

Christian Götz

Spektroskopische Studien zur Untersuchung
von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen
und Proteindynamik
an der Dengue-Virus NS2B-NS3-Protease

Mainz, 2024

Spektroskopische Studien zur Untersuchung von
Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen und
Proteindynamik an der Dengue-Virus
NS2B-NS3-Protease

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Christian Götz

geb. in Worms

Mainz, 2024

Dekanin: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatterin: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: [REDACTED]

*Diese Arbeit ist meiner Familie, insbesondere meiner Tochter Hannah,
für die ich in den vergangenen Monaten zu wenig Zeit hatte,
gewidmet. Das Versäumte werde ich nachholen.*

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | v |
| 1 Einleitung und Motivation | 1 |
| 2 Theoretische Grundlagen | 5 |
| 2.1 Dengue-Virus | 5 |
| 2.1.1 Krankheitsverlauf und Therapie..... | 6 |
| 2.1.2 Struktur und Virusreplikation | 7 |
| 2.1.3 Flavivirale NS2B-NS3-Protease | 9 |
| 2.1.3.1 Aufbau und katalytische Aktivität..... | 9 |
| 2.1.3.2 Struktur und Konformationsdynamik..... | 10 |
| 2.1.3.3 Inhibitoren | 13 |
| 2.2 Mikroskopie und Spektroskopie..... | 14 |
| 2.2.1 Photophysik von Farbstoffmolekülen | 15 |
| 2.2.2 Elektronischer Energietransfer..... | 17 |
| 2.2.2.1 Einleitung | 17 |
| 2.2.2.2 Förster-Theorie und Förster-Resonanzenergietransfer..... | 19 |
| 2.2.2.3 Messung der Energietransfereffizienz..... | 24 |
| 2.2.3 Optische Fluoreszenzspektroskopie einzelner Moleküle | 26 |
| 2.2.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie..... | 27 |
| 2.2.3.2 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie | 29 |
| 2.2.3.3 FCS-FRET-Experiment..... | 32 |
| 2.2.3.4 Einzelmolekül-FRET-Experimente..... | 35 |
| smFRET-Messungen in Lösung: Burst-Analyse und MFD..... | 36 |
| smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen | 37 |
| 2.2.4 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung..... | 40 |
| 3 Experimentelles | 41 |
| 3.1 Untersuchte Proben | 41 |
| 3.1.1 Farbstoffe | 41 |
| 3.1.2 DENV-2-PR | 43 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.1.2.1 | Proteinkonstrukte..... | 43 |
| 3.1.2.2 | Proteinexpression und -reinigung..... | 44 |
| 3.1.2.3 | Farbstoffmarkierung..... | 44 |
| | Einfach markierte DENV-2-PRs..... | 45 |
| | FRET-Paar markierte DENV-2-PRs..... | 46 |
| 3.1.3 | Liganden..... | 48 |
| 3.1.4 | Puffer der DENV-2-PR..... | 50 |
| 3.1.5 | FRET-Paar markierte dsDNA..... | 51 |
| 3.2 | Probenpräparation für konfokale Fluoreszenzmessungen..... | 53 |
| 3.3 | Experimentelle Aufbauten..... | 54 |
| 3.3.1 | Ensemblespektroskopie..... | 54 |
| 3.3.2 | Konfokales Fluoreszenzmikroskop..... | 55 |
| 3.4 | Versuchsdurchführung und Datenanalyse..... | 57 |
| 3.4.1 | Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen..... | 57 |
| 3.4.1.1 | Einfach markierte PRs und nicht-markierte Liganden..... | 57 |
| | Spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkungen..... | 57 |
| | Spektroskopische Titration..... | 59 |
| | <i>Chase</i> -Experiment..... | 61 |
| 3.4.1.2 | WT-PR und markierte Liganden: FCS-Bindestudien..... | 61 |
| 3.4.2 | Untersuchung der Proteindynamik..... | 64 |
| 3.4.2.1 | Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung..... | 64 |
| 3.4.2.2 | TCSPC-Messungen im Ensemble..... | 69 |
| 3.4.2.3 | smFRET-Messungen an immobilisierten PRs..... | 70 |
| 4 | Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen | 73 |
| 4.1 | Einfach markierte PRs und nicht-markierte Liganden..... | 73 |
| 4.1.1 | Spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkungen..... | 73 |
| 4.1.2 | Spektroskopische Titration..... | 77 |
| 4.1.3 | <i>Chase</i> -Experiment..... | 80 |
| 4.2 | WT-PR und markierte Liganden: FCS-Bindestudien..... | 80 |
| 5 | Untersuchung der Proteindynamik | 83 |
| 5.1 | Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung..... | 83 |
| 5.1.1 | FRET-Paar markierte dsDNA als Referenzsystem..... | 84 |
| 5.1.2 | FRET-Paar markierte PRs vor und nach Zugabe diverser Liganden..... | 86 |
| 5.1.2.1 | S79C-G14C..... | 86 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.1.2.2 | S79C-S158C A..... | 90 |
| 5.1.2.3 | S79C-S158C B..... | 96 |
| 5.2 | smFRET-Messungen an immobilisierten PRs | 101 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick | 107 |
| A | Anhang | 111 |
| A.1 | Untersuchung von Protein Ligand-Bindungswechselwirkungen | 111 |
| A.1.1 | Spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkungen..... | 111 |
| A.1.2 | Spektroskopische Titration..... | 113 |
| A.1.3 | FCS-Bindestudien | 113 |
| A.2 | Untersuchung der Proteindynamik..... | 114 |
| A.2.1 | FRET-Paar markierte dsDNA: Spektroskopische Charakterisierung ... | 114 |
| A.2.2 | FRET-Paar markierte PRs: Spektroskopische Charakterisierung..... | 114 |
| A.2.3 | FRET-Paar markierte PRs: TCSPC-Messungen im Ensemble..... | 116 |
| | Literatur | 119 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| A | Akzeptor-Molekül |
| ADE | antikörperabhängige Verstärkung (<i>antibody-dependent enhancement</i>) |
| AF | Anregungsfilter |
| AK | Auskoppler |
| APD | Avalanche-Photodiode |
| BP | Bandpassfilter |
| C | Cystein |
| CCD | <i>charge coupled device</i> |
| CEF | räumliche Verteilung der Detektionseffizienz (<i>collection efficiency function</i>) |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat |
| C-Protein | Capsidprotein |
| D | Donor-Molekül |
| DENV | Dengue-Virus |
| DENV-2-PR | NS2B-NS3-Protease des Serotyps 2 des Dengue-Virus |
| DENV-PR | NS2B-NS3-Protease des Dengue-Virus |
| DF | Dengue-Fieber |
| DHF | hämorrhagisches Dengue-Fieber |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DSS | Dengue-Schock-Syndrom |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| eCDF | empirische kumulative Verteilungsfunktion (<i>empirical cumulative distribution function</i>) |
| E-Protein | Hüllprotein |
| FCS | Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>) |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| G, Gly | Glycin |
| H, His | Histidin |

| | |
|--------------------|--|
| His-Tag | Hexahistidin-Rest |
| IC | innere Umwandlung (<i>internal conversion</i>) |
| IDA | Iminodiessigsäure (<i>iminodiacetic acid</i>) |
| IPTG | Isopropyl-D-thiogalactopyranosid |
| ISC | Interkombination (<i>intersystem crossing</i>) |
| L _A | achromatische Linse |
| LB | Lochblende |
| L _D | Detektionslinse |
| LMG | Leistungsmessgerät |
| LP | Langpassfilter |
| MFD | Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (<i>multiparameter fluorescence detection</i>) |
| M-Protein | Membranprotein |
| NMR | Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>) |
| NS | nicht-strukturelles Protein |
| NS2B _{cf} | NS2B-Cofaktor |
| NS3 _{pro} | NS3-Protease-Domäne |
| NTA | Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>) |
| PDB-Code | Protein Data Bank Code |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PR | Protease |
| prM-Protein | Vorläuferform (<i>precursor</i>) des Membranproteins |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| S, Ser | Serin |
| Sh | <i>shutter</i> |
| smFRET | Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (<i>single-molecule Förster resonance energy transfer</i>) |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin |
| TCSPC | zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (<i>time-correlated single-photon counting</i>) |
| TIRFM | interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TTTR | <i>time-tagged time-resolved</i> |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>) |
| WT | Wildtyp |
| WT-PR | Wildtyp-Protease |

1 Einleitung und Motivation

„Wir befinden uns im Krieg mit der Mücke. Eine schwärmende und blutrünstige Armee von 110 Billionen feindlicher Stechmücken patrouilliert über jeden Quadratzentimeter des Globus“ [1]. Mit diesen markigen Worten eröffnet der Militärhistoriker Timothy C. Winegard seinen 2020 in deutscher Sprache erschienenen New York Times Bestseller „Die Mücke“. Bereits einige Jahre zuvor, im April 2014, warnte Bill Gates vor der Stechmücke und bezeichnete diese als „das tödlichste Tier der Welt“ [2]. Kurze Zeit später, unter dem Eindruck einer verheerenden Zika-Epidemie, mit welcher sich Brasilien 2015 konfrontiert sah [3, 4], widmete das Nachrichtenmagazin „Der Spiegel“ gar eine Titelgeschichte – „Das gefährlichste Tier der Welt – Die tödliche Invasion der Mücken“ – der Stechmücke [5]. Die vorstehend skizzierte, teils sicherlich hyperbolische Rhetorik ist dem Umstand geschuldet, dass Stechmücken Vektoren zahlreicher, zum Teil lebensbedrohlicher Infektionserreger sind [6–8]. So infizieren sich fast 700 Millionen Menschen jährlich mit einer durch Moskitos übertragenen Krankheit, wobei schätzungsweise mehr als eine Million dieser Infektionen tödlich verlaufen [8, 9]. Neben der Malaria, die mit geschätzt 627 000 Todesopfern im Jahr 2020 [10] nach wie vor eine der drei lebensbedrohlichsten Infektionskrankheiten [11] darstellt, bereitet vor allem das Dengue-Virus (DENV) der Weltgemeinschaft große Sorgen. Dieses wird durch Stechmücken der Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* [12], welche überwiegend in den Tropen und Subtropen beheimatet sind [13], übertragen und gilt als das sich am schnellsten ausbreitende, von Moskitos übertragene Virus weltweit [7, 14]. So hat sich allein in den zurückliegenden zwei Dekaden die Zahl der bei der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) registrierten DENV-Infektionen mehr als verachtfacht [15]. Schätzungen zufolge treten global jährlich ca. 390 Millionen DENV-Infektionen auf [16], infolge derer ca. 10 000 Patienten versterben [17]. Die Ursachen der immensen Ausbreitung sind äußerst vielschichtig und umfassen neben dem Klimawandel auch die unkontrollierte Urbanisierung in tropischen Entwicklungsländern sowie den weltweiten Handel und Reiseverkehr [18]. In den vergangenen 60 Jahren breiteten sich das DENV und dessen Vektoren primär in der tropischen Welt aus, sodass derzeit ca. die Hälfte der Weltbevölkerung in Risikogebieten des DENV lebt [13]. Aktuelle Prognosen zufolge wird sich das Risikogebiet einer DENV-Infektion, insbesondere aufgrund des Klimawandels, ausgehend von den Tropen und Subtropen weiter nach Norden und Süden und somit in Richtung Europa, Nordamerika und Australien ausdehnen [13]. Somit werden künftig auch finanzstarke Länder in zunehmendem Maße durch das DENV bedroht werden. Neben der augenscheinlichen Krankheitslast sind die wirtschaftlichen Schäden, welche durch Infektionen mit dem DENV hervorgerufen werden, immens. So verursachten Dengue-Erkrankungen allein auf dem amerikanischen Kontinent im Zeitraum von 2000 bis 2007 jährliche Kosten in Höhe von durchschnittlich ca. 2,1 Milliarden US-Dollar [19]. Dieser Betrag berücksichtigt weder Präventionskosten noch Einnahmeverluste der Tourismusbranche [19]. Letztere können jedoch erheblich sein. Beispielsweise beziffert eine Studie aus dem Jahr 2009 die Einnahmeverluste der thailändischen Tourismusbranche, welche dieser durch einen größeren Dengue-Ausbruch entstehen könnten, auf 363 Millionen US-Dollar [20].

1 Einleitung und Motivation

Trotz dieser besorgniserregenden Situation sind bisher keine wirksamen antiviralen Pharmaka zur Behandlung von DENV-Infektionen verfügbar [21, 22], sodass ein dringender Bedarf an der Entwicklung entsprechender Therapeutika besteht [23, 24]. Während diesem Bedarf lange Zeit nur wenige Studien zur Wirkstoffentwicklung gegenüberstanden [25], konnte in jüngster Vergangenheit diesbezüglich ein deutlich gesteigertes Forschungsinteresse verzeichnet werden [24]. Triebkraft dieser Tendenz ist nicht zuletzt auch die wirtschaftliche Entwicklung der Endemiegebiete und die damit einhergehende Entstehung wirtschaftlich rentabler Märkte [25].

Im Rahmen der Entwicklung entsprechender Medikamente stellt die NS2B-NS3-Protease des DENV (DENV-PR) aufgrund ihrer zentralen Funktion im viralen Replikationszyklus eine attraktive Zielstruktur potentieller Wirkstoffkandidaten dar [26]. Auf der Suche nach wirkungsvollen Inhibitoren der DENV-PR konzentrierte sich die Mehrheit der Anstrengungen zunächst auf die Entwicklung von Verbindungen, welche das aktive Zentrum adressieren [27, 28]. Allerdings leiden diese kompetitiven Inhibitoren aufgrund der geladenen sowie flachen Struktur des aktiven Zentrums oftmals unter geringen Bioverfügbarkeiten [26, 27] und mangelhaften Selektivitäten [27], sodass deren Einsatzpotential deutliche Einschränkungen aufweist. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, könnte die Entwicklung von Inhibitoren, die nicht an das aktive Zentrum, sondern an eine andere Region der Protease (PR) binden, forciert werden. Folglich bietet die Identifizierung einer mutmaßlichen allosterischen Bindetasche eine interessante Alternative zur effektiven Hemmung der PR mittels allosterischer Inhibitoren [27–29]. Der Ansatz der allosterischen Hemmung ist bislang jedoch nicht ausreichend erforscht, sodass die entsprechenden Inhibitoren aktuell noch insuffiziente Bindungsaffinitäten aufweisen [21].

Die vorliegende Arbeit möchte daher einen Beitrag zur Entwicklung neuer, wirksamerer Inhibitoren leisten. Hierzu wurden unterschiedliche fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen, die das übergeordnete Ziel verfolgten, notwendige Informationen für ein rationales Wirkstoffdesign zu liefern, durchgeführt. Klassischerweise wird die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit dem vorrangigen Ziel verfolgt, Verbindungen, welche mit hoher Affinität an ihr Target binden, zu identifizieren [30–32]. Allerdings wird zunehmend anerkannt, dass neben der Optimierung der Bindungsaffinität auch die Geschwindigkeit, mit welcher Wirkstoffe von ihrer Zielstruktur dissoziieren bzw. mit dieser assoziieren, sowohl Wirksamkeit als auch Sicherheit von Arzneimitteln direkt beeinflusst [32–34]. Daher beschäftigten sich die Experimente des ersten Themenkomplexes dieser Studie mit der Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen zwischen der DENV-PR und verschiedenen allosterischen Inhibitoren. Hierzu wurden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Vorgehensweisen verfolgt.

