,96 mm, Innen \varnothing 0,58 mm) mit Hilfe eines Tygon-Schlauchs (Außen \varnothing 2,4 mm, Innen \varnothing 0,8 mm, Shore-Härte 55) als Steckverbindung (beide Neolab, Heidelberg) angeschlossen.

Anhang C

Analytische Lösung des Vier-Zustands-Modells

Die folgende Herleitung ist die Verallgemeinerung des Zwei-Zustandsmodells aus Abschnitt 3.3 und ist im wesentlichen aus [53] adaptiert. Für die zeitliche Entwicklung der Population der vier Zustände A, B, C und D (s. Kapitel 4) kann man folgende Differentialgleichungen aufstellen:

$$\dot{P}_A = \frac{dP_A}{dt} = -(k_{-3} + k_0) P_A + k_3 \cdot P_D + k_{-0} \cdot P_B, \quad (\text{C.1})$$

$$\dot{P}_B = \frac{dP_B}{dt} = -(k_{-0} + k_1) P_B + k_0 \cdot P_A + k_{-1} \cdot P_C, \quad (\text{C.2})$$

$$\dot{P}_C = \frac{dP_C}{dt} = -(k_{-1} + k_2) P_C + k_1 \cdot P_B + k_{-2} \cdot P_D, \quad (\text{C.3})$$

$$\dot{P}_D = \frac{dP_D}{dt} = -(k_{-2} + k_3) P_D + k_2 \cdot P_C + k_{-3} \cdot P_A. \quad (\text{C.4})$$

Dabei sind P_A, P_B, P_C und P_D die Wahrscheinlichkeiten, dass sich das Molekül im Zustand A, B, C oder D befindet. Die Gleichungen C.1 und C.4 beschreiben die zeitliche Entwicklung der offenen Zustände und die Gleichungen C.2 und C.3 die der geschlossenen Zustände. Nun sollen analytische Ausdrücke für die Verweildauer in den offenen und in den geschlossenen Zuständen gefunden werden, welche die Verteilungen in Abb.5.6 reproduzieren.

C.1 Lösung für den offenen Zustand

Die gekoppelten Differentialgleichungen, die die zeitliche Entwicklung des Hsp90-Moleküls in einem der beiden offenen Zustände A und D beschreiben, können mithilfe der Matrixmethode gelöst werden. Sie lassen sich umschreiben als:

$$\begin{pmatrix} \dot{P}_A \\ \dot{P}_D \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (k_0 + k_{-3}) & k_3 \\ k_{-3} & -(k_{-2} + k_3) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_A \\ P_D \end{pmatrix}. \quad (\text{C.5})$$

Das charakteristische Polynom der Matrix lautet:

$$\omega_{\pm} = \frac{1}{2} \left(-(k_0 + k_{-2} + k_3 + k_{-3}) \pm \sqrt{(k_0 + k_{-2} + k_3 + k_{-3})^2 - 4(k_0k_{-2} + k_0k_3 + k_{-2}k_{-3})} \right). \quad (\text{C.6})$$

Die Eigenvektoren erhält man aus

$$\begin{pmatrix} (k_0 + k_{-3}) - \omega_{\pm} & k_3 \\ k_{-3} & -(k_{-2} + k_3) - \omega_{\pm} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_{\pm,1} \\ v_{\pm,2} \end{pmatrix} = 0. \quad (\text{C.7})$$

Wählt man $v_{\pm,1}$ zu k_3 , so erhält man als Eigenvektoren

$$\vec{v}_+ = \begin{pmatrix} k_3 \\ k_0 + k_{-3} + \omega_+ \end{pmatrix} \quad (\text{C.8})$$

und

$$\vec{v}_- = \begin{pmatrix} k_3 \\ k_0 + k_{-3} + \omega_- \end{pmatrix}. \quad (\text{C.9})$$

Als Lösung der Differentialgleichung C.5 folgt

$$\begin{pmatrix} P_A \\ P_D \end{pmatrix} = c_1 \begin{pmatrix} k_3 \\ k_0 + k_{-3} + \omega_+ \end{pmatrix} e^{\omega_+ t} + c_2 \begin{pmatrix} k_3 \\ k_0 + k_{-3} + \omega_- \end{pmatrix} e^{\omega_- t}. \quad (\text{C.10})$$

C.2 Bestimmung der Konstanten

Zur Bestimmung der Konstanten c_1 und c_2 werden zunächst die Wahrscheinlichkeiten im Gleichgewicht berechnet. In diesem Fall sind die Gleichungen C.1-C.4 null und es gilt:

$$0 = -(k_{-3} + k_0) P_{A,GG} + k_3 \cdot P_{D,GG} + k_{-0} \cdot P_{B,GG}, \quad (\text{C.11})$$

$$0 = -(k_{-0} + k_1) P_{B,GG} + k_0 \cdot P_{A,GG} + k_{-1} \cdot P_{C,GG}, \quad (\text{C.12})$$

$$0 = -(k_{-1} + k_2) P_{C,GG} + k_1 \cdot P_{B,GG} + k_{-2} \cdot P_{D,GG}, \quad (\text{C.13})$$

$$0 = -(k_{-2} + k_3) P_{D,GG} + k_2 \cdot P_{C,GG} + k_{-3} \cdot P_{A,GG}. \quad (\text{C.14})$$