Im Rahmen des ersten Projektes wurde das Enzym mit einer Farbstoffsonde ausgestattet. In der Folge wurde auf Ensemble-Ebene untersucht, ob die Bindung nicht-markierter Liganden an das farbstoffmarkierte Protein Änderungen der photophysikalischen Parameter des Fluorophors hervorruft. Diese Methodik basiert auf der Beobachtung, dass die photophysikalischen Charakteristika eines Farbstoffes sensitiv auf dessen Umgebung und deren Änderung reagieren können [35–37]. Konnten im Rahmen der fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen photophysikalische Parameter, welche sensitiv auf die Bindung eines Liganden reagierten, gefunden werden, so sollte in einem zweiten Schritt mittels einer spektroskopischen Titration Zugang zur Dissoziationskonstanten K_D des entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes hergestellt werden [37]. Ferner wurde die Reversibilität der entsprechenden Bindungswechselwirkung mithilfe eines *Chase*-Experimentes überprüft [37]. Mit der Absicht die jeweilige Bindungskinetik zu entschlüsseln, wurde schließlich getestet, ob die Änderungen der entsprechenden spektroskopischen Parameter auch auf Einzelmolekülebene detektiert werden können [38–40]. Beispielsweise gelang es Marko *et al.*, die Assoziation und Dissoziation einzelner Enzym-Substrat-Komplexe mithilfe eines an das Substrat gebundenen Fluorophors, dessen Fluoreszenzintensität sensitiv auf die Bindung und Freisetzung des Enzyms reagierte, in Echtzeit zu verfolgen und hieraus die Geschwindigkeitskonstanten beider Prozesse zu extrahieren [39]. Prinzipiell

kann der Fortgang jeder Reaktion, deren Verlauf an eine messbare Änderung eines beliebigen photophysikalischen Charakteristikums der gewählten Fluoreszenzsonde gekoppelt ist, mithilfe eines Einzelmolekülexperimentes verfolgt werden [41]. Da bekannt ist, dass u. a. auch die Fluoreszenzlebensdauer [35, 37, 42–44], das Emissions- [36, 37, 42] und Anregungsspektrum [37, 45, 46], die Triplettlebensdauer [47, 48] sowie die Fluoreszenzanisotropie [37] eines Farbstoffes sensitiv auf Umgebungsänderungen reagieren können, steht ein breites Parameterfeld zur Untersuchung zeitabhängiger Prozesse zur Verfügung.

Als alternative Herangehensweise zur Untersuchung der Bindungswechselwirkungen zwischen Protein und Ligand wurden in einem weiteren Projekt farbstoffmarkierte allosterische Inhibitoren im Rahmen von Bindestudien, welche auf der Methodik der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) basieren, jeweils gegen den nicht-markierten Wildtyp (WT) der PR (WT-PR) titriert. Hierbei wurde jeder Titrationspunkt durch eine FCS-Messung mit anschließender Berechnung einer Autokorrelationsfunktion charakterisiert. Da mit steigender Konzentration der WT-PR der Anteil der farbstoffmarkierten Liganden, welche innerhalb des langsamer diffundierenden Enzym-Inhibitor-Komplexes gebunden sind, sukzessive steigt, kann mit solchen Messungen prinzipiell die Dissoziationskonstante des Komplexes bestimmt werden [49–51].

Um die Grundlage für ein rationales Wirkstoffdesign zu schaffen, sind neben einem fundierten Wissen über die Bindungswechselwirkungen zwischen einem Wirkstoffkandidaten und seiner Zielstruktur auch Kenntnisse über die strukturellen Gegebenheiten des Targets notwendig [52–56]. Die Röntgenkristallographie ist seit langem eine der am häufigsten verwendeten Techniken zur Strukturaufklärung in der Arzneimittelforschung [55]. Folglich basieren viele Wirkstoffscreening-Kampagnen auf Docking-Studien, welche lediglich eine einzige, statische Struktur des jeweiligen Targets berücksichtigen [57]. Allerdings ist es im Sinne einer erfolgreichen Wirkstoffforschung auch von Bedeutung die Dynamik der Zielstruktur zu entschlüsseln, um somit evaluieren zu können, ob alternative Konformationen, die nicht mithilfe von Kristallstrukturen beobachtbar sind, eingenommen und damit durch den potentiellen Wirkstoff adressiert werden können [55]. Daher widmete sich der zweite Themenkomplex dieser Arbeit der Untersuchung der Proteindynamik der DENV-PR.

Kenntnisse über die strukturelle Dynamik der Zielstruktur sind vor allem im Falle der DENV-PR nützlich, da angenommen wird, dass deren katalytische Aktivität an einen Konformationsübergang gekoppelt ist [22, 58]. So wurden im Zuge von Röntgenbeugungsexperimenten primär zwei unterschiedliche Konformationen des Enzyms, die als offen bzw. geschlossen bezeichnet werden, identifiziert [21]. Hierbei erlauben die kristallographischen Untersuchungen die Annahme, dass die Bildung der geschlossenen Konformation das Resultat der Bindung eines Liganden an das aktive Zentrum des Enzyms darstellt [27, 29]. Allerdings scheint die Situation in Lösung nach aktuellem Forschungsstand komplizierter zu sein [59]. Daher ist trotz der allgemein verbreiteten Annahme, dass die geschlossene Konformation den katalytisch aktiven Zustand repräsentiert [26, 60, 61], die gesamte konformationelle Dynamik der PR nicht ausreichend verstanden. Bspw. konnten im Rahmen zweier NMR-Studien, welche unter Verwendung verschiedenartiger Spin-Label (^{19}F - bzw. Lanthanid-Label) in Lösung durchgeführt wurden, mindestens zwei unterschiedliche Spezies nachgewiesen werden. Diese wurden als zwei Konformationen interpretiert [59, 62]. Während die ^{19}F -NMR-spektroskopische Untersuchung jedoch Hinweise dafür liefert, dass im Falle des ungebundenen Enzyms sowohl die offene als auch die geschlossene Konformation in einem Gleichgewicht nebeneinander vorliegen [59], resümierten die Autoren der Lanthanid-NMR-Studie, dass in Abwesenheit jeglicher Liganden lediglich ein Ensemble an offenen Konformationen existiert [62]. Dahingegen stellten die Autoren beider Studien übereinstimmend fest, dass die Zugabe eines kompetitiven Inhibitors die Ausbildung der geschlossenen Konformation begünstigt [59] bzw. induziert [62]. Diese Beobachtung deckt sich mit der in der Fachliteratur weit verbreiteten Annahme, dass die Bildung

1 Einleitung und Motivation

des geschlossenen Zustandes das Ergebnis einer Ligandenbindung an das aktive Zentrum der PR darstellt [60]. Allerdings bleibt der Mechanismus, durch welchen die Ligandenbindung und der Konformationswechsel miteinander gekoppelt sind, umstritten, da sowohl über eine Konformationsauswahl (*conformational selection*) [63] als auch über eine induzierte Anpassung (*induced fit*) [27, 60] berichtet wurde. Auch der Einfluss allosterischer Inhibitoren auf die Konformation der PR war lange Zeit nicht abschließend geklärt. Daher stellten Brecher *et al.* 2017 einen Lumineszenz-Assay, welcher die Visualisierung von Konformationsänderungen des Enzyms ermöglichte, vor [27]. Mithilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines kompetitiven Inhibitors die Bildung der geschlossenen Konformation hervorrief, wohingegen die Bindung eines allosterischen Inhibitors die Ausbildung des katalytisch aktiven Zustands verhinderte. Allerdings konnten keine Schlussfolgerungen hinsichtlich der relativen Besetzung und der tatsächlichen Konformationszustände einzelner Subpopulationen gezogen werden [52]. Außerdem blieb die Frage unbeantwortet, ob in Abwesenheit eines jeglichen Liganden ein dynamisches Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation besteht [52]. Erst kürzlich – noch während des Verfassens dieser Arbeit – konnten Maus *et al.* mithilfe eines kompetitiven Assays, welcher auf der Methodik des Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfers (*single-molecule FRET*, smFRET) basiert, den Nachweis erbringen, dass allosterische Liganden den offenen, katalytisch inaktiven Zustand des Proteins stabilisieren [64].

Mit der Absicht zu einem besseren Verständnis der Proteindynamik beizutragen, wurde daher in der zweiten Hälfte der vorliegenden Dissertation untersucht, ob und wie sich in Lösung unterschiedliche Konformationen des Enzyms im Gleichgewicht befinden. Weiterhin sollte der Einfluss eines kompetitiven und eines allosterischen Inhibitors sowie zweier Substrate auf das konformationelle Gleichgewicht analysiert werden. Die smFRET-Methodik stellt ein mächtiges Instrument zur Detektion von konformationellen Subpopulationen sowie Konformationsänderungen dar [65] und scheint daher zur Klärung solcher Fragestellungen prädestiniert. Beispielsweise gelang es in der Vergangenheit mithilfe dieser Methodik, die Konformationsdynamik von Proteinen [66, 67], darunter auch Proteasen [68], sowie den Einfluss von Liganden auf die Konformation von Biomolekülen [69–72] aufzuklären. Daher wurde das Enzym mit einem FRET-Farbstoffpaar markiert und mithilfe eines konfokalen Mikroskops verschiedenen smFRET-Messungen unterzogen. Zunächst wurden in einem ersten Teilprojekt frei in Lösung diffundierende PR-Moleküle jeweils vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden untersucht. Um abschätzen zu können, ob ein dynamisches Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen des Enzyms vorliegt und inwiefern dieses durch die Zugabe unterschiedlicher Liganden beeinflusst wird, wurden die Datensätze zunächst einer qualitativen Korrelationsanalyse unterzogen [73]. Um Aussagen über eventuell vorhandene Subpopulationen treffen zu können, wurden die Daten anschließend auf Einzelmolekülebene betrachtet (smFRET in Lösung) [65]. Hierzu wurden einzelne Fluoreszenzbursts, welche auf den Transit individueller PR-Moleküle durch das Anregungsvolumen zurückzuführen sind, analysiert und deren Häufigkeit in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach Energietransfereffizienz und mittlerer Donor-Lebenszeit, aufgetragen. Neben der Identifikation von Subpopulationen kann mithilfe der 2D-Histogramme beurteilt werden, ob ein Ligand eine bestimmte Enzymkonformation stabilisiert. Auch bietet der Vergleich der Lage einzelner Subpopulationen relativ zur statischen FRET-Linie einen weiteren qualitativen Indikator für das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Konformationsdynamik [74, 75].

Zum Abschluss dieser Arbeit stand die Quantifizierung der Proteindynamik im Fokus der Untersuchungen. Hierzu wurden smFRET-Messungen an immobilisierten PR-Molekülen durchgeführt. Mithilfe einer Stufenanalyse konnten einzelne Konformationsübergänge innerhalb eines jeden Datensatzes sowie die Kinetik dieser Übergänge extrahiert werden.

2 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel beschreibt die theoretischen Grundlagen, welche für das Verständnis der durchgeführten Experimente sowie deren Auswertung nötig sind und kann in zwei größere thematische Abschnitte unterteilt werden. Zu Beginn wird das hier untersuchte System, die PR des DENV, vorgestellt. Im Zuge dessen werden zunächst einige allgemeine Fakten bezüglich Verbreitung und Übertragung des DENV präsentiert. Auch die durch eine Infektion mit dem Virus ausgelösten Krankheitsbilder werden kurz zusammengefasst. Daran anschließend wird die herausragende Rolle der DENV-PR im viralen Replikationszyklus und damit deren Attraktivität als Zielstruktur neuer Wirkstoffe hervorgehoben, ehe dann Aufbau, Struktur und Konformationsdynamik der DENV-PR vorgestellt werden. Der zweite große Block des vorliegenden Kapitels ist als methodischer Exkurs in die Mikroskopie und Spektroskopie konzipiert, dessen Zielsetzung darin besteht, den Leser dieser Arbeit mit den Grundlagen der Messmethoden, welche im Rahmen der Untersuchung der DENV-PR zum Einsatz kamen, vertraut zu machen.

2.1 Dengue-Virus

Das DENV, welches in fünf verschiedene Serotypen (DENV-1–DENV-5) [76] unterteilt werden kann, gehört zur Gattung der Flaviviren, die wiederum der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet werden [77]. Weitere prominente Vertreter der Flaviviren sind das Japanische-Enzephalitis-Virus, das Gelbfieber-Virus, das Zika-Virus sowie das West-Nil-Virus [78]. Viele Flaviviren sind bedeutsame humanpathogene Erreger und können beim Menschen erhebliche Erkrankungen mit potentiell letalem Verlauf hervorrufen [26]. Dabei zeichnet sich das DENV durch die höchsten Morbiditäts- und Mortalitätsraten unter allen Flaviviren [79] sowie unter allen, den Menschen betreffenden, Arboviren aus [12]. Die Mehrzahl der Flaviviren wird durch Arthropoden auf Säugetiere und Vögel übertragen [80], wobei das DENV Stechmücken der Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* als Vektoren zur Übertragung auf den Wirt nutzt [12]. Folglich korreliert der Lebensraum der Stechmücken mit der Verbreitung des DENV [81, 82], weshalb die Gefahr einer DENV-Infektion primär in den Tropen und Subtropen gegeben ist [16, 83]. Derzeit ist das DENV in 128 Ländern endemisch, sodass nahezu vier Milliarden Menschen und damit mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung von einer Infektion bedroht sind [13, 84]. Am stärksten von einer Infektion mit dem DENV gefährdet sind die Bewohner des amerikanischen Kontinents, Südostasiens sowie der westpazifischen Region [15, 85, 86], wobei ca. 70 % der weltweiten Krankheitslast auf Asien entfallen [16]. Alleine in den zurückliegenden zwei Dekaden hat sich die Zahl der bei der Weltgesundheitsorganisation registrierten DENV-Infektionen von etwa einer halben Million im Jahr 2000 auf etwas mehr als vier Millionen im Jahr 2019 verachtacht [15]. Da eine Vielzahl der Infektionen symptomfrei ablaufen [16, 87, 88] und daher nie registriert werden [87] oder aber unspezifische Krankheitsverläufe hervorrufen, sodass die Gefahr eine Fehldiagnose besteht [17, 88, 89], ist davon auszugehen, dass die offiziell gemeldeten Infektionszahlen nur die Spitze des Eisberges abbilden [90]. Schätzungsweise treten jährlich 390 Millionen DENV-Infektionen global auf [16],

2 Theoretische Grundlagen

von denen wiederum 50 bis 100 Millionen symptomatisch verlaufen [16, 17] und zu etwa 10 000 Todesfällen führen [17].

Der in den vergangenen Jahrzehnten verzeichnete starke Anstieg der weltweiten Inzidenz der DENV-Infektionen kann vermutlich auf ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren zurückgeführt werden. Wichtige Einflussgrößen in diesem Zusammenhang sind das globale Bevölkerungswachstum und die damit einhergehende unkontrollierte Urbanisierung tropischer Entwicklungsländer, die Globalisierung und die hieraus resultierende starke Zunahme des internationalen Flugverkehrs, eine unzureichende Bekämpfung der Vektoren sowie eine oftmals mangelhafte Infrastruktur der öffentlichen Gesundheitssysteme [83, 91, 92]. Ein weiterer Katalysator der zunehmenden Fallzahlen sind die mit dem Klimawandel verbundenen steigenden Temperaturen, welche erhöhte Stichraten, eine intensivierete Reproduktion sowie größere Überlebensraten der Vektoren, aber auch eine verkürzte extrinsische Inkubationszeit [93, 94] ermöglichen, sodass sich das DENV in bereits endemischen Gebieten stärker verbreiten kann [13, 95]. Auch wird erwartet, dass sich infolge der Urbanisierung [13, 82, 83] und des Klimawandels [13, 82, 96] neue Lebensräume für die Vektoren des DENV ergeben werden, sodass vermutlich auch die geographische Ausbreitung des DENV zunehmen wird. Aktuelle Prognosen gehen davon aus, dass sich das Risikogebiet einer DENV-Infektion ausgehend von den Tropen und Subtropen nach Norden und Süden, also in Richtung Europa, Nordamerika und Australien, ausdehnen wird [13]. Vorboten dieser Ausdehnung können auf das Jahr 2010 datiert werden. Damals wurden die ersten lokal übertragenen DENV-Infektionen in Südfrankreich [97] und Kroatien [98] nachgewiesen. 2012 wurden infolge eines DENV-Ausbruches auf Madeira über 2100 Krankheitsfälle gemeldet [99]. 2019 verzeichnete das Robert Koch-Institut für Deutschland 1176 DENV-Infektionen, welche jedoch ausschließlich im Ausland übertragen wurden [100]. Allerdings liefert eine Studie aus dem Jahre 2012 Hinweise dafür, dass Stechmücken der Art *Aedes albopictus* regelmäßig aus Südeuropa nach Bayern und Baden-Württemberg eingeschleppt werden, sodass die Gefahr einer Besiedlung Deutschlands durch diesen Vektor des DENV gegeben ist [101]. Schließlich wurden 2015 in Südwestdeutschland zwei große Brutpopulationen dieser Stechmückenart aufgespürt, ehe 2016 der erstmalige Nachweis einer erfolgreichen Überwinterung dieser ursprünglich aus den Tropen stammenden Mückenart in Deutschland gelang [102]. Um eine weitere Verbreitung der Vektoren zu unterbinden, können u. a. konsequent potentielle Brutplätze der Stechmücken, wie beispielsweise Behälter mit stehendem Wasser, entfernt oder versiegelt werden, sterile männliche Mücken freigelassen werden sowie synthetisch und biologisch, beispielsweise auf der Basis von Pilzen, Bakterien oder Krebstieren, gewonnene Insektizide eingesetzt werden [103].

2.1.1 Krankheitsverlauf und Therapie

Während die meisten Infektionen mit dem DENV asymptomatisch verlaufen, zeigen symptomatische DENV-Infektionen ein breites Spektrum klinischer Manifestationen [88]. Je nach Krankheitsverlauf wird klassischerweise in undifferenziertes Fieber, Dengue-Fieber (DF), hämorrhagisches Dengue-Fieber (DHF) und Dengue-Schock-Syndrom (DSS) unterschieden [104, 105]. Nach Ablauf der Inkubationszeit, die beginnend mit dem Zeitpunkt des Stiches einer infizierten Mücke typischerweise vier bis sieben Tage beträgt [83], setzen die Symptome plötzlich ein. Der Krankheitsverlauf kann hierbei in eine anfängliche febrile Phase, auf welche eine kritische Phase, die um den Zeitpunkt des Abklingens des Fiebers einsetzt, und schließlich die Erholungsphase folgen, unterteilt werden [85, 88]. DF, DHF und DSS verlaufen während der febrilen Phase sehr ähnlich [83, 85, 106, 107]. Typischerweise hält dieses Stadium zwei bis sieben Tage an und ist neben plötzlich einsetzendem hohem Fieber oft geprägt von Kopf-, Muskel- sowie Gelenkschmerzen, Ausschlägen, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen [85]. Mit Abklingen des Fiebers erholt sich die Mehrheit der Patienten ohne weitere Komplikationen [88, 108]. In einigen Fällen entwickelt sich jedoch um den Zeitpunkt der Entfieberung das DHF als

schwerere Verlaufsform der Erkrankung [91, 106], weshalb dieser Zeitraum den Beginn der kritischen Phase einläutet [85, 108]. Das Charakteristikum, welches DHF und DF unterscheidet, ist eine erhöhte vaskuläre Permeabilität [107], sodass Blutplasma aus den Gefäßen austritt und sich der Gesundheitszustand der betroffenen Patienten verschlechtert [85, 108]. Die Schwere des Plasmaverlustes, welcher sich üblicherweise über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden erstreckt, variiert [85]. Sobald ein kritisches Volumen an Blutplasma ausgetreten ist, kann ein Schockzustand, das DSS, eintreten [105]. 2009 wurde von der WHO eine aktualisierte Klassifizierung der mit einer DENV-Infektion einhergehenden Erkrankungen veröffentlicht, welche zwischen Dengue mit und ohne Warnsignalen sowie schwerem Dengue unterscheidet [85]. Welcher Krankheitsverlauf letzten Endes eintritt, hängt vermutlich von mehreren Faktoren ab. Die Wahrscheinlichkeit eines schweren Verlaufs ist u. a. abhängig davon, mit welchem Serotyp sich der Patient infiziert hat. Infektionen mit DENV-4 scheinen tendenziell am mildesten zu verlaufen, wohingegen Infektionen mit dem Serotyp DENV-2 häufig schwerere Verlaufsformen nach sich ziehen [109]. Den wohl größten Risikofaktor für eine schwere Erkrankung stellt jedoch die Sekundärinfektion mit einem Serotypen, welcher nicht die Primärinfektion verursacht hat, dar [105, 106, 109]. Ursächlich hierfür ist vermutlich die sogenannte antikörperabhängige Verstärkung (*antibody-dependent enhancement*, ADE), bei welcher die im Zuge der Erstinfektion ausgebildeten Antikörper die Viruspartikel eines heterotypischen Serotypen nicht neutralisieren, sondern diesen vielmehr eine effizientere Aufnahme in die Zellen ermöglichen und daher schwerere Krankheitsverläufe begünstigen [83, 110].

Bisher stehen keine wirksamen antiviralen Pharmaka zur Behandlung von DENV-Infektionen zur Verfügung, sodass sich die Therapie auf die Behandlung der Symptome beschränkt [88, 104]. Auch gestaltet sich die Entwicklung verlässlicher Impfstoffe gegen das DENV als eine Herausforderung, da sichere Vakzine eine robuste Immunantwort gegen alle relevanten Serotypen hervorrufen sollten, sodass das Risiko einer ADE vermieden wird [60]. 2015 wurde erstmals ein DENV-Impfstoff (Dengvaxia[®], Sanofi Pasteur) in Brasilien, Mexiko und auf den Philippinen zugelassen [22, 111]. Allerdings variiert die Wirksamkeit des Vakzins je nach Serotyp [112, 113]. Auch das Alter [111, 114] und der Serostatus [111–113] des zu impfenden Patienten beeinflussen den Impfschutz. Für Patienten, welche sich nach der Impfung erstmalig mit dem DENV infizieren und daher zum Impfzeitpunkt seronegativ sind, birgt die Impfung ein erhöhtes Risiko eines schweren Krankheitsverlaufs [115–117]. Daher wird eine Impfung mit Dengvaxia[®] nur für Personen empfohlen, die zwischen 9 und 45 Jahren alt sind und bereits mindestens eine DENV-Infektion durchlebt haben [15]. Folglich sind weite Teile der Bevölkerung, die in Risikogebieten des DENV lebt, weiterhin von einer Infektion gefährdet [22], sodass nach wie vor ein großer und akuter Bedarf an spezifisch antiviralen Therapien besteht [23, 24].

2.1.2 Struktur und Virusreplikation

Flaviviren, zu welchen das DENV gehört, sind behüllte Viren, deren Genom aus einer positiv polarisierten, einzelsträngigen Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) besteht [118]. Weiterhin zeichnen sich sämtliche Flaviviren durch eine grundlegend gleiche Organisation ihres Genoms sowie ihres Partikelbaus aus [119]. Prinzipiell kann zwischen unreifen und reifen Virionen unterschieden werden (siehe Abbildung 1) [120]. In beiden Formen wird der RNA-Einzelstrang von mehreren Kopien des Capsidproteins (C-Protein) komplexiert [121]. Das resultierende Nucleocapsid wiederum wird von einer Lipidmembran, die von der Wirtszelle stammt und mit Kopien des Hüllproteins (E-Protein) belegt ist, umgeben [118]. In unreifen Viruspartikeln werden die Hüllproteine von der Vorläuferform des Membranproteins (prM-Protein) komplexiert [122]. Im Zuge der Reifung frisch assemblierter Virionen wird das Vorläufermembranprotein durch Proteolyse in das gereifte Membranprotein (M-Protein) überführt [121]. Hierbei ändert sich auch die Morphologie der Viruspartikel. Reife Virionen weisen eine vergleichsweise glatte Oberfläche auf, die von 90 Dimeren des E-Proteins, welche

2 Theoretische Grundlagen

in einer Kopf-Schwanz-Konfiguration parallel zur Lipidmembran angeordnet sind, gebildet wird [120]. Dahingegen zeigen unreife Viruspartikel eine zackenförmige Oberfläche, die auf 60 Trimere, welche jeweils aus drei Heterodimeren des Hüll- und Vorläufermembranproteins bestehen, zurückzuführen ist [79, 121].

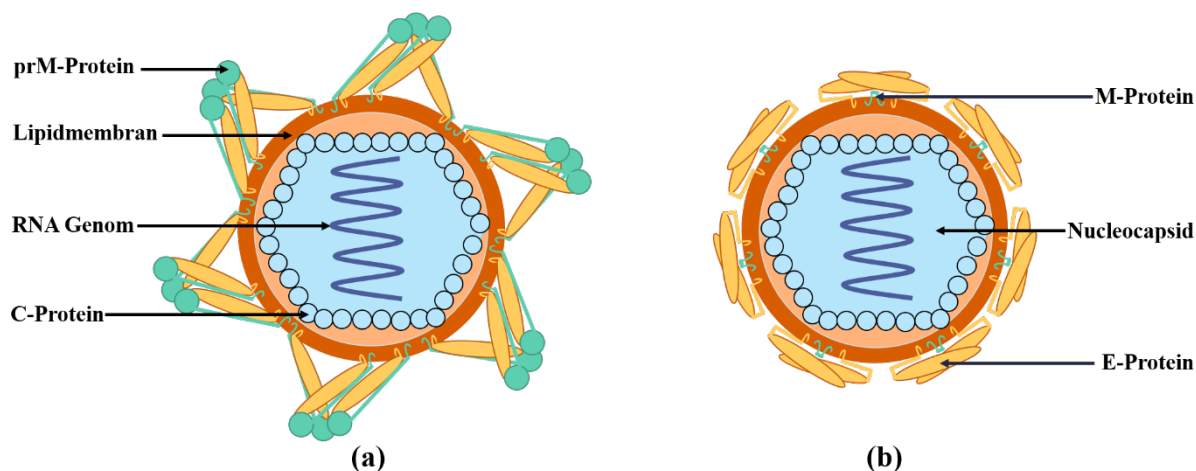


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Flaviviren. (a) Unreifes Viruspartikel. (b) Reifes Viruspartikel. In Anlehnung an [120, 123]. Modifiziert nach [124].

Die einzelnen Schritte des flaviviralen Replikationszyklus können Abbildung 2 entnommen werden.

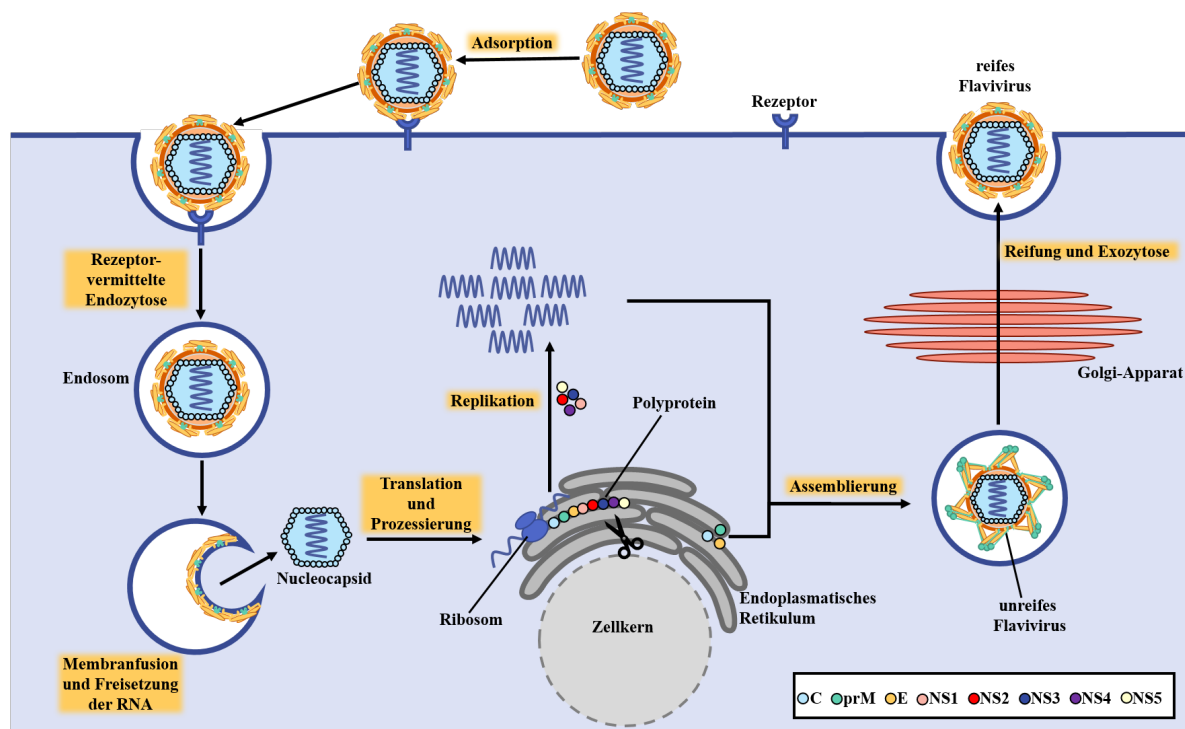


Abbildung 2: Schematische Darstellung des flaviviralen Replikationszyklus. Die Farbcodierung der einzelnen viralen Proteine kann der Legende entnommen werden. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von Hannah Maus in Anlehnung an [108, 125] erstellt.

Zunächst binden die Viren an Rezeptoren, welche sich auf der Zelloberfläche befinden, und gelangen schließlich durch Endozytose in die Wirtszelle [126]. Der im Endosom vorherrschende niedrige pH-Wert induziert Konformationsänderungen des Hüllproteins, wodurch wiederum eine Fusion der viralen und endosomalen Membranen ausgelöst wird und darauffolgend das Nucleocapsid in das Cytoplasma gelangt [118]. Nun wird das virale Genom aus dem

Nucleocapsid freigesetzt [120, 127], sodass dessen Translation in ein Polyprotein (siehe Abbildung 3) an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums stattfinden kann [125]. Im Zuge der Prozessierung wird das Polyprotein sowohl durch Wirtsproteasen als auch durch die flavivirale NS2B-NS3-Protease in die drei Strukturproteine (C, prM, E) und in die sieben nicht-strukturellen Proteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) proteolytisch gespalten [122]. Die Strukturproteine bilden die Bauteile der neuen Viruspartikel, wohingegen die nicht-strukturellen Proteine u. a. an der Replikation der viralen RNA, die sich direkt an die Proteintranslation anschließt, beteiligt sind [128]. Die Assemblierung neuer, zunächst unreifer Viruspartikel findet an der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums statt [79]. Anschließend passieren die unreifen Viruspartikel den Golgi-Apparat. Der im trans-Golgi-Netzwerk vorherrschende saure pH-Wert induziert sodann die proteolytische Spaltung des Membranvorläuferproteins prM und somit die Reifung der Viruspartikel [126]. Im letzten Schritt des Replikationszyklus verlassen reife Virionen durch Exocytose die Wirtszelle [129].