Dieses Gleichungssystem hat die Lösungen:

$$P_{A,GG} = \frac{k_{-0}k_2k_3 + k_{-0}k_{-1}k_{-2} + k_{-0}k_{-1}k_3 + k_1k_2k_3}{k_{-0}k_{-1}k_{-3} + k_{-0}k_2k_{-3} + k_0k_1k_2 + k_1k_2k_{-3}} \alpha = \frac{a}{n} \alpha \quad (\text{C.15})$$

$$P_{B,GG} = \frac{k_0k_2k_3 + k_0k_{-1}k_{-2} + k_0k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2}k_{-3}}{k_{-0}k_{-1}k_{-3} + k_{-0}k_2k_{-3} + k_0k_1k_2 + k_1k_2k_{-3}} \alpha = \frac{b}{n} \alpha \quad (\text{C.16})$$

$$P_{C,GG} = \frac{k_{-0}k_{-2}k_{-3} + k_0k_1k_{-2} + k_1k_{-2}k_{-3} + k_0k_1k_3}{k_{-0}k_{-1}k_{-3} + k_{-0}k_2k_{-3} + k_0k_1k_2 + k_1k_2k_{-3}} \alpha = \frac{c}{n} \alpha \quad (\text{C.17})$$

$$P_{D,GG} = \alpha \quad (\text{C.18})$$

mit

$$a = k_{-0}k_2k_3 + k_{-0}k_{-1}k_{-2} + k_{-0}k_{-1}k_3 + k_1k_2k_3 \quad (\text{C.19})$$

$$b = k_0k_2k_3 + k_0k_{-1}k_{-2} + k_0k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2}k_{-3} \quad (\text{C.20})$$

$$c = k_{-0}k_{-2}k_{-3} + k_0k_1k_{-2} + k_1k_{-2}k_{-3} + k_0k_1k_3 \quad (\text{C.21})$$

$$n = k_{-0}k_{-1}k_{-3} + k_{-0}k_2k_{-3} + k_0k_1k_2 + k_1k_2k_{-3}. \quad (\text{C.22})$$

Da die Summe der Wahrscheinlichkeiten eins sein muss, gilt $P_{A,GG} + P_{B,GG} + P_{C,GG} + P_{D,GG} = 1$ und α lässt sich bestimmen zu:

$$\alpha = \frac{n}{a + b + c + n}. \quad (\text{C.23})$$

Damit gilt im Gleichgewicht:

$$P_{A,GG} = \frac{a}{a + b + c + n} \quad (\text{C.24})$$

$$P_{B,GG} = \frac{b}{a + b + c + n} \quad (\text{C.25})$$

$$P_{C,GG} = \frac{c}{a + b + c + n} \quad (\text{C.26})$$

$$P_{D,GG} = \frac{a}{a + b + c + n}. \quad (\text{C.27})$$

Nimmt man an, dass das Molekül sich zum Zeitpunkt ($t=0$) im offenen Zustand befindet, so gilt:

$$P_A(t = 0) + P_D(t = 0) = 1. \quad (\text{C.28})$$

Das gesamte System befindet sich also in einem der geöffneten Zustände. Für das Verhältnis der beiden Wahrscheinlichkeiten gilt

$$\frac{P_A(t = 0)}{P_D(t = 0)} = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad (\text{C.29})$$

Zusammengefasst gelten also die Anfangsbedingungen

$$P_A(t = 0) = \frac{k_3}{k_3 + k_{-3}} \quad (\text{C.30})$$

$$P_D(t = 0) = \frac{k_{-3}}{k_3 + k_{-3}}. \quad (\text{C.31})$$

Somit ergeben sich die Konstanten aus der Lösung der allgemeinen Differentialgleichung als

$$c1 = -\frac{k_0 + \omega_-}{(k_3 + k_{-3})(\omega_+ - \omega_-)} \quad (\text{C.32})$$

$$c2 = + \frac{k_0 + \omega_+}{(k_3 + k_{-3})(\omega_+ - \omega_-)}. \quad (\text{C.33})$$

C.3 Allgemeine Lösung der Differentialgleichungen

Die allgemeine Lösung der Differentialgleichung für den offenen Zustand erhält man aus der addierten Lösung für P_A und P_D :

$$\begin{aligned} P_{\text{Offen}}(t) &= P_A(t) + P_D(t) \\ &= c_1 e^{\omega_+ t} (k_3 + k_0 + k_{-3} + \omega_+) + c_2 e^{\omega_- t} (k_3 + k_0 + k_{-3} + \omega_-) \\ &= - \frac{k_0 + \omega_-}{(k_3 + k_{-3})(\omega_+ - \omega_-)} e^{\omega_+ t} (k_3 + k_0 + k_{-3} + \omega_+) \\ &\quad + \frac{k_0 + \omega_+}{(k_3 + k_{-3})(\omega_+ - \omega_-)} e^{\omega_- t} (k_3 + k_0 + k_{-3} + \omega_-). \end{aligned} \quad (\text{C.34})$$