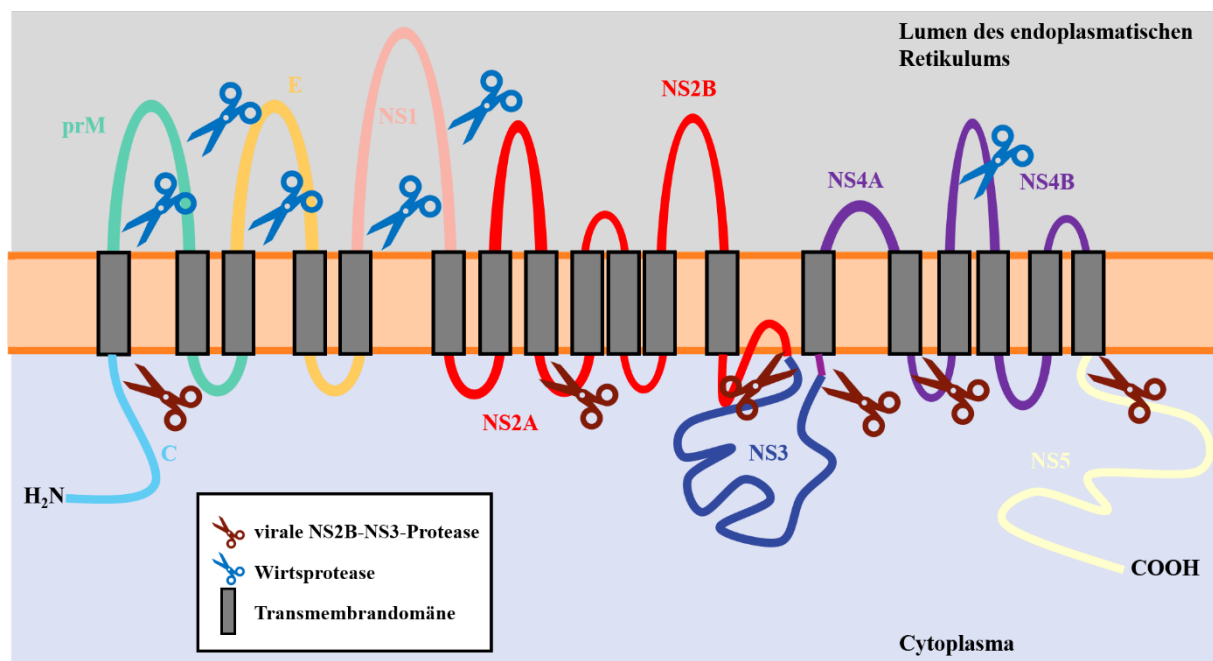


Abbildung 3: Schematische Darstellung des in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankerten flaviviralen Polyproteins. In Anlehnung an [125]. Modifiziert nach [124].

2.1.3 Flavivirale NS2B-NS3-Protease

Die virale NS2B-NS3-Protease stellt aufgrund ihrer essentiellen Funktion im Replikationszyklus der Flaviviren eine attraktive Angriffsstelle dar, um flaviviralen Erkrankungen entgegenzuwirken [26]. Weiterhin zeichnen sich die NS2B-NS3-Proteasen der einzelnen Flaviviren durch eine hohe Konservierung aus [130, 131], sodass ein erheblicher Ähnlichkeitsgrad bezüglich Struktur, Substraterkennung und katalytischer Funktion resultiert [132].

2.1.3.1 Aufbau und katalytische Aktivität

Bei der NS2B-NS3-Protease handelt es sich um eine heterodimere Chymotrypsin-ähnliche Serin-Protease [133]. Diese ist aus der NS3-Protease-Domäne (NS3_{pro}), welche die 180 N-terminalen Aminosäuren des NS3-Proteins umfasst, und dem NS2B-Cofaktor (NS2B_{cf}), welcher innerhalb der hydrophilen Zentralregion des NS2B-Proteins lokalisiert ist, aufgebaut [131, 134]. Die in der NS3_{pro}-Domäne enthaltene katalytische Triade [61], welche im aktiven Zentrum lokalisiert ist [28, 135] und sich aus den hochgradig konservierten Aminosäuren Serin S135, Histidin H51 sowie Aspartat D75 zusammensetzt (siehe Abbildung 4), katalysiert bevorzugt die

2 Theoretische Grundlagen

proteolytische Spaltung von Peptidrückgraten nach zwei basischen Resten [21, 132]. Die Hydrolyse der Substrate wird hierbei durch den nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serins auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung initiiert, wobei H51 und D75 die Nucleophilie der Alkoholfunktion von S135 erhöhen [135, 136]. Hierbei ist die katalytische Aktivität von NS3_{pro} abhängig von der Wechselwirkung mit NS2B_{cf} [131, 137]. Konkret wurde beispielsweise im Falle der DENV-PR beobachtet, dass sich die Spaltungseffizienz der NS3_{pro}-Domäne gegenüber Peptid-Substraten durch die Assoziation mit NS2B_{cf} um einen Faktor von 3300 bis 7600 steigert [138, 139]. Für *in vitro* Untersuchungen der flaviviralen NS2B-NS3-Protease haben sich minimalistische Konstrukte etabliert, welche lediglich die Cofaktor-Domäne von NS2B sowie die N-terminale Protease-Domäne von NS3 umfassen [60]. Diese verkürzten Konstrukte wurden mit [140, 141] und ohne [142] kovalente Verbindung zwischen beiden Domänen konzipiert. Im gängigsten Konstrukt werden NS2B_{cf} und NS3_{pro} über einen Gly₄-Ser-Gly₄-Linker kovalent verknüpft [21].

2.1.3.2 Struktur und Konformationsdynamik

In Röntgenbeugungsexperimenten wurden primär zwei Konformationen der flaviviralen NS2B-NS3-Protease beobachtet [21]. Abbildung 4 zeigt beide Konformationen am Beispiel der DENV-PR.

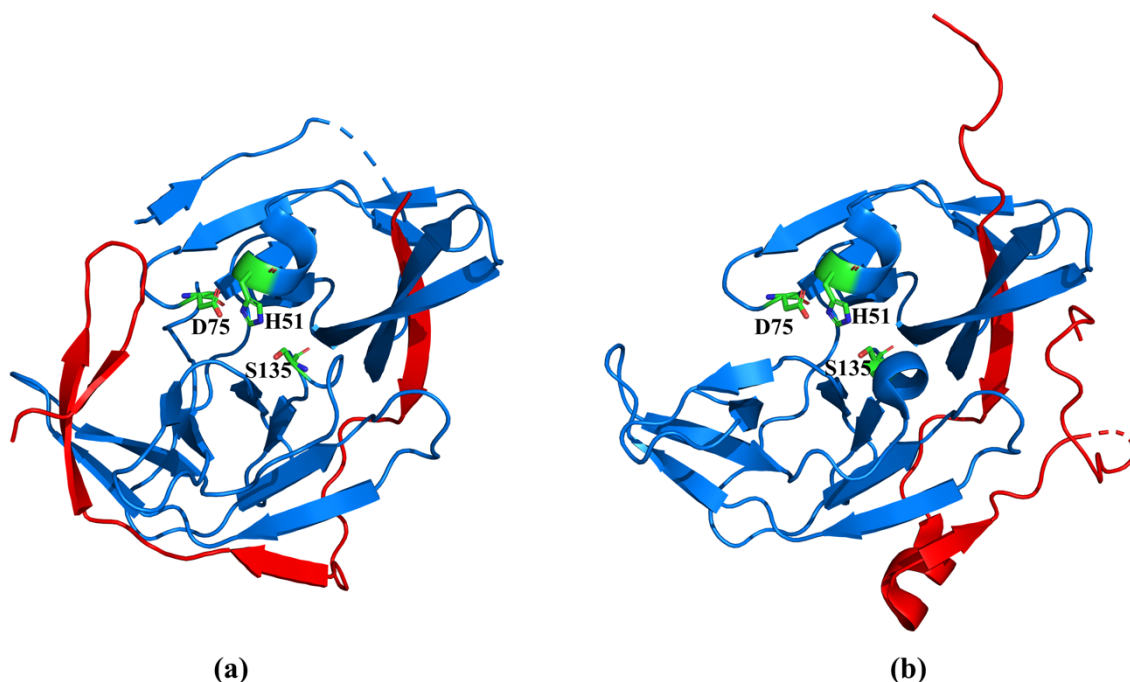


Abbildung 4: Gegenüberstellung der mittels Röntgenbeugungsexperimenten bestimmten Tertiärstrukturen der DENV-PR. (a) Geschlossene Konformation (Protein Data Bank Code (PDB-Code): 3U1I [61]). (b) Offene Konformation (PDB-Code: 2FOM [143]). In beiden Teilabbildungen wird der NS2B-Cofaktor in rot und die NS3-Protease-Domäne in blau dargestellt. Weiterhin werden die Aminosäuren der katalytischen Triade jeweils im Stäbchenmodell hervorgehoben, wobei folgende Farbcodierung gewählt wurde: Kohlenstoffatome: grün; Sauerstoffatome: rot; Stickstoffatome: blau. Beide Teilabbildungen wurden von H. Maus mit PyMOL erstellt.

In beiden Zuständen nimmt die NS3_{pro}-Domäne (blau) des DENV sowie der anderen Flaviviren eine dem Chymotrypsin ähnliche Faltung ein [26, 58]. Dieses Faltungsmuster besteht im Wesentlichen aus zwei β -Fässern, welche jeweils aus sechs β -Strängen aufgebaut sind und das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade (grün) „sandwichartig“ umgeben [131, 143, 144]. Während demnach NS3_{pro} in allen bisher veröffentlichten Kristallstrukturen sehr ähnliche Faltungen annimmt, wurden im Falle der NS2B_{cf}-Domäne (rot) mindestens zwei unterschiedliche

Konformationen erfasst [53, 130, 137]. Diese unterscheiden sich primär in der Position des C-terminalen Parts von NS2B_{cf} relativ zum aktiven Zentrum in der NS3_{pro}-Domäne [60, 130, 143, 145]. In der geschlossenen Konformation (siehe Abbildung 4 a) legt sich der Cofaktor gürtelartig um die NS3_{pro}-Domäne und bildet mit seiner C-terminalen Hälfte einen β -hairpin aus, welcher zur Bildung des aktiven Zentrums beiträgt [61, 130, 143]. Folglich kann im geschlossenen Zustand die C-terminale Region des Cofaktors an der Katalyse teilhaben, weshalb allgemein angenommen wird, dass diese Konformation die katalytisch aktive darstellt [26, 60, 61]. In Übereinstimmung mit vorstehender Annahme konnte der geschlossene Zustand der flaviviralen Protease primär in Röntgenbeugungsexperimenten festgestellt werden, die in Anwesenheit von Liganden, welche das aktive Zentrum adressieren, durchgeführt wurden [21]. Dagegen wurde in Kristallstrukturanalysen, welche in Abwesenheit solcher Liganden durchgeführt wurden, üblicherweise eine alternative Konformation der NS2B-NS3-Protease beobachtet [21]. In den Kristallstrukturen, welche diesen sogenannten offenen Zustand (siehe Abbildung 4 b) der viralen Protease zeigen, liegen der Cofaktor und NS3_{pro} nur partiell assoziiert vor, sodass die C-terminale Domäne von NS2B_{cf} nicht zur Bildung der Substratbindungstasche beiträgt [130, 143]. Folglich wird vermutet, dass die offene Konformation katalytisch inaktiv ist [22, 59]. In Summe erlauben die kristallographischen Untersuchungen die Annahme, dass die Bildung der geschlossenen Konformation das Resultat der Bindung eines Liganden an das aktive Zentrum der Protease darstellt [27, 29]. Allerdings bleibt der Mechanismus, durch welchen die Ligandenbindung und der Konformationswechsel miteinander gekoppelt sind, umstritten, da sowohl über eine induzierte Anpassung [27, 60] als auch über eine Konformationsauswahl [63] berichtet wurde. Ferner sei erwähnt, dass die Kristallstrukturen der Proteasen des DENV [143] sowie des Zika-Virus [146] im offenen Zustand eine diskontinuierliche Elektronendichte für weite Teile der C-terminalen Domäne von NS2B_{cf} aufweisen. Diese Beobachtung lässt auf eine ungeordnete und flexible C-terminale Region von NS2B_{cf} schließen [60, 146] und rechtfertigt die Vermutung, dass in Lösung möglicherweise mehrere offene Konformationen eingenommen werden können [62, 143]. Demgegenüber zeichnen sich die Kristallstrukturen der Proteasen des DENV, des Zika-Virus sowie des West-Nil-Virus, welche jeweils die geschlossene Konformation zeigen, durch eine beachtliche konformationelle Ähnlichkeit aus [21].

Es ist allerdings problematisch, ausschließlich auf Grundlage der verfügbaren Kristallstrukturen, die biologische Relevanz der zwei beobachteten Konformationen des Cofaktors zu bewerten, da kristalline Umgebungen mitnichten die native Situation eines physiologischen Milieus widerspiegeln, sodass entsprechende Strukturuntersuchungen in Lösung und damit unter nahezu physiologischen Bedingungen unentbehrlich sind [147]. Unklar bleibt beispielsweise, ob die Röntgenstrukturen, in welchen die PR scheinbar den offenen Zustand einnimmt, auf Kristallisationsartefakte zurückzuführen sind [53, 60, 62, 145]. Um die Frage der biologischen Relevanz beider in den Kristallstrukturen beobachteten Konformationen zu klären, wurden daher zahlreiche NMR-Studien in Lösung durchgeführt [53, 148]. Zwei unabhängige NMR-Studien konnten zeigen, dass die DENV-PR in Abwesenheit einer kovalenten Verknüpfung zwischen Cofaktor- und Protease-Domäne in Lösung überwiegend die geschlossene Form einnimmt [139, 142]. Weiterhin stellten de la Cruz *et al.* eine zusätzliche Stabilisierung des geschlossenen Zustands in Folge der Bindung eines kompetitiven Inhibitors fest [139]. Gleichzeitig wurde im Rahmen der erwähnten Studie bei Erhöhung des pH-Werts oder der Salzkonzentration eine zunehmende Destabilisierung des geschlossenen Zustandes beobachtet. Daher wurde geschlussfolgert, dass die in der aktiven Konformation vorherrschende enge Assoziation von NS2B_{cf} und NS3_{pro} durch elektrostatische Interaktionen zwischen beiden Komponenten stabilisiert wird. Die Autoren der Studie vermuteten, dass die unter den beschriebenen Bedingungen beobachtete Destabilisierung des geschlossenen Zustandes möglicherweise von einem intensivierten Austausch zwischen verschiedenen Konformationen des C-terminalen Parts von NS2B_{cf} begleitet wird.