Mit den Parametern a, b, c und n aus Gl.C.19-C.22 sowie ω_{\pm} aus Gl.C.6. Um die Lösung für den geschlossenen Fall zu erhalten, geht man analog vor und erhält für die Eigenwerte und die Eigenvektoren:

$$\omega_{\pm} = \frac{1}{2} \left(-(k_{-0} + k_2 + k_{-1} + k_1) \pm \sqrt{(k_{-0} + k_2 + k_{-1} + k_1)^2 - 4(k_{-0}k_2 + k_{-0}k_{-1} + k_2k_1)} \right). \quad (\text{C.35})$$

$$\vec{v}_+ = \begin{pmatrix} k_{-1} \\ k_{-0} + k_1 + \omega_+ \end{pmatrix} \quad (\text{C.36})$$

$$\vec{v}_- = \begin{pmatrix} k_{-1} \\ k_{-0} + k_1 + \omega_- \end{pmatrix}. \quad (\text{C.37})$$

Somit lautet die Lösung der Differentialgleichung:

$$\begin{pmatrix} P_B \\ P_C \end{pmatrix} = c_3 \begin{pmatrix} k_{-1} \\ k_{-0} + k_1 + \omega_+ \end{pmatrix} e^{\omega_+ t} + c_4 \begin{pmatrix} k_{-1} \\ k_{-0} + k_1 + \omega_- \end{pmatrix} e^{\omega_- t}. \quad (\text{C.38})$$

Die Konstanten lassen sich wie oben bestimmen:

$$c3 = - \frac{k_{-0} + \omega_+}{(k_1 + k_{-1})(\omega_+ - \omega_-)} \quad (\text{C.39})$$

$$c4 = + \frac{k_{-0} + \omega_+}{(k_1 + k_{-1})(\omega_+ - \omega_-)}. \quad (\text{C.40})$$

Die allgemeine Lösung für den geschlossenen Fall ist somit:

$$\begin{aligned}
P_{\text{Geschlossen}}(t) &= P_B(t) + P_C(t) \\
&= -\frac{k_{-0} + \omega_-}{(k_1 + k_{-1})(\omega_+ - \omega_-)} e^{\omega_+ t} (k_{-1} + k_{-0} + k_1 + \omega_+) \\
&\quad + \frac{k_{-0} + \omega_+}{(k_1 + k_{-1})(\omega_+ - \omega_-)} e^{\omega_- t} (k_{-1} + k_{-0} + k_1 + \omega_-).
\end{aligned} \tag{C.41}$$

Hierbei sind a , b , c und n aus Gleichungen C.19-C.22 und ω_{\pm} aus Gleichung C.35 zu verwenden. Die obigen Lösungen C.34 und C.41 zeigen dasselbe doppeltexponentielle Verhalten wie die Verteilung der Verweildauer im offenen Zustand mit niedrigem Energietransfer und die Verteilung im geschlossenen Zustand mit hohem Energietransfer (dargestellt in Abb.5.6). Setzt man die Ratenkonstanten von Hsp90 in Anwesenheit von 2 mM ATP aus Tabelle 5.2 in die Gleichung der Eigenwerte für den offenen Zustand C.6 ein, so erhält man Exponenten von $\omega_- = -1,5 \text{ s}^{-1}$ und $\omega_+ = -0,15 \text{ s}^{-1}$. Das Einsetzen der entsprechenden Ratenkonstanten in die Gleichung C.35 für den geschlossenen Zustand ergibt Exponenten von $\omega_- = -0,9 \text{ s}^{-1}$ und $\omega_+ = -0,2 \text{ s}^{-1}$. Der Doppelt-Exponentielle Fit an die Verteilungen der Verweildauer in Abb.5.2 liefert für den geschlossenen Zustand $\omega_- = -0,95 \text{ s}^{-1}$ und $\omega_+ = -0,15 \text{ s}^{-1}$ und für den offenen Zustand $\omega_- = -1,2 \text{ s}^{-1}$ und $\omega_+ = -0,12 \text{ s}^{-1}$. Prinzipiell lässt sich die Verteilung mit diesen Gleichungen annähern, jedoch ist die Methode der statistischen Monte-Carlo-Simulation dabei praktischer.