2 Theoretische Grundlagen

Im Gegensatz zu den oben skizzierten NMR-Studien an der nichtverbrückten DENV-PR, liefern ^{19}F -NMR-spektroskopische Untersuchungen an der verbrückten Variante starke Hinweise dafür, dass sowohl die offene als auch die geschlossene Konformation in Lösung in signifikantem Maß parallel nebeneinander vorliegen [59]. Im Zuge ihrer Studie brachten Zhu *et al.* eine mit ^{19}F markierte Trifluoracetylgruppe an eine Aminosäure, welche im C-terminalen Part von NS2B_{cf} lokalisiert ist, an. Dabei wurde die Lage der ^{19}F -Markierung innerhalb des Proteins derart gewählt, dass sich deren chemische Umgebung im Falle eines Übergangs zwischen offener und geschlossener Konformation signifikant ändern sollte. Tatsächlich wurden zwei distinkte Signale im resultierenden ^{19}F -NMR-Spektrum erhalten. Ferner wurde beobachtet, dass unter Zugabe eines kompetitiven Inhibitors eines der beiden Signale deutlich an Dominanz gewann. Auf Grundlage der allgemein verbreiteten Annahme, dass Liganden, welche in das aktive Zentrum des Enzyms binden, dessen geschlossene Form stabilisieren [27], schlussfolgerten die Autoren der Arbeit, dass die beiden Signale im ^{19}F -NMR-Spektrum auf den offenen und geschlossenen Zustand der DENV-PR zurückzuführen sind [59]. Schon einige Jahre zuvor konnte im Rahmen einer weiteren NMR-Studie gezeigt werden, dass die Bindung eines kompetitiven Inhibitors an die verbrückte Variante der DENV-PR die Bildung der geschlossenen Konformation stark begünstigt [62]. Gleichzeitig konnten damals in Abwesenheit des Inhibitors zahlreiche NMR-Signale aufgrund einer starken Linienverbreiterung nicht zugeordnet werden. Einige NMR-Resonanzen fehlten gar in Gänze. Dies wurde auf einen Austausch zwischen verschiedenen Konformationen, welcher auf der Zeitskala von Mikro- bis Millisekunden stattfindet, zurückgeführt. Weiterhin wurden Indizien präsentiert, welche darauf hindeuten, dass das konformationelle Gleichgewicht, welches zur Verbreiterung bzw. zum Wegfall einiger NMR-Resonanzen führt, an einen Assoziations-Dissoziations-Prozess zwischen der C-terminalen Domäne von NS2B_{cf} und NS3_{pro} gekoppelt ist. In diesem Zusammenhang sei zudem darauf hingewiesen, dass die NMR-Spektren der nichtverbrückten DENV-PR deutlich besser aufgelöst sind als jene des verbrückten Konstrukts [142]. Daher wird vermutet, dass die kovalente Verknüpfung eine Konformationsdynamik induziert, welche in der nichtverbrückten Variante der DENV-PR in diesem Umfang nicht vorhanden ist [142]. Interessanterweise wurde in der zu Beginn dieses Abschnittes erwähnten ^{19}F -NMR-Studie – in Analogie zu den Untersuchungen von de la Cruz *et al.* an der nichtverbrückten DENV-PR [139] – festgestellt, dass auch im Falle der verbrückten DENV-PR die geschlossene Konformation bzw. die NMR-Resonanz, welche dieser zugerechnet wurde, mit steigendem pH-Wert eine zunehmende Destabilisierung erfährt [59]. Zusätzlich und in Ergänzung zu den Studien von de la Cruz *et al.* legt das Intensitätsverhältnis beider ^{19}F -NMR-Signale nahe, dass synchron zur zunehmenden Destabilisierung der aktiven Form des Enzyms die offene Konformation an Bedeutung gewinnt. Beispielsweise wurde der relative Anteil des Signals, welches der offenen Form zugeordnet wurde, bei einem pH-Wert von 6,5 zu lediglich 20 % bestimmt, während eine Erhöhung des pH-Wertes um zwei Einheiten dazu führte, dass bereits etwas mehr als jede zweite Protease in der offenen Konformation vorlag. Aufgrund der beobachteten pH-Abhängigkeit der Lage des Konformationsgleichgewichtes stellten auch die Autoren der ^{19}F -NMR-Untersuchung die Hypothese auf, dass Coulomb-Wechselwirkungen entscheidend für die Stabilisierung des geschlossenen Zustandes der Protease sind.

In Summe legen die zuvor diskutierten NMR-Studien nahe, dass die An- oder Abwesenheit einer kovalenten Verknüpfung signifikanten Einfluss auf das konformationelle Gleichgewicht der DENV-PR nimmt. Während in Abwesenheit einer kovalenten Verbindung primär die geschlossene Konformation eingenommen wird [139, 142], scheint das Vorhandensein einer solchen Verknüpfung – vor allem im leicht basischen Milieu – eine deutliche Population des offenen Zustandes zu ermöglichen [59]. In einer unabhängigen Studie gelang es Hill *et al.* diese Beobachtungen zu verifizieren, indem sie eine Methode entwickelten, welche die Quantifizierung der beiden Zustände der DENV-PR ermöglichte [22]. Hierzu wurden mehrere Konstrukte der DENV-PR mit jeweils zwei Cystein-Resten, welche durch Punktmutationen eingeführt

wurden, erstellt. Die Cystein-Paare wurden dabei derart am Protein angebracht, dass entweder in der offenen oder in der geschlossenen Form eine intramolekulare Disulfidbrücke ausgebildet werden konnte. Hierdurch gelang es beide Konformationen „einzufrieren“. Hill *et al.* resümierten in Übereinstimmung mit den bereits diskutierten NMR-Studien, dass die nichtverbrückte Variante der DENV-PR in Lösung vornehmlich die geschlossene Konformation einnimmt (Anteil der geschlossenen Konformation >82 %), wohingegen das Konformationsgleichgewicht des verbrückten Konstrukts deutlich zum offenen Zustand hin verschoben ist (Anteil des offenen Zustandes >75 %). Weiterhin wurde in der skizzierten Studie beobachtet, dass die „Einfrierung“ der geschlossenen Konformation einen starken Anstieg der enzymatischen Aktivität verursachte. Dahingegen wurde durch „Einfrieren“ im offenen Zustand eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität festgestellt. Diese Beobachtungen sind eindeutige experimentelle Belege dafür, dass der geschlossene Zustand der aktiven Form des Enzyms entspricht, wohingegen die offene Konformation enzymatisch inaktiv ist.

2.1.3.3 Inhibitoren

Auf der Suche nach wirkungsvollen Inhibitoren der flaviviralen NS2B-NS3-Protease konzentrierte sich die Mehrheit der Ansätze bisher auf die Entwicklung von Verbindungen, welche das aktive Zentrum adressieren [27]. Die meisten dieser kompetitiven Inhibitoren weisen eine peptidische oder peptidomimetische Struktur auf [29]. Da das aktive Zentrum bevorzugt Substrate mit zwei basischen und damit kationischen Resten bindet, besitzen wirksame kompetitive Inhibitoren geringe Membranpermeabilitäten und damit eine geringe Bioverfügbarkeit [26, 27, 29]. Auch wird die Entwicklung selektiver kompetitiver Inhibitoren durch die flache Struktur des aktiven Zentrums beeinträchtigt [27]. Weiterhin sind kompetitive Inhibitoren der flaviviralen Protease mit einem erhöhten Risiko toxischer Nebeneffekte behaftet, da das aktive Zentrum der NS2B-NS3-Protease demjenigen einiger Serin-Proteasen des Wirtes sehr ähnlich ist und daher die Gefahr einer mangelhaften Selektivität besteht [26]. Eine Möglichkeit, die skizzierten Schwierigkeiten zu umgehen, besteht in der Entwicklung von allosterischen Inhibitoren, welche nicht das aktive Zentrum, sondern eine andere Region des Proteins adressieren [27]. In diesem Zusammenhang wurden bereits 2006 einige aus dem Fingerwurz extrahierte Strukturen identifiziert, welche die DENV-PR nicht-kompetitiv hemmen [149]. Mit der Absicht den Bindungsmodus dieser Substanzen aufzuklären, führten Othman *et al.* 2008 eine Docking-Studie durch [150]. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass die untersuchten Liganden ohne Ausnahme in eine allosterische Bindetasche und nicht in das aktive Zentrum der DENV-PR binden. Im Zuge der Oberflächenanalyse einer Kristallstruktur, welche die DENV-PR in der geschlossenen Konformation zeigt (PDB-Code: 3U1I), konnten Noble *et al.* 2012 erstmalig eine mutmaßliche allosterische Bindetasche, welche dem aktiven Zentrum gegenüberliegt, identifizieren [61]. Kurze Zeit später unterzogen Yildiz *et al.* die Kristallstruktur 2FOM, in welcher die DENV-PR den offenen Zustand einnimmt, einer visuellen Analyse [28]. Im Rahmen dieser Betrachtung wurden acht potentielle allosterische Bindestellen, die über die Proteinoberfläche verteilt sind, gefunden. Um die biologische Relevanz dieser mutmaßlichen Bindestellen zu beurteilen, wurde im Anschluss an die visuelle Inspektion der Proteinoberfläche eine Cystein-Mutagenese-Studie durchgeführt. Im Kontext dieser Studie konnte lediglich eine der acht postulierten Bindestellen als funktionale allosterische Bindetasche bestätigt werden (gelb in Abbildung 5). Diese ist um Alanin A125 zentriert [28] und befindet sich in jener Region, die auch von Noble *et al.* identifiziert wurde [61]. Folglich scheint die allosterische Tasche sowohl in der offenen als auch in der geschlossenen Konformation der Protease verfügbar zu sein [29]. Die Position der allosterischen Bindestelle innerhalb der DENV-PR konnte 2019 von Millies *et al.* in einer weiteren Cystein-Mutagenese-Studie verifiziert werden [29].

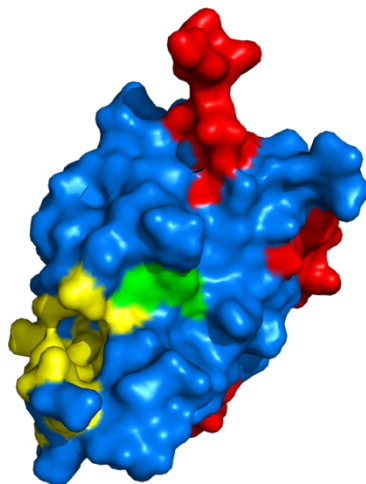


Abbildung 5: Lage der allosterischen Bindetasche (gelb) relativ zum aktiven Zentrum (grün) in der offenen Konformation der DENV-PR (PDB-Code: 2FOM [143]). Der NS2B-Cofaktor wird in rot und die NS3-Protease-Domäne in blau dargestellt. Die Abbildung wurde von H. Maus mit PyMOL erstellt.

Hinsichtlich der Wirkungsweise allosterischer Inhibitoren stellten Yildiz *et al.* im Rahmen ihrer Cystein-Mutagenese-Studie die Hypothese auf, dass die Bindung eines Liganden in die allosterische Tasche den Übergang des Enzyms in den geschlossenen Zustand sterisch hindert, sodass die katalytisch inaktive offene Konformation stabilisiert wird [28]. Um den Einfluss allosterischer Inhibitoren auf die Konformation der flaviviralen Protease tiefergehend zu untersuchen, präsentierten Brecher *et al.* einen Lumineszenz-Assay, welcher die Visualisierung von Konformationsänderungen des NS2B-Cofaktors ermöglicht [27]. Als wesentliches Ergebnis dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines kompetitiven Inhibitors die Bildung der geschlossenen Konformation induzierte, wohingegen die Bindung eines allosterischen Inhibitors die Ausbildung des geschlossenen Zustands verhinderte. Allerdings konnte nicht eruiert werden, welche Konformation durch allosterische Inhibitoren stabilisiert wird. Um deren Bindungsmodus unabhängig von Docking-Studien experimentell aufzuklären, gelang es Yao *et al.* 2019 angeblich Kristallstrukturen der DENV-PR mit unterschiedlichen allosterischen Liganden aufzulösen [151]. Laut Interpretation der Autoren belegen die Kristallstrukturen erstmalig, dass allosterische Inhibitoren in die offene Konformation der Protease binden. Auch die Position der postulierten allosterischen Bindetasche konnte scheinbar verifiziert werden. Bezüglich des Inhibitionsmechanismus wird resümiert, dass die Bindung eines Liganden in die allosterische Tasche den inaktiven offenen Zustand des Enzyms stabilisiert. Allerdings werden die entsprechenden Kristallstrukturen in der wissenschaftlichen Gemeinschaft kontrovers diskutiert, da die Zuordnung der Elektronendichte speziell im Hinblick auf die Lokalisierung des allosterischen Inhibitors fragwürdig erscheint [63]. Erst kürzlich konnten Maus *et al.* mithilfe eines kompetitiven smFRET-Assays den Nachweis erbringen, dass allosterische Liganden den offenen, katalytisch inaktiven Zustand des Proteins stabilisieren [64].

2.2 Mikroskopie und Spektroskopie

Dieses Unterkapitel stellt einen methodischen Exkurs in die Mikroskopie und Spektroskopie dar, dessen Zielsetzung darin besteht, den Leser dieser Arbeit mit den Grundlagen der Messmethoden, welche im Rahmen der Untersuchung der DENV-PR zum Einsatz kamen, vertraut zu machen. Der Grundstock aller eingesetzten Techniken basiert hierbei ausnahmslos auf der Messung verschiedener Fluoreszenzparameter von Farbstoffen, welche an die betrachteten Analyten angebracht sind und als Reportermoleküle für verschiedenste Vorgänge fungieren.

Daher werden zunächst einige für das weitere Verständnis unabdingbare photophysikalische Grundlagen organischer Farbstoffmoleküle anhand eines Jablonski-Diagramms dargestellt. Da eine Vielzahl der durchgeführten Experimente die elektronische Kopplung zwischen zwei Chromophoren zur Wissensgenerierung nutzt, folgt im Anschluss eine tiefergehende theoretische Betrachtung des elektronischen Energietransfers. Den Abschluss bildet eine Einführung in die theoretischen Konzepte der benutzten Einzelmolekülspektroskopischen Methoden. Hierfür wird zunächst kurz das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, welche in dieser Arbeit als Standardmethode für Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen zum Einsatz kam, skizziert, ehe dann auf die eingesetzten Messmethoden der Einzelmolekülspektroskopie eingegangen wird.

2.2.1 Photophysik von Farbstoffmolekülen

Die grundlegenden Prozesse, die bei der Wechselwirkung von Licht mit organischen Farbstoffmolekülen stattfinden können, lassen sich übersichtlich in einem Jablonski-Diagramm (siehe Abbildung 6) zusammenfassen [152].

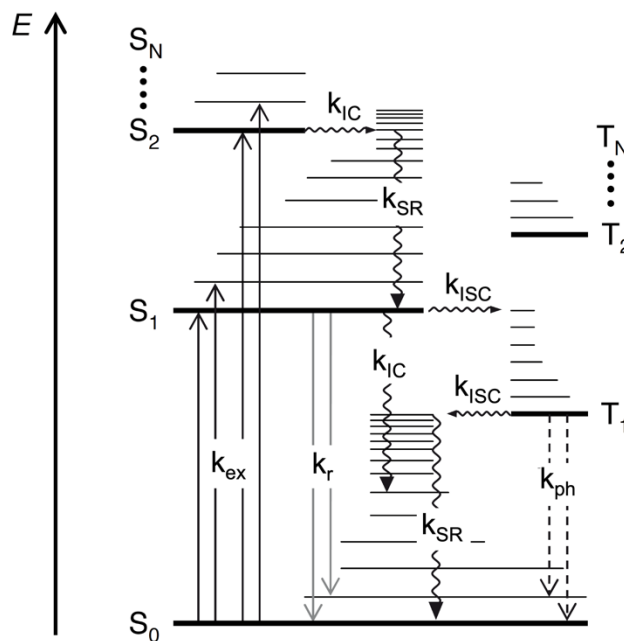


Abbildung 6: Ausschnitt eines Jablonski-Termschemas. Fette Linien kennzeichnen die Schwingungsgrundzustände elektronischer Niveaus. Schwingungsangeregte Zustände werden mit dünnen Linien repräsentiert. Pfeile symbolisieren potentielle Übergänge zwischen den energetischen Niveaus mit ihren jeweiligen Übergangsraten k_i . Strahlende Übergänge werden mit geraden Pfeilen gekennzeichnet, während gewellte Pfeile für strahlungslose Übergänge verwendet werden. Leicht modifiziert nach [153].

Bei Raumtemperatur und ohne Einstrahlung von Licht, kann unter Berücksichtigung der Boltzmann-Statistik in guter Näherung davon ausgegangen werden, dass sich die Mehrzahl der Fluorophore im Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes S_0 befindet [154, 155]. Durch Absorption von Photonen können die Farbstoffmoleküle in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes mit der Anregungsrate k_{ex} in die verschiedenen Schwingungsniveaus der elektronisch angeregten Singulett-Zustände S_N (mit $N > 0$) überführt werden. Falls die Anregung in ein vibratorisch angeregtes Niveau des elektronisch angeregten Zustandes erfolgt, gelangt der Chromophor zunächst durch Schwingungsrelaxation mit der Rate k_{SR} strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand von S_N . Wird infolge der optischen Anregung ein Singulett-Zustand mit $N > 1$ populiert, so findet im Anschluss an die eventuell vorgelagerte Schwingungsrelaxation in den jeweiligen Schwingungsgrundzustand zunächst

2 Theoretische Grundlagen

eine isoenergetische und daher strahlungslose innere Umwandlung (*internal conversion*, IC) mit der Übergangsrate k_{IC} statt, wodurch der Fluorophor in schwingungsangeregte Zustände des energetisch nächst tiefer gelegenen elektronisch angeregten Singulett-Zustandes S_{N-1} gelangt. Der beschriebene Prozess wird in Abbildung 6 für den Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand von S_2 in ein vibratorisch angeregtes Niveau von S_1 verdeutlicht. Gemäß der Kasha-Regel folgen innere Umwandlung und Schwingungsrelaxation solange aufeinander, bis das niedrigste angeregte Niveau einer gegebenen Multiplizität, also im dargestellten Fall der Schwingungsgrundzustand von S_1 , erreicht ist [156]. Sobald das Molekül im vibratorischen Grundzustand von S_1 angelangt ist, gibt es mehrere mögliche Pfade, über welche dieses in den elektronischen Grundzustand zurückkehren kann. Zum einen kann der Farbstoff strahlend unter Aussendung eines Photons mit der Rate k_r in die diversen Schwingungsniveaus von S_0 relaxieren. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Da sich die Moleküle nach einer Absorption bzw. Emission nur selten im vibratorischen Grundzustand des jeweiligen elektronischen Niveaus befinden, erfolgt im Anschluss an diese strahlenden Prozesse meist eine schnelle strahlungslose Relaxation in den entsprechenden Schwingungsgrundzustand. Deshalb ist die Fluoreszenz in der Regel gegenüber dem absorbierten Licht zu niedrigeren Energien (Stokes-Verschiebung) verschoben [155, 157] und kann daher mittels spektraler Filterung effektiv vom Anregungslicht abgetrennt werden (siehe Kapitel 2.2.3.1). Einen Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz stellt die strahlungslose Interkombination (*intersystem crossing*, ISC) mit der Rate k_{ISC} in das energetisch tiefste Triplett-Niveau T_1 dar [155]. Bei diesem Übergang handelt es sich um einen quantenmechanisch verbotenen und damit üblicherweise ineffektiven Prozess, da er unter Änderung der Spin-Multiplizität abläuft. Ist der Fluorophor durch strahlungslose Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand des Triplett-Niveaus übergegangen, kann er von dort unter erneuter Spin-Umkehr in den Singulett-Grundzustand S_0 zurückkehren. Somit unterliegt auch die Relaxation in den elektronischen Grundzustand dem Spin-Verbot, weshalb sich der T_1 -Zustand üblicherweise durch eine relativ lange Lebensdauer auszeichnet. Die Entvölkerung des Triplett-Zustandes kann hierbei strahlungslos durch erneutes ISC oder strahlend unter Aussendung eines Photons mit der Rate k_{ph} in den elektronischen Grundzustand S_0 stattfinden [154]. Die strahlende Desaktivierung von T_1 wird als Phosphoreszenz bezeichnet [155]. Neben der Fluoreszenz und dem ISC existiert ein dritter Pfad, über den der vibratorische Grundzustand des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes S_1 entvölkert werden kann, nämlich die isoenergetische Überführung in einen schwingungsangeregten Zustand des elektronischen Grundzustandes *via* innere Umwandlung und anschließende Schwingungsrelaxation in das vibratorische Grundniveau von S_0 . Zusätzlich zu den drei diskutierten und in Abbildung 6 gezeigten Prozessen kann auch der intermolekulare Energieübertrag auf ein Akzeptor-Molekül mit der Rate k_{ET} zu einer Depopulation des Schwingungsgrundzustandes von S_1 führen. Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wird auf den Prozess des Energietransfers im Kapitel 2.2.2 in ausführlicher Art und Weise eingegangen.

Die Fluoreszenzlebensdauer

Ein Parameter, welcher in dieser Studie eine große Relevanz besitzt, ist die Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} . Sie ist definiert als die durchschnittliche Zeit, die ein Chromophor im angeregten S_1 -Zustand verweilt und ergibt sich daher aus dem Kehrwert der Summe der Raten aller Prozesse, welche den angeregten Zustand entvölkern [155]:

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_{fl}} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \text{ mit } k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} + \dots \quad (1)$$

Hierbei entspricht k_r der strahlenden Übergangsrate von S_1 nach S_0 , wohingegen k_{nr} die Raten aller Prozesse zusammenfasst, welche zu einer strahlungslosen Depopulation des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes führen. Hierzu gehören sowohl die intramolekularen

Übergänge der inneren Umwandlung IC sowie der Interkombination ISC, aber auch intermolekulare Prozesse wie u. a. der Energietransfer auf ein Akzeptor-Molekül mit der Rate k_{ET} . Die zeitliche Entwicklung der Anzahl der sich im angeregten S_1 -Niveau befindlichen Fluorophore und damit der Fluoreszenzintensität $I(t)$ gehorcht einem einfach exponentiellen Zerfall [155]:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{fl}}\right) \quad (2)$$

I_0 kennzeichnet die Intensität der Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$. Zeitaufgelöste Messungen ermöglichen die experimentelle Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche zeitaufgelösten Messungen unter Verwendung der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (*time-correlated single-photon counting*, TCSPC), welche im Kapitel 2.2.4 vorgestellt wird, durchgeführt.

Gleichung (2) gilt, falls lediglich eine fluoreszierende Komponente gegenwärtig ist. Sobald eine Probe i verschiedene, zur Fluoreszenz fähige Komponenten aufweist, die sich jeweils in ihrer Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{fl}^{(i)}$ unterscheiden, muss zur korrekten Beschreibung der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenzintensität eine Summe von exponentiellen Abklingkurven verwendet werden, wobei die Zerfälle der einzelnen Komponenten entsprechend ihrer relativen Häufigkeit α_i gewichtet werden [155]:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_{fl}^{(i)}}\right) \quad (3)$$

Falls nicht i diskrete Fluoreszenzlebensdauern vorliegen, sondern eine Verteilung der Abklingzeiten beobachtet wird, so geht die Summe in Gleichung (3) in ein Integral über [154]:

$$I(t) = \int \alpha(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{fl}}\right) d\tau \quad (4)$$

2.2.2 Elektronischer Energietransfer

Ein beachtlicher Teil der vorliegenden Arbeit macht sich Informationen zu Nutze, welche aus der elektronischen Wechselwirkung zwischen zwei Fluorophoren gezogen werden können, weshalb im folgenden Kapitel, die für die Interpretation dieser Experimente benötigten, theoretischen Grundlagen gelegt werden. Zunächst soll eine prägnante Einleitung in Verbindung mit einem kurzen historischen Abriss den Leser dieser Arbeit mit dem Thema vertraut machen, ehe in einem zweiten Abschnitt dann explizit auf die für diese Studie relevante Förster-Theorie und den von ihr beschriebenen Prozess des Förster-Resonanzenergietransfers eingegangen wird. Zum Abschluss dieses Unterkapitels werden experimentelle Methoden vorgestellt, mit deren Hilfe die Effizienz eines Energieübertrages messbar wird.

2.2.2.1 Einleitung

Unter elektronischem Energietransfer wird die Übertragung elektronischer Energie von einem angeregten Donor-Molekül (D^*) auf ein Akzeptor-Molekül (A) verstanden [158]:



2 Theoretische Grundlagen

Hierbei kann zwischen strahlendem und strahlungslosem Energietransfer unterschieden werden. Der strahlende Energietransfer bedarf keiner direkten Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor [154]. Die Energie wird in einem zweistufigen Prozess auf den Akzeptor übertragen. Zunächst emittiert der Donor, welcher sich im angeregten Zustand befindet, ein Photon der Frequenz ν_{D^*} und gelangt hierdurch in seinen elektronischen Grundzustand. Das emittierte Lichtquant kann nun in einem zweiten Schritt von einem Akzeptor-Molekül absorbiert werden, insofern das Absorptionsspektrum des Akzeptors und das Emissionsspektrum des Donors spektral überlappen [154, 158]:



Im Gegensatz hierzu wird beim strahlungsfreien Energietransfer – für den Fall eines vollständigen Energieübertrages auf den Akzeptor – keine Donor-Emission beobachtet. Vielmehr handelt es sich um einen konzertierten Mechanismus, bei dem die Donor-Relaxation und die Akzeptor-Anregung gleichzeitig stattfinden [159]. Demnach muss eine direkte Wechselwirkung von Donor und Akzeptor in Form einer elektronischen Kopplung V zwischen den Übergangsdipolmomenten beider Moleküle vorliegen. Im klassischen Sinne können beide Übergangsdipolmomente als Oszillatoren aufgefasst werden, welche über eine Feder gekoppelt sind, die den Energieaustausch zwischen den zwei Schwingern ermöglicht [159, 160]. Zusätzlich zur elektronischen Kopplung zwischen den am Energieübertrag beteiligten Chromophoren, koppelt das komplette betrachtete elektronische System auch mit seiner Umgebung [161–165]. Die Stärke der Wechselwirkung zwischen Chromophor und Umgebung sei im Folgenden mit ζ betitelt. Je nach Stärke der elektronischen Wechselwirkungsenergie V zwischen den Chromophoren in Relation zu ζ wird zwischen zwei Grenzfällen, nämlich der schwachen und starken elektronischen Kopplung, unterschieden [161, 164, 166]. Eine starke elektronische Kopplung liegt vor, wenn V deutlich größer als ζ ist [162, 164]. Damit ist die Kopplung so stark, dass der Energietransfer schneller als die intramolekulare Schwingungsrelaxation des angeregten Donors erfolgt, was wiederum zur Folge hat, dass die Anregungsenergie über den D-A-Komplex delocalisiert ist [164, 167]. Typischerweise tritt eine starke elektronische Kopplung innerhalb molekularer Aggregate [167, 168] auf, kann aber auch in konjugierten Polymeren beobachtet werden [159, 169, 170]. Da in der vorliegenden Arbeit weder konjugierte Polymere noch molekulare Aggregate betrachtet werden, wird der Grenzfall der starken elektronischen Kopplung im Folgenden nicht näher erläutert, wurde jedoch aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt. Vielmehr soll nun das Limit der schwachen Kopplung, welches für die in dieser Studie betrachteten Systeme relevant ist, ausführlicher betrachtet werden.

Der Grenzfall der schwachen elektronischen Kopplung liegt vor, wenn die elektronische Wechselwirkungsstärke V deutlich kleiner als ζ ist [162, 164], sodass die Kernschwingungen und damit die intramolekulare Schwingungsrelaxation des angeregten Donor-Moleküls schneller als der Energietransferprozess auf den Akzeptor ablaufen [154, 164]. Dies bedingt, dass die Anregungsenergie jeweils auf einem Chromophor lokalisiert ist und der Prozess des Energietransfers als inkohärenter Sprung der Energie von Donor auf Akzeptor verstanden werden kann [164]. Dieses Kopplungslimit wird bspw. in verdünnten Farbstofflösungen, in denen keine merkliche Assoziationstendenzen vorliegen, beobachtet [160, 167]. Es gehorcht den klassischen Geschwindigkeitsgesetzen und erlaubt daher die Definition einer Ratenkonstante k_{ET} , mit der die Energie von Donor auf Akzeptor übertragen wird. Das diskutierte Phänomen, welches in Abbildung 7 in einem Jablonski-Diagramm dargestellt wird, wurde erstmalig 1922 von Franck und Cario experimentell detektiert [171, 172] und zunächst Mitte der Vierzigerjahre des vergangenen Jahrhunderts von Förster in seinem Aufsatz „Energiewanderung und Fluoreszenz“ korrekt im Rahmen der klassischen Physik beschrieben [160]. 1948 folgte dann eine quantenmechanische Beschreibung des Vorgangs durch Förster [173].

2.2.2.2 Förster-Theorie und Förster-Resonanzenergietransfer

Förster gelang es, einen Ausdruck für die Energietransfer-Rate k_{ET} zu finden, der sich aus experimentell einfach zugänglichen spektroskopischen Größen zusammensetzt [173, 174]. Hieraus ergibt sich gleichzeitig der enorme Erfolg seiner Theorie, die bis heute eine breite Anwendung als Standard-Konzept zur Interpretation von elektronischen Energietransferprozessen zwischen Chromophoren, deren Abstand sich im Bereich von einem bis zehn Nanometern bewegt, findet [175–178]. Dieser große Erfolg der Förster-Theorie manifestiert sich nicht zuletzt in der Tatsache, dass der von ihr beschriebene Energietransferprozess als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet wird. Abbildung 7 fasst den FRET-Prozess in einem Jablonski-Diagramm zusammen.

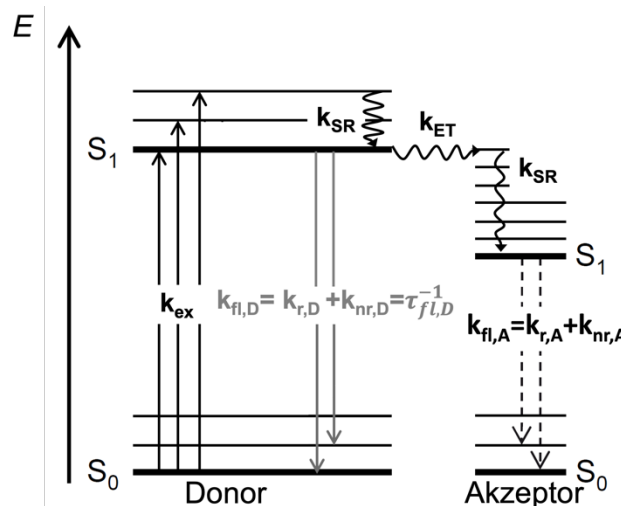


Abbildung 7: Darstellung des Förster-Resonanzenergietransfers zwischen Donor und Akzeptor in einem Jablonski-Termschema.