Literaturverzeichnis

- [1] WHITESELL, Luke ; LINDQUIST, Susan. L.: HSP90 and the chaperoning of cancer. In: *Nature Reviews Cancer* 5 (2005), Nr. 10, S. 761–772
- [2] TAKAYAMA, Shinichi ; REED, John C. ; HOMMA, Sachiko: Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. In: *Oncogene* 22 (2003), Nr. 56, S. 9041–9047
- [3] WEGELE, Harald ; MÜLLER, Lin ; BUCHNER, Johannes: Hsp70 and Hsp90 a relay team for protein folding. (2004), S. 1–44
- [4] ALI, Maruf M. U. ; ROE, S. M. ; VAUGHAN, Cara K. ; MEYER, Philippe ; PANARETOU, Barry ; PIPER, Peter W. ; PRODROMOU, Chrisostomos ; PEARL, Laurence H.: Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. In: *Nature* 440 (2006), Nr. 7087, S. 1013–1017
- [5] PEARL, Laurence H. ; PRODROMOU, Chrisostomos: Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. In: *Annual Review of Biochemistry* 75 (2006), S. 271–294
- [6] DUTTA, Rinku ; INOUE, Masayori: GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. In: *Trends in Biochemical Sciences* 25 (2000), Nr. 1, S. 24–28
- [7] BERGERAT, Agnes ; MASSY, Bernard de ; GADELLE, Danielle ; VAROUTAS, Paul-Christophe ; NICOLAS, Alain ; FORTERRE, Patrick: An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. In: *Nature* 386 (1997), Nr. 6623, S. 414–417
- [8] PANARETOU, Barry ; PRODROMOU, Chrisostomos ; ROE, S. M. ; O'BRIEN, R ; LADBURY, John E. ; PIPER, Peter W. ; PEARL, Laurence H.: ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. In: *Embo Journal* 17(16) (1998), S. 4829–36
- [9] HOWARD, Jonathon: *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer, 2001
- [10] MCCLAUGHLIN, Stephen H. ; SMITH, Harvey W. ; JACKSON, Sophie E.: Stimulation of the weak ATPase activity of human Hsp90 by a client protein. In: *Journal of Molecular Biology* 315 (2002), Nr. 4, S. 787–798

- [11] OBERMANN, Wolfgang M. J. ; SONDERMANN, Holger ; RUSSO, Alicia A. ; PAVLETICH, Nikola P. ; HARTL, F. U.: In Vivo Function of Hsp90 Is Dependent on ATP Binding and ATP Hydrolysis. In: *Journal of Cellular Biology* 143 (1998), Nr. 4, S. 901–910
- [12] RICHTER, Klaus ; REINSTEIN, Jochen ; BUCHNER, Johannes: N-terminal Residues Regulate the Catalytic Efficiency of the Hsp90 ATPase Cycle. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 47, S. 44905–44910
- [13] RICHTER, Klaus ; MUSCHLER, Paul ; HAINZL, Ottmar ; BUCHNER, Johannes: Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 36, S. 33689–33696
- [14] WEIKL, Tina ; MUSCHLER, Paul ; RICHTER, Klaus ; VEIT, Thomas ; REINSTEIN, Jochen ; BUCHNER, Johannes: C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. In: *Journal of Molecular Biology* 303 (2000), Nr. 4, S. 583–592
- [15] SHIAU, Andrew K. ; HARRIS, Seth F. ; SOUTHWORTH, Daniel R. ; AGARD, David A.: Structural Analysis of E. coli hsp90 Reveals Dramatic Nucleotide-Dependent Conformational Rearrangements. In: *Cell* 127 (2006), Nr. 2, S. 329–340
- [16] RICHTER, Klaus ; BUCHNER, Johannes: hsp90: Twist and Fold. In: *Cell* 127 (2006), Nr. 2, S. 251–253
- [17] SACHO, Elizabeth J. ; KADYROV, Farid A. ; MODRICH, Paul ; KUNKEL, Thomas A. ; ERIE, Dorothy A.: Direct Visualization of Asymmetric Adenine Nucleotide-Induced Conformational Changes in MutL α . In: *Molecular Cell* 29 (2008), Nr. 1, S. 112–121
- [18] POWERS, Marissa V. ; WORKMAN, Paul: Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. In: *Endocrine-Related Cancer* 13 (2006), S. S125–135
- [19] BROWN, Mark A. ; ZHU, Li ; SCHMIDT, Christian ; TUCKER, Philip. W.: Hsp90 - From signal transduction to cell transformation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363 (2007), Nr. 2, S. 241–246
- [20] WEINBERG, Robert A.: *Biology of Cancer*. Garland Science, 2006
- [21] LIN, K. ; ROCKLIFFE, Nichola ; JOHNSON, G. G. ; SHERRINGTON, Paul D. ; PETTITT, Andrew R.: Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53//ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. In: *Oncogene* 27 (2007), Nr. 17, S. 2445–2455
- [22] TALDONE, Tony ; GOZMAN, Alexander ; MAHARAJ, Ronnie ; CHIOSIS, Gabriela: Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. In: *Current Opinion in Pharmacology* 8 (2008), Nr. 4, S. 370–374

- [23] VASTAG, Brian: HSP-90 inhibitors promise to complement cancer therapies. In: *Nat Biotech* 24 (2006), Nr. 11, S. 1307–1307
- [24] DIETZ, Hendrik ; BORNSCHLÖGL, Thomas ; HEYM, Roland ; KÖNIG, Frauke ; RIEF, Matthias: Programming protein self assembly with coiled coils. In: *New Journal of Physics* 9 (2007), Nr. 11, S. 424–424
- [25] BORNSCHLÖGL, Thomas ; RIEF, Matthias: Single Molecule Unzipping of Coiled Coils: Sequence Resolved Stability Profiles. In: *Physical Review Letters* 96 (2006), Nr. 11, S. 118102–4
- [26] BORNSCHLÖGL, Thomas ; RIEF, Matthias: Single-Molecule Dynamics of Mechanical Coiled-Coil Unzipping. In: *Langmuir* 24 (2008), Nr. 4, S. 1338–1342
- [27] HESSLING, Martin: Persönliche Kommunikation. (2007)
- [28] RATZKE, Christoph: Master-Arbeit. (2008)
- [29] SAVAGE, Dean M. ; MATTSON, Gloria ; DESAI, Surbhi ; NIELANDER, George W. ; MORGENSEN, Sallie ; CONKLIN, Edward: *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*. Pierce Chemical Company, 1992
- [30] MERKEL, Rudolf ; NASSOY, Pierre ; LEUNG, Andrew ; RITCHIE, Ken ; EVANS, Evan: Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. In: *Nature* 397 (1999), Nr. 6714, S. 50–53
- [31] ROY, Rahul ; HOHNG, Sungchul ; HA, Taekjip: A practical guide to single-molecule FRET. In: *Nature Methods* 5 (2008), Nr. 6, S. 507–516
- [32] BRACHER, Andreas ; HARTL, F. U.: Hsp90 structure: when two ends meet. In: *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (2006), Nr. 6, S. 478–480. – 10.1038/nsmb0606-478
- [33] NELSON, David L. ; COX, M. Michael: *Lehninger Biochemie*. Springer, 2001
- [34] SCHMIDT, Thomas G. M. ; SKERRA, Arne: The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. In: *Nature Protocols* 2 (2007), Nr. 6, S. 1528–1535
- [35] RATZKE, Christoph: Bachelor-Arbeit. (2006)
- [36] CISSE, Ibrahim ; OKUMUS, Burak ; JOO, Chirlmin ; HA, Taekjip: Fueling protein-DNA interactions inside porous nanocontainers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007), Nr. 31, S. 12646–12650

- [37] SUBBARAO, Nanda K. ; MACDONALD, Ruby I. ; TAKESHITA, Keizo ; MACDONALD, Robert C.: Characteristics of spectrin-induced leakage of extruded, phosphatidylserine vesicles. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1063 (1991), Nr. 1, S. 147–154
- [38] MACDONALD, Robert.C. ; MACDONALD, Ruby.I. ; MENCO, Bert P. ; TAKESHITA, B.P. ; SUBBARAO, N.K. ; HU, Li-Rong.: Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. In: *Biochim Biophys Acta* 1061 (1991), S. 297–303
- [39] AXELROD, Daniel: Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. In: *Journal of Biomedical Optics* 6(1) (2000), S. 6–13
- [40] AXELROD, Daniel: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. In: *Traffic* 2 (2001), Nr. 11, S. 764–774
- [41] LAKOWICZ, Joseph R.: *Principle of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd Edition. Springer, 2006
- [42] HUGEL, Thorsten: Persönliche Kommunikation. (2008)
- [43] HA, Taekjip: Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer. In: *Nature Methods* 25 (2001), S. 78–86
- [44] HESSLING, Martin ; RICHTER, Klaus ; BUCHNER, Johannes: *Dissection of ATP-induced conformational steps in the reaction cycle of the molecular chaperone Hsp90*. 2008
- [45] KAPANIDIS, Achillefs N. ; LAURENCE, Ted A. ; LEE, Nam K. ; MARGEAT, Emmanuel ; KONG, Xiangxu ; WEISS, Shimon.: Alternating-Laser Excitation of Single Molecules. In: *Accounts of Chemical Research* 38 (2005), Nr. 7, S. 523–533
- [46] ANDRECKA, Joanna ; LEWIS, Robert ; BRÜCKNER, Florian ; LEHMANN, Elisabeth ; CRAMER, Patrick ; MICHAELIS, Jens: Single-molecule tracking of mRNA exiting from RNA polymerase II. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008), Nr. 1, S. 135–140
- [47] HA, Taekjip ; TING, Alice Y. ; LIANG, Joy ; CALDWELL, W. B. ; DENIZ, Ashok A. ; CHEMLA, Daniel S. ; SCHULTZ, Peter G. ; WEISS, Shimon: Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1999), Nr. 3, S. 893–898
- [48] JACKSON, John D.: *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter, 2002
- [49] HECHT, Eugene: *Optik*. Oldenbourg, 2005