Zunächst wird das Donor-Molekül durch die Absorption von Photonen entsprechender Energie mit der Anregungsrate k_{ex} aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in die verschiedenen Schwingungsniveaus des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustands S_1 überführt. Wie in Kapitel 2.2.2.1 bereits erwähnt, verläuft aufgrund der vergleichsweise schwachen elektronischen Kopplung V zwischen Donor und Akzeptor die intramolekulare Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand von S_1 mit der Rate k_{SR} schneller als der Energietransfer auf den Akzeptor [154, 164]. Vom Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustandes des Donor-Chromophors kann nun die Energie über einen inkohärenten Sprung mit der Energietransfer-Rate k_{ET} vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden [164]. Auch das infolge des Energieübertrages angeregte Akzeptor-Molekül gelangt zunächst durch Schwingungsrelaxation in den vibratorischen Grundzustand seines S_1 -Niveaus. Von hier aus kann der Akzeptor mit der Rate $k_{fl,A}$ in seinen elektronischen Grundzustand S_0 gelangen. Dabei fasst $k_{fl,A}$ sämtliche Raten derjenigen Prozesse zusammen, die den ersten angeregten Singulett-Zustand des Akzeptors entvölkern. Hierzu gehören die Akzeptor-Fluoreszenz mit der Rate $k_{r,A}$ sowie die Summe der Raten aller Prozesse $k_{nr,A}$, welche zu einer strahlungslosen Depopulation des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes des Akzeptors führen. Zusätzlich zum Prozess des Energietransfers existieren weitere Pfade, über welche der Donor-Fluorophor vom vibratorischen Grundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 in seinen Grundzustand zurückkehren kann. Die Summe der Raten dieser Pfade, die unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines Akzeptor-Farbstoffes das S_1 -Niveau des Donors entvölkern, ist charakteristisch für das Donor-Molekül und wird in der Ratenkonstanten $k_{fl,D}$ zusammengefasst. $k_{fl,D}$ beinhaltet somit die Rate der Donor-Fluoreszenz $k_{r,D}$ sowie die Summe der Raten aller Prozesse $k_{nr,D}$, welche in Abwesenheit des Akzeptor-Fluorophors zu einer

2 Theoretische Grundlagen

strahlungslosen Depopulation des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes des Donors führen. Damit entspricht der Kehrwert von $k_{fL,D}$ gemäß Gleichung (1) der Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{fL,D}$ des Donor-Moleküls in Abwesenheit eines Akzeptors [179]:

$$\tau_{fL,D} = \frac{1}{k_{fL,D}} \quad (7)$$

Kann der Donor-Fluorophor zusätzlich *via* Energietransfer auf ein Akzeptor-Molekül in seinen elektronischen Grundzustand zurückkehren, so wird der vibratorische Grundzustand des ersten elektronisch angeregten Singulett -Zustands S_1 des Donor-Farbstoffes mit der Rate

$$k_{fL,DA} = k_{fL,D} + k_{ET} \quad (8)$$

entvölkert [179]. Folglich spiegelt der Kehrwert der Summe aus $k_{fL,D}$ und k_{ET} die Abklingzeit $\tau_{fL,DA}$ der Donor-Fluoreszenz in Anwesenheit eines Akzeptor-Farbstoffes wider [179]:

$$\tau_{fL,DA} = \frac{1}{k_{fL,D} + k_{ET}} \quad (9)$$

Im Folgenden soll Försters Weg zu seinem Ausdruck für die Ratenkonstante k_{ET} des inkohärenten Energietransfers kurz skizziert werden. Der strahlungsfreie, inkohärente Transfer elektronischer Energie kann gemäß Gleichung (5) als Prozess aufgefasst werden, bei welchem Donor-Relaxation und Akzeptor-Anregung gleichzeitig mit der Energietransfer-Rate k_{ET} ablaufen [159, 180]. Hierbei kann die bereits beschriebene elektronische Wechselwirkung zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donor und Akzeptor als Störung interpretiert werden, welche den Übergang zwischen einem Anfangszustand i , gegeben durch die linke Seite der Gleichung (5), und einem Endzustand f , gegeben durch die rechte Seite der Gleichung (5), induziert. Demnach kann die Übergangsrate k_{ET} , mit welcher der Anfangs- in den Endzustand übergeht, über Fermis Goldene Regel ausgedrückt werden [181]:

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_f | \hat{H}_{el}^{DA} | \Psi_i \rangle|^2 \delta(E_f - E_i) \quad (10)$$

Hierbei bezeichnen Ψ_i und Ψ_f die Wellenfunktionen des Ausgangs- und Endzustandes, $\delta(E_f - E_i)$ beschreibt die Resonanzbedingung der beteiligten Übergänge und \hat{H}_{el}^{DA} symbolisiert den Hamiltonoperator, welcher die elektronische Kopplung der beiden Chromophore D und A ausdrückt. Das Kopplungsmatrixelement aus Gleichung (10) stellt die quantenmechanische Beschreibung des elektronischen Kopplungspotentials V dar, welches sich im Wesentlichen aus zwei Beiträgen, nämlich dem Coulomb-Term V_{coul} sowie dem Austauschterm V_{ex} zusammensetzt [158, 161, 182]:

$$V = |\langle \Psi_f | \hat{H}_{el}^{DA} | \Psi_i \rangle| = V_{coul} + V_{ex} \quad (11)$$

Beide Terme unterscheiden sich signifikant in ihrer jeweiligen Reichweite. Der Coulomb-Term zeichnet sich durch eine vergleichsweise große Reichweite aus, während der Austausch-Term nur bei einem Überlapp der Wellenfunktionen beider Chromophore zum Tragen kommt, weshalb dessen Beitrag exponentiell mit wachsendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor abnimmt [161, 175, 182]. Daher besitzt die Austauschwechselwirkung nur eine sehr kurze Reichweite und kann bei Chromophor-Abständen > 1 nm vernachlässigt werden [158]. Hieraus ergibt sich gleichzeitig eine der Näherungen, die von Förster getroffen wurden, nämlich, dass für ausreichend große Donor-Akzeptor Abstände $V \approx V_{coul}$ [161] gilt. Weiterhin nahm Förster

an, dass der interchromophore Abstand wesentlich größer als die molekularen Dimensionen der betrachteten Fluorophore ist [174, 183]. Diese Prämisse hat zur Folge, dass der Coulomb-Term, der im Rahmen einer Multipolentwicklung formuliert werden kann, auf die Dipol-Dipol-Wechselwirkung V_{dd} zwischen den Übergangsdipolmomenten des Donors μ_D sowie des Akzeptors μ_A reduziert werden kann [161, 175, 180, 184, 185]:

$$V \approx V_{coul} \approx V_{dd} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \kappa \frac{|\mu_D||\mu_A|}{|R_{DA}|^3} \quad (12)$$

Die Stärke der Dipol-Dipol-Interaktion nimmt entsprechend Gleichung (12) mit der dritten Potenz des interchromophoren Abstands R_{DA} ab und ist zusätzlich abhängig von der relativen Orientierung der beteiligten Übergangsdipolmomente. Die letztgenannte Abhängigkeit spiegelt sich im Orientierungsfaktor κ wider [161]:

$$\kappa = 2 \cos(\theta_D) \cos(\theta_A) + \sin(\theta_D) \sin(\theta_A) \cos(\varphi) \quad (13)$$

Die zur Berechnung des Orientierungsfaktors benötigten Winkel werden in Abbildung 8 (a) definiert.

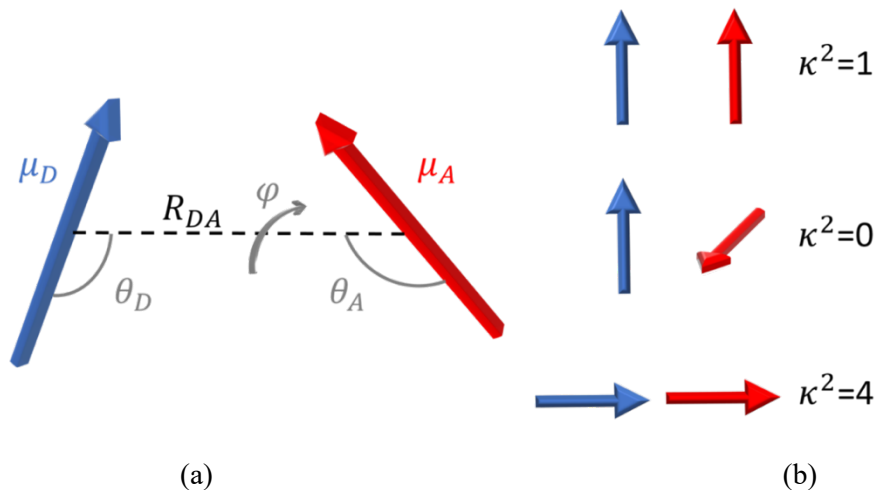


Abbildung 8: (a) Veranschaulichung der relativen Ausrichtung der Übergangsdipolmomente μ_D und μ_A der am Energieübertrag beteiligten Chromophore, welche sich in einem Abstand von R_{DA} zueinander befinden. Die Abbildung illustriert zusätzlich die Definition der Winkel, welche zur Berechnung des Orientierungsfaktors κ mittels Gleichung (13) benötigt werden. In Anlehnung an [161]. (b) Schematische Darstellung der Grenzfälle von κ^2 . In Anlehnung an [155].

θ_D und θ_A bezeichnen die Winkel, welche die Donor-Akzeptor-Verbindungsline R_{DA} mit dem jeweiligen Übergangsdipolmoment einschließt. Die beiden Vektoren der Übergangsdipolmomente spannen mit dem Verbindungsvektor, der die Mittelpunkte von Donor und Akzeptor verbindet, jeweils eine Ebene auf. Dabei ist φ der Winkel zwischen diesen beiden Ebenen. Wie weiter unten gezeigt werden wird, ist die Rate des Energietransfers proportional zum Quadrat des Orientierungsfaktors. Durch Einsetzen der Winkel in die quadrierte Form von Gleichung (13) kann gezeigt werden, dass κ^2 prinzipiell Werte zwischen null und vier annehmen kann (siehe Abbildung 8 (b)). Der erst genannte Grenzfall tritt bei einer orthogonalen Anordnung der beiden Übergangsdipolmomente ein, während letzterer Grenzfall bei einer kollinearen Ausrichtung der Übergangsdipolmomente erhalten wird. Sind die am Energietransfer beteiligten Übergangsdipolmomente parallel angeordnet, beträgt κ^2 eins.

Förster gelang es, einen Zusammenhang zwischen der theoretischen, quantenmechanischen Beschreibung der Energietransferrate aus Gleichung (10) und experimentell simpel zugänglichen

2 Theoretische Grundlagen

spektroskopischen Größen herzustellen [174]. Er erkannte, dass die Resonanzbedingung in Gleichung (10) mit dem spektralen Überlappungsintegral J aus dem flächennormierten Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors $F_D^{norm}(\lambda)$ und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors $\varepsilon_A(\lambda)$ ausgedrückt werden kann [65, 155, 173, 183]:

$$J = \int_0^{\infty} F_D^{norm}(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda} \quad (14)$$

Das nicht normierte Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors wird in obiger Gleichung mit $F_D(\lambda)$ bezeichnet. Weiterhin konnte Förster die in Gleichung (12) auftretenden Stärken der Dipolmomente der am Energieübertrag beteiligten Chromophore mit den ebenfalls praktisch einfach zugänglichen Größen der Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors $\tau_{fl,D}$ sowie dem bereits im Überlappungsintegral auftretenden molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten des Akzeptors ε_A in Beziehung setzen [186]:

$$\mu_A^2 \propto \varepsilon_A \text{ und } \mu_D^2 \propto \frac{1}{\tau_{fl,D}} \quad (15)$$

Wird die Näherung für das Kopplungsmatrixelement aus Gleichung (12), unter Berücksichtigung der in Gleichung (15) dargestellten Proportionalitäten, in Gleichung (10) eingesetzt und die Resonanzbedingung mittels des spektralen Überlappungsintegrales J dargestellt, so ergibt sich für die Übergangsrate k_{ET} des Energietransfers nachstehender Ausdruck [155, 173]:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_{fl,D}} \left(\frac{1}{R_{DA}} \right)^6 \frac{\kappa^2 \phi_D}{n^4} \frac{9000 \ln(10)}{128 \pi^5 N_A} J = \frac{1}{\tau_{fl,D}} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad (16)$$

Demnach ist die Rate des Energietransfers umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des interchromophoren Abstandes R_{DA} sowie direkt proportional zum spektralen Überlapp J . Weiterhin ist die Transferrate abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Chromophors in Abwesenheit des Akzeptors $\tau_{fl,D}$, von der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors ϕ_D , vom Brechungsindex n der Umgebung, von der Avogadro-Konstanten N_A sowie vom Quadrat des Orientierungsfaktors κ . Entsprechend Gleichung (16) ist der Förster-Radius R_0 für das betrachtete Donor-Akzeptor Paar folgendermaßen definiert:

$$R_0 = \left(\frac{\kappa^2 \phi_D}{n^4} \frac{9000 \ln(10)}{128 \pi^5 N_A} J \right)^{\frac{1}{6}} \quad (17)$$

Falls der interchromophore Abstand dem Förster-Radius des betrachteten Farbstoffpaares entspricht ($R_{DA} = R_0$), folgt aus Gleichung (16), dass die Rate des Energieübertrags k_{ET} und die Zerfallsrate des Donors in Abwesenheit des Akzeptors $1/\tau_{fl,D}$ gleich groß sind. Jede zweite Anregung des Donor-Moleküls mündet demnach in einem Energietransferprozess. In den restlichen 50 % der Fälle erfolgt die Relaxation des angeregten Donor-Moleküls in seinen Grundzustand *via* Donor-Relaxation mit der Rate $k_{fl,D}$. Die Effizienz des Energietransfers E_{ET} , die definiert ist als der Anteil der Anregungen des Donors, die auf den Akzeptor transferiert werden [65, 155], beträgt demnach für den skizzierten Grenzfall 50 % und ist allgemein durch folgenden Ausdruck gegeben [65, 155]:

$$E_{ET} = \frac{k_{ET}}{\tau_{fl,D}^{-1} + k_{ET}} \quad (18)$$

Gleichung (18) spiegelt das Verhältnis der Energietransferrate zur gesamten Zerfallsrate des angeregten Donors in Anwesenheit des Akzeptors wider [187]. Wird für k_{ET} der rechte Teil von Gleichung (16) eingesetzt, ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Effizienz der Energieübertragung und dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor [65, 155]:

$$E_{ET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{DA}^6} \quad (19)$$

1967 gelang es Stryer und Haugland, den Zusammenhang aus Gleichung (19) experimentell zu verifizieren [188]. Beide erkannten das immense Potential der stark ausgeprägten Abhängigkeit der Energietransfereffizienz vom Donor-Akzeptor-Abstand für Abstandsmessungen auf molekularem Niveau und prägten den Begriff des spektroskopischen Lineals [188, 189]. In den darauffolgenden Jahren konnte ein rasanter Anstieg an Publikationen, in denen der Energietransfer zwischen zwei Chromophoren benutzt wurde, um Abstände in biologischen Makromolekülen zu vermessen, beobachtet werden [189]. Neben der quantitativen Bestimmung von Abständen kann die immense Abstandsabhängigkeit von E_{ET} aber auch ausgenutzt werden, um rein qualitativ die gegenseitige Annäherung oder Entfernung von Donor- und Akzeptor-Fluorophor zu beobachten. So kann mit Hilfe von FRET-Studien das Vorhandensein verschiedener Konformationen eines Biomoleküls, welches intramolekular mit einem FRET-Paar ausgestattet ist, aufgeklärt werden. Grundvoraussetzung hierbei ist, dass sich der interchromophore Abstand des Energietransfer-Paares beim Übergang zwischen den einzelnen Konformationen des Makromoleküls signifikant verändert und somit unterschiedliche FRET-Effizienzen für die verschiedenen Konformationen resultieren. Als Beispiel sei die Detektion des durch eine Phosphorylierung der Proteinkinase MK2 ausgelösten Übergangs dieser von der inaktiv geschlossenen in die aktiv offene Konformation erwähnt [190].

Abbildung 9 illustriert die mit Gleichung (19) beschriebene Abstandsabhängigkeit von E_{ET} .

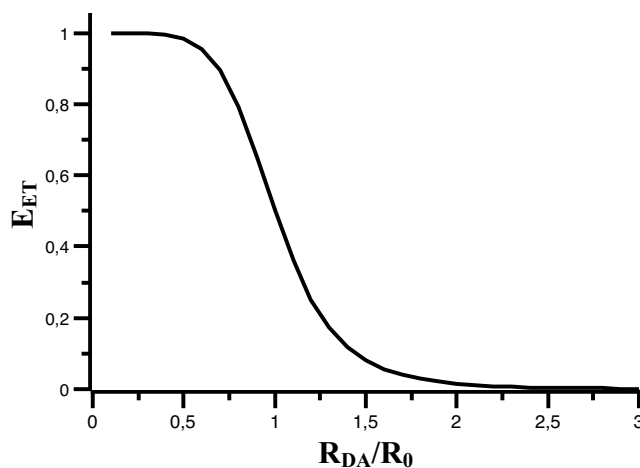


Abbildung 9: Abhängigkeit der Energietransfereffizienz E_{ET} vom auf den Förster-Radius R_0 normierten interchromophoren Abstand R_{DA} . In Anlehnung an [155].

Der Darstellung kann entnommen werden, dass die Effizienz des Energieübertrages im Bereich von $R_{DA} = R_0$ am sensitivsten auf Abstandsänderungen zwischen Donor und Akzeptor reagiert. Ist der interchromophore Abstand kleiner als der Förster-Radius, steigt E_{ET} rasch auf 100 % an, während der Energietransfer im Falle von Donor-Akzeptor-Abständen, die größer als R_0 sind, schnell ineffizient wird. Sollen Abstandänderungen zuverlässig mittels Förster-Resonanzenergietransfer visualisiert werden, ist es daher ratsam das Farbstoffpaar so zu wählen, dass sich der interchromophore Abstand in einem Bereich von $0,5 R_0 < R_{DA} < 2 R_0$ bewegt [155]. Wie Abbildung 9 entnommen werden kann, ist die Sensitivität in den Randbereichen des vorstehend genannten Intervalls allerdings bereits stark eingeschränkt.