- [50] FÖRSTER, Theodor: *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*. Vandenhoeck & Ruprecht, 1951
- [51] FÖRSTER, Theodor: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik*, 6.Folge. Band 2 (1948)
- [52] HOPPE, Walter ; LOHMANN, Wolfgang ; MARKL, Hubert: *Biophysik*. Springer Berlin, 1982
- [53] GUTFREUND, Herbert: *Kinetics for Life Sciences*. Cambridge University Press, 1995
- [54] FRAUENFELDER, Hans ; PARAK, Fritz ; YOUNG, R. D.: Conformational Substates in Proteins. In: *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 17 (1988), Nr. 1, S. 451–479
- [55] FRAUENFELDER, Hans ; SLIGAR, Stephen G. ; WOLYNES, Peter G.: The energy landscapes and motions of proteins. In: *Science* 254 (1991), Nr. 5038, S. 1598–1603
- [56] HENZLER-WILDMAN, Katherine ; KERN, Dorothee: Dynamic personalities of proteins. In: *Nature* 450 (2007), Nr. 7172, S. 964–972
- [57] STRYER, Lubert ; HAUGLAND, Richard P.: Energy transfer: a spectroscopic ruler. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58 (1967), S. 719–26
- [58] STRYER, Lubert: Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. In: *Annual Reviews Biochemistry* 47 (1978), S. 819–846
- [59] CLEGG, Robert M.: Fluorescence resonance energy transfer. In: *Current Opinion in Biotechnology* 6 (1995), Nr. 1, S. 103–110
- [60] SHIH, William M. ; GRZYCZYNSKI, Zygmunt ; LAKOWICZ, Joseph R. ; SPUDICH, James A.: A FRET-Based Sensor Reveals Large ATP Hydrolysis-Induced Conformational Changes and Three Distinct States of the Molecular Motor Myosin. In: *Cell* 102 (2000), Nr. 5, S. 683–694
- [61] WEISS, Shimon: Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. In: *Science* 283 (1999), Nr. 5408, S. 1676–1683
- [62] MOERNER, William E. ; KADOR, Lothar: Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. In: *Physical Review Letters* 62 (1989), May, Nr. 21, S. 2535–2538
- [63] ORRIT, Michel ; BERNARD, J.: Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. In: *Physical Review Letters* 65 (1990), Nov, Nr. 21, S. 2716–2719
- [64] BETZIG, Eric ; CHICHESTER, Robert J.: Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy. In: *Science* 262 (1993), Nr. 5138, S. 1422–1425

- [65] FUNATSU, Takashi ; HARADA, Yoshie ; TOKUNAGA, Makio ; SAITO, Kiwamu ; YANAGIDA, Toshio: Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. In: *Nature* 374 (1995), Nr. 6522, S. 555–559
- [66] LU, H. P. ; XUN, Luying ; XIE, X. S.: Single-Molecule Enzymatic Dynamics. In: *Science* 282 (1998), Nr. 5395, S. 1877–1882
- [67] HA, Taekjip ; ENDERLE, Thilo ; OGLETREE, Frank D. ; CHEMLA, Daniel S. ; SELVIN, Paul R. ; WEISS, Shimon: Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), Nr. 13, S. 6264–6268
- [68] MICKLER, Moritz ; SCHLEIFF, Enrico ; HUGEL, Thorsten: From Biological towards Artificial Molecular Motors. In: *Chemphyschem* 9 (2008), Nr. 11, S. 1503–1509
- [69] MICHALET, Xavier ; WEISS, Shimon ; JÄGER, Marcus: Single-Molecule Fluorescence Studies of Protein Folding and Conformational Dynamics. In: *Chemical Reviews* 106 (2006), Nr. 5, S. 1785–1813
- [70] SCHULER, Benjamin ; EATON, William A.: Protein folding studied by single-molecule FRET. In: *Current Opinion in Structural Biology* 18 (2008), Nr. 1, S. 16–26
- [71] ZHUANG, Xiaowei: Single-Molecule RNA Science. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 34 (2005), Nr. 1, S. 399–414
- [72] SMILEY, R. Derike ; HAMMES, Gordon G.: Single Molecule Studies of Enzyme Mechanisms. In: *Chemical Reviews* 106 (2006), Nr. 8, S. 3080–3094
- [73] JOO, Chirlmin ; BALCI, Hamza ; ISHITSUKA, Yuji ; BURANACHAI, Chittanon ; HA, Taekjip: Advances in Single-Molecule Fluorescence Methods for Molecular Biology. In: *Annual Review of Biochemistry* 77 (2008), Nr. 1, S. 51–76
- [74] BUSTAMANTE, Carlos: In singulo Biochemistry: When Less Is More. In: *Annual Review of Biochemistry* 77 (2008), Nr. 1, S. 45–50
- [75] MORI, Teppei ; VALE, Ronald D. ; TOMISHIGE, Michio: How kinesin waits between steps. In: *Nature* 450 (2007), Nr. 7170, S. 750–754
- [76] ZIMMERMANN, Boris ; DIEZ, Manuel ; BÖRSCH, Michael ; GRÄBER, Peter: Subunit movements in membrane-integrated EF0F1 during ATP synthesis detected by single-molecule spectroscopy. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757 (2006), Nr. 5-6, S. 311–319
- [77] MUSCHIELOK, Adam ; MICHAELIS, Jens: FRETnps. In: *Nature Methods* (2008)

- [78] CLEGG, Robert M. ; DAVID, M. J. L. ; JAMES, E. D.: Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. In: *Methods in Enzymology* Volume 211 (1992), S. 353–388
- [79] MICKLER, Moritz ; DIMA, Ruxandra I. ; DIETZ, Hendrik ; HYEON, Changbong ; THIRUMALAI, D. ; RIEF, Matthias: Revealing the bifurcation in the unfolding pathways of GFP by using single-molecule experiments and simulations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007), Nr. 51, S. 20268–20273
- [80] GEBHARDT, J. Christof M. ; CLEMEN, Anabel E. M. ; JAUD, Johann ; RIEF, Matthias: Myosin-V is a mechanical ratchet. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 23, S. 8680–8685
- [81] ROY, Rahul ; KOZLOV, Alexander G. ; LOHMAN, Timothy M. ; HA, Taekjip: Dynamic Structural Rearrangements Between DNA Binding Modes of E. coli SSB Protein. In: *Journal of Molecular Biology* 369 (2007), Nr. 5, S. 1244–1257
- [82] LEO, William R.: *Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments*. Springer-Verlag, New York, LLC, 1994
- [83] GILLESPIE, Daniel T.: Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. In: *Journal of Physical Chemistry* 81(25) (1977), S. 2340–2361
- [84] SLEPOY, Alexander ; THOMPSON, Aidan P. ; PLIMPTON, Steven J.: A constant-time kinetic Monte Carlo algorithm for simulation of large biochemical reaction networks. In: *The Journal of Chemical Physics* 128 (2008), Nr. 20, S. 205101
- [85] FREY, Erwin: Persönliche Kommunikation. (2008)
- [86] BRONSTEIN, Ilja A. ; SEMENDJAJEW, Konstantin A. ; MUSIOL, Gerhard ; MÜHLIG, Heiner: *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, 1999
- [87] SCHWILLE, Petra: Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. In: *Cell Biochem Biophys* 34 (2001), S. 383–408
- [88] MÜLLER, Barbara K. ; REUTER, Andreas ; SIMMEL, Fritz C. ; LAMB, Don C.: Single-pair FRET characterization of DNA tweezers. In: *Nano Letters* 6 (2006), Nr. 12, S. 2814–2820
- [89] MÜLLER, Barbara K. ; ZAYCHIKOV, Evgeny ; BRÄUCHLE, Christoph ; LAMB, Don C.: Pulsed interleaved excitation. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), Nr. 5, S. 3508–3522
- [90] KRUKENBERG, Kristin A. ; FÖRSTER, Friedrich ; RICE, Luke M. ; SALI, Andrej ; AGARD, David A.: Multiple Conformations of E. coli Hsp90 in Solution: Insights into the Conformational Dynamics of Hsp90. In: *Structure* 16 (2008), Nr. 5, S. 755–765