2 Theoretische Grundlagen

2.2.2.3 Messung der Energietransfereffizienz

Die Effizienz des Energieübertrages kann auf unterschiedlichen Wegen experimentell bestimmt werden. Ein Ansatz besteht darin, die Fluoreszenz eines mit einem FRET-Paar markierten Systems nach Anregung des Donor-Farbstoffes farbaufgelöst zu detektieren. Die Messgrößen sind dann eine Donor-Fluoreszenzintensität I_D , welche auf eine direkte Anregung des Donor-Chromophors zurückzuführen ist, sowie eine Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A infolge eines Energietransfers des angeregten Donors auf den Akzeptor. Durch Bildung des Verhältnisses der aufgenommenen Intensitäten wird die Effizienz des Energieübertrages erhalten [65, 187]:

$$E_{ET} = \frac{I_A}{\gamma I_D + I_A} \quad (20)$$

γ ist ein Korrekturfaktor, welcher Diskrepanzen in den Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_i von Donor und Akzeptor sowie die unterschiedlichen Detektionseffizienzen η_i des experimentellen Aufbaus gegenüber Donor- und Akzeptor-Emission berücksichtigt [65, 187]:

$$\gamma = \frac{\phi_A \eta_A}{\phi_D \eta_D} \quad (21)$$

Die vorstehend beschriebene Methode der farbaufgelösten Detektion von Donor- und Akzeptor-Emission zur Bestimmung der Energietransfereffizienz *via* Gleichung (20) kommt typischerweise in smFRET-Experimenten (Kapitel 2.2.3.4) zum Einsatz [65]. Eine Verwendung dieses Ansatzes in Ensemblemessungen ist aufgrund diverser Einschränkungen meist weniger attraktiv. Zum einen führt das Vorhandensein einer Mischung mehrerer Spezies, die sich in ihrer Energieübertragungseffizienz unterscheiden, dazu, dass lediglich eine mittlere Transfereffizienz gemessen wird, zum anderen muss die Zusammensetzung der Probe (Reinheit, Markierungsgrad) in hohem Maße bekannt sein [187].

Weiterhin ist es möglich, über zeitaufgelöste Messungen des Fluoreszenzzerfalls des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptor-Fluorophors die Energietransfereffizienz zu ermitteln [187, 191]. Der sich im ersten elektronisch angeregten Zustand befindende Donor-Chromophor ist in Abwesenheit des Akzeptors durch seine mittlere Fluoreszenzlebenszeit $\tau_{fl,D}$ charakterisiert, die durch Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurve einer Referenzprobe, welche lediglich mit dem Donor-Fluorophor markiert ist, ermittelt werden kann. Befindet sich nun ein Akzeptor-Molekül im Abstand R_{DA} zum angeregten Donor, sodass prinzipiell ein Energieübertrag mit der Rate k_{ET} stattfinden kann, so hat dies zur Folge, dass das Donor-Molekül, welches sich im angeregten Zustand befindet, zusätzlich über den Prozess des Energieübertrages auf den Akzeptor, in seinen Grundzustand gelangen kann (siehe Abbildung 7). Dieser zusätzliche Pfad der Depopulation des angeregten Donor-Zustandes resultiert in einer verkürzten Fluoreszenzabklingzeit $\tau_{fl,DA}$ des Donors in Anwesenheit des Akzeptors (vgl. Gleichungen (7) und (9)) und einem damit verbundenen beschleunigten Fluoreszenzzerfall [155, 191]:

$$I_{DA}(t) = I_D^0 \exp\left[-\frac{t}{\tau_{fl,D}} - k_{ET}t\right] = I_D^0 \exp\left[-\frac{t}{\tau_{fl,DA}}\right] \text{ mit } \frac{1}{\tau_{fl,DA}} = \frac{1}{\tau_{fl,D}} + k_{ET} \quad (22)$$

Hierbei ist $I_{DA}(t)$ die zeitabhängige Fluoreszenzintensität des Donor-Farbstoffes in Anwesenheit des Akzeptors und I_D^0 ist die Intensität der Donor-Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Kenntnis der Fluoreszenzlebensdauern des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptor-Chromophors ermöglicht die Berechnung der Übergangsrates k_{ET} des Energietransfers mittels des rechten Ausdruckes in Gleichung (22). Über Gleichung (18) wiederum kann nun die Energietransfereffizienz berechnet werden. Alternativ kann E_{ET} direkt aus den Fluoreszenzlebens-

dauern des Donor-Fluorophores in An- und Abwesenheit des Akzeptors ermittelt werden, indem das Verhältnis beider Lebenszeiten gebildet und dieses von eins subtrahiert wird [155]:

$$E_{ET} = 1 - \frac{\tau_{fl,DA}}{\tau_{fl,D}} \quad (23)$$

Wird nun angenommen, dass ein Molekül, welches mit einem FRET-Paar markiert ist, i unterschiedliche Konformationen einnehmen kann, die sich jeweils in ihrem Abstand $R_{DA}^{(i)}$ zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor und damit in ihrer Energietransferrate $k_{ET}^{(i)}$ unterscheiden, so ergibt sich der zeitabhängige Zerfall der Fluoreszenzintensität des Donors aus der Summe der Intensitätsabklingkurven der i Populationen, wobei die Zerfälle der einzelnen Komponenten entsprechend ihrer relativen Häufigkeit α_i gewichtet sind [155]:

$$I_{DA}(t) = I_D^0 \sum_i \alpha_i \exp \left[-\frac{t}{\tau_{fl,D}} - k_{ET}^{(i)} t \right] = I_D^0 \sum_i \alpha_i \exp \left[-\frac{t}{\tau_{fl,DA}^{(i)}} \right] \quad (24)$$

Die Bestimmung der FRET-Effizienz mittels zeitaufgelöster Messung der Donor-Fluoreszenz bietet gegenüber der weiter oben beschriebenen Bestimmung *via* farbaufgelöster Detektion von Akzeptor- und Donor-Fluoreszenzintensität den Vorteil, dass die gemessenen Fluoreszenzabklingzeiten und folglich die daraus abgeleiteten Energietransfereffizienzen unabhängig von eventuell unterschiedlichen Detektionseffizienzen des experimentellen Aufbaus gegenüber Akzeptor- und Donor-Emission sind. Folglich besteht im Falle der zeitaufgelösten Messung nicht die Notwendigkeit einer instrumentellen Kalibrierung, um quantitative FRET-Messungen durchzuführen [187]. Weiterhin bietet die Methode der zeitaufgelösten Detektion der Donor-Fluoreszenz die Möglichkeit der Identifikation von konformationellen Subpopulationen (siehe Gleichung (24)), auch im Ensemble, während die rein intensitätsbasierte Messung von E_{ET} nach Gleichung (20) im Ensemble lediglich eine mittlere Energietransfereffizienz liefert [187].

1987 präsentierten Kulinski *et al.* eine weitere Methode zur experimentellen Bestimmung der Energietransfereffizienz. Sie erkannten, dass die zeitabhängige Messung der Akzeptor-Fluoreszenz, induziert durch Energieübertrag eines primär angeregten Donors auf den Akzeptor, eine zusätzliche Option zur Bestimmung der Übergangsrates des Energietransfers bietet [192]. Wird der Donor-Chromophor eines FRET-Paar markierten Moleküls selektiv angeregt, so wird, falls Energietransfer zwischen beiden Fluorophoren möglich ist, die Konzentration angeregter Akzeptor-Moleküle $[A^*]$, infolge des ablaufenden Energieübertrages von angeregtem Donor auf Akzeptor, zunächst ansteigen, ehe dann der angeregte Zustand der Akzeptor-Fluorophore über strahlende und nicht-strahlende Prozesse mit der Rate $k_{fl,A}$ entvölkert wird [179]:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = [D^*] \cdot k_{ET} - [A^*] \cdot k_{fl,A} \quad (25)$$

Hierbei bezeichnet $[D^*]$ die Konzentration der Donor-Farbstoffe, welche sich im angeregten Zustand befinden. Die Lösung der in Gleichung (25) notierten Differentialgleichung liefert folgenden Ausdruck für die Konzentration der angeregten Akzeptor-Fluorophore als Funktion der Zeit [179]:

$$[A^*] = \frac{[D^*]_0 k_{ET}}{k_{fl,A} - k_{fl,D} - k_{ET}} \left(e^{-(k_{fl,D} + k_{ET}) t} - e^{-k_{fl,A} t} \right) \quad (26)$$

Im Falle von $[D^*]_0$ handelt es sich um die Konzentration der Donor-Moleküle, welche sich zum Zeitpunkt $t = 0$ im angeregten Zustand befinden. Der vordere sich in der Klammer befindende

Summand in Gleichung (26) spiegelt den Anstieg der Konzentration angeregter Akzeptor-Farbstoffe und damit den Anstieg der Akzeptor-Emission infolge des Energietransfers wider. Dabei läuft der Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz mit einer Zeitkonstanten ab, die äquivalent zur Abklingzeit $\tau_{fl,DA}$ der Donor-Fluoreszenz in Anwesenheit des Akzeptors ist [154, 193]. Der Mehrwert dieser Methode gegenüber der zuvor vorgestellten zeitaufgelösten Messung der Donor-Emission besteht darin, dass lediglich Moleküle beobachtet werden, welche über ein intaktes Donor-Akzeptor-Paar verfügen und damit Energietransfer zeigen können [179, 194]. Weiterhin ermöglicht die zeitaufgelöste Detektion der Akzeptor-Fluoreszenz die zuverlässige Bestimmung von sehr hohen Transferraten, sogar dann, wenn Transfereffizienzen von nahezu 100 % erreicht werden [194]. Solch hohe Übertragungseffizienzen führen dazu, dass nahezu die komplette Donor-Emission gelöscht wird und sie daher mit der zeitabhängigen Messung der Donor-Emission nur unzulänglich bestimmt werden können.

2.2.3 Optische Fluoreszenzspektroskopie einzelner Moleküle

Der überwiegende Part der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente basiert auf fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an einzelnen Molekülen. Grund hierfür ist, dass Einzelmolekülmessungen gegenüber Messungen am Ensemble, speziell im Hinblick auf die in dieser Studie relevanten Fragestellungen, einige nicht unerhebliche Vorteile bieten. Während Ensemblestudien aufgrund der simultanen Messung an einer Vielzahl von Molekülen die inhärente Eigenschaft besitzen lediglich Mittelwerte beliebiger Parameter zu liefern, ermöglichen Einzelmolekülmessungen den Zugang zur vollständigen Verteilung der jeweiligen betrachteten physikalischen Größe [195]. Neben statischen Inhomogenitäten kann mittels Einzelmolekülstudien auch die zeitliche Entwicklung (dynamische Inhomogenität) einer physikalischen Größe beobachtet werden. Da sich ein einzelnes Molekül zu einem gegebenen Zeitpunkt nur in exakt einem Zustand befinden kann, erlauben Einzelmolekülmessungen die Verfolgung zeitabhängiger Prozesse, ohne die Notwendigkeit der Synchronisation der unzähligen Konstituenten eines Ensembles [196]. Aufgrund der angeführten Vorteile stellen Messungen an einzelnen Molekülen ein mächtiges und attraktives Instrumentarium zur Aufklärung konformationeller Subpopulationen von Biopolymeren sowie zur Untersuchung der Dynamik des Austausches zwischen diesen Subpopulationen dar [197, 198]. Demnach scheinen Einzelmolekülstudien prädestiniert für die Behandlung zentraler Problemstellungen dieser Arbeit zu sein. An dieser Stelle sei vorab erwähnt, dass die vorstehend beschriebene Mittelung über eine große Anzahl an Molekülen auch der in Kapitel 2.2.3.2 beschriebenen FCS inhärent ist.

Zur erfolgreichen Durchführung von Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen müssen sowohl das untersuchte Probensystem als auch die verwendete Messtechnik einige Bedingungen erfüllen. Grundvoraussetzung für die optische Untersuchung einzelner Fluorophore ist deren Separierung von anderen Emittern, sodass jeweils maximal ein Molekül zur Fluoreszenz angeregt wird. Die Isolierung einzelner Chromophore kann hierbei im Orts- oder Frequenzraum hergestellt werden. Die Separierung im Frequenzraum erfordert meist tiefe Temperaturen, da Fluorophore unter diesen Bedingungen scharfe Absorptionslinien aufweisen können. Diese unterscheiden sich aufgrund unterschiedlicher lokaler Umgebungen der einzelnen Farbstoffe in ihrer Übergangsfrequenz, sodass gezieltes Abfragen einzelner Chromophore mittels schmalbandiger Anregung möglich wird, auch wenn sich mehrere Farbstoffmoleküle im Fokusbereich befinden [195, 199]. Da die DENV-PR allerdings unter möglichst nativen Bedingungen, also nicht bei tiefen Temperaturen, dafür frei beweglich in Lösung, untersucht werden sollte, fand in der vorliegenden Studie die Methode der Separierung im Frequenzraum keine Verwendung. Hintergrund hierfür ist, dass höhere Temperaturen eine Verbreiterung der Absorptionsübergänge bedingen, wodurch eine spektrale Selektion der einzelnen Chromophore unmöglich wird. Stattdessen müssen die einzelnen Emitter über eine geeignete Probenpräparation räumlich isoliert werden, sodass sich maximal ein Fluorophor im Beobachtungsvolumen befindet [195].

Weiterhin muss für eine zuverlässige Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis gewährleistet werden [196, 200]. Seitens des Proben-systems bedeutet dies, dass sich der untersuchte Fluorophor im Idealfall durch eine möglichst starke Absorption, eine große Fluoreszenzquantenausbeute, eine geringe Population von Dunkelzuständen sowie eine hohe photochemische Stabilität auszeichnen sollte [196]. Gleichzeitig muss die zur Einzelmolekülmessung verwendete Apparatur eine große Detektionseffizienz aufweisen, sodass möglichst viele der emittierten Fluoreszenzphotonen erfasst werden [201]. Daher empfiehlt es sich, Objektive mit hoher numerischer Apertur zu verwenden [200], da diese Licht über einen vergleichsweise großen Raumwinkel einsammeln können. Ebenso ist der Einsatz von Detektoren, welche sich durch hohe Quanteneffizienzen im betrachteten Wellenlängenbereich auszeichnen, essentiell [201]. Alle vorstehend aufgeführten Aspekte dienen der Maximierung des Fluoreszenzsignals. Um das Signal-Rausch-Verhältnis darüber hinaus zu optimieren, sollte weiterhin das Rauschen bzw. Hintergrundsignal so gering wie möglich gehalten werden. Zu diesem trägt neben der Dunkelzählrate der verwendeten Detektoren hauptsächlich ein vom Anregungslaser verursachter Hintergrund bei, welcher sich aus gestreutem Anregungslicht (Rayleigh- und Ramanstreuung) sowie Emissionen von fluoreszierenden Verunreinigungen in der Probe zusammensetzt [200]. Bezüglich der verwendeten Messtechnik gilt daher der Grundsatz, dass diese möglichst kleine Beobachtungsvolumina ermöglichen sollte, da so das Hintergrundsignal relativ zum Fluoreszenzsignal minimiert wird und folglich ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis resultiert [196, 200]. Eine Methode, welche diese Minimierung des Hintergrundsignals effektiv ermöglicht, ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie [200, 202], die sich folgerichtig als Standardmethode für Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen durchgesetzt hat [195]. Auch in dieser Arbeit wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop für die einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen verwendet, weshalb dessen Funktionsprinzip im folgenden Abschnitt kurz skizziert werden soll. Für eine