- [91] BRON, Patrick ; GIUDICE, Emmanuel ; ROLLAND, Jean-Paul ; BUEY, Rubén M. ; BARBIER, Pascale ; DIAZ, J. F. ; PEYROT, Vincent ; THOMAS, Daniel ; GARNIER, Cyrille: Apo-Hsp90 coexists in two open conformational states in solution. In: *Biology of the Cell* 100 (2008), Nr. 7, S. 413–425
- [92] HARRIS, Seth F. ; SHIAU, Andrew K. ; AGARD, David A.: The Crystal Structure of the Carboxy-Terminal Dimerization Domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, Reveals a Potential Substrate Binding Site. In: *Structure* 12 (2004), Nr. 6, S. 1087–1097
- [93] COLOMBO, Giorgio ; MORRA, Giulia ; MELI, Massimiliano ; VERKHIVKER, Gennady: Understanding ligand-based modulation of the Hsp90 molecular chaperone dynamics at atomic resolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008), Nr. 23, S. 7976–7981
- [94] LAPIDUS, Lisa J. ; EATON, William A. ; HOFRICHTER, James: Measuring the rate of intramolecular contact formation in polypeptides. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), Nr. 13, S. 7220–7225
- [95] YANG, Wei Y. ; GRUEBELE, Martin: Folding at the speed limit. In: *Nature* 423 (2003), Nr. 6936, S. 193–197
- [96] MICKLER, Moritz ; HESSLING, Martin ; RATZKE, Christoph ; BUCHNER, Johannes ; HUGEL, Thorsten: The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP-hydrolysis. In: *submitted* (2009)
- [97] WAYNE, Natalie ; BOLON, Daniel N.: Dimerization of Hsp90 Is Required for in Vivo Function: Design and Analysis of Monomers and Dimers. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), Nr. 48, S. 35386–35395
- [98] WOHLFAHRT, Christian ; WOHLFAHRT, Barbara: *Landolt-Börnstein: Viscosity of Pure Organic Liquids and Binary Liquid Mixtures, Subvolume A: Pure Organometallic and Organononmetallic Liquids, Binary Liquid Mixtures*. Springer, 2001
- [99] HUGEL, Thorsten ; MICHAELIS, Jens ; HETHERINGTON, Craig L. ; JARDINE, Paul J. ; GRIMES, Shelley ; WALTER, Jessica M. ; FALK, Wayne ; ANDERSON, Dwight L. ; BUSTAMANTE, Carlos: Experimental test of connector rotation during DNA packaging into bacteriophage phi 29 capsids. In: *Plos Biology* 5 (2007), Nr. 3, S. 558–567
- [100] RICHTER, Klaus ; SOROKA, Joanna ; SKALNIAK, Lukasz ; LESKOVAR, Adriane ; HESSLING, Martin ; REINSTEIN, Jochen ; BUCHNER, Johannes: Conserved Conformational Changes in the ATPase Cycle of Human Hsp90. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), Nr. 26, S. 17757–17765
- [101] MULLER, Petr ; HRSTKA, Roman ; COOMBER, David ; LANE, David P. ; VOJTESEK, Borivoj: Chaperone-dependent stabilization and degradation of p53 mutants. In: *Oncogene* 27 (2008), Nr. 24, S. 3371–3383

- [102] JOERGER, Andreas C. ; FERSHT, Alan R.: Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. In: *Annual Review of Biochemistry* 77 (2008), Nr. 1, S. 557–582
- [103] NORBY, Jens G.: Coupled Assay of Na⁺,K⁺-Atpase activity. In: *Methods in Enzymology* 156 (1988), S. 116–119
- [104] ALI, Janid A. ; JACKSON, Andrew P. ; HOWELLS, Alison J. ; MAXWELL, Anthony: The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. In: *Biochemistry* 32 (1993), Nr. 10, S. 2717–2724
- [105] REIKA, Watanabe ; RYOJI, Masui ; TSUTOMU, Mikawa ; SATOKO, Takamatsu ; RYUICHI, Kato ; SEIKI, Kuramitsu: Interaction of Escherichia coli RecA Protein with ATP and Its Analogues. In: *Journal of Biochemistry* 116 (1994), S. 960–966
- [106] WALKER, John M. (Hrsg.): *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, 2005 <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich im Folgenden danken möchte.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Thorsten Hugel danken, der mich stets unterstützte, und meine Daten mit mir in Ruhe diskutierte. Seine Ideen und Anregungen haben die Doktorarbeit wesentlich geprägt.

Großer Dank gebührt auch Christoph Ratzke, ohne dessen biochemische Expertise und kritischen Enthusiasmus ich die Experimente niemals in diesem Umfang und mit der Qualität hätte durchführen können.

Weiter möchte ich Martin Hessling danken, für die Herstellung der Mutanten und die umfangreiche biochemische Arbeit die das Fundament dieser Arbeit bilden. Ich danke außerdem für die großen Mengen an Protein, die ich verwenden durfte. Prof. Dr. Johannes Buchner und Dr. Klaus Richter danke ich für die kritische und fruchtbare Diskussionen der experimentellen Daten und deren Interpretation. Prof. Dr. Matthias Rief hatte genau die richtigen Ideen zur Verbesserung der Experimente und der Auswertung der Daten, Danke dafür. Dank gebührt ebenfalls Prof. Dr. Ralf Metzler der mir bei der Auswertung und Interpretation der Daten sehr geholfen hat. Ich danke Boqiao Sun und Roland Lederle, die zu diesem Projekt mit ihren Bachelor-Arbeiten beigetragen haben. Daniela Aschenbrenner, Susanne Halbritter, Markus Jahn und Thorben Seggebrock danke ich für ihren Beitrag zum Hsp90-Projekt als Werkstudenten bzw. Praktikanten. Adam Muschielok danke ich für die Anwendung seines FRETnps-Programms auf die Hsp90-Daten.

Meinen Kollegen Thomas Bornschlögl, Hendrik Dietz, Markus Harasim, Sebastian Ramensee, Monika Rusp, Emanuel Schneck, Thomas Schubert, Angeliki Tsokou und Bernhard Wunderlich danke ich für gut investierte Zeit in der Kaffeecke und anderen Orten.

Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie mich Zeit meines Lebens in allen Dingen unterstützt haben.

Zu guter Letzt danke ich Frauke König dafür, dass sie mit mir die schönen Dinge des Lebens teilt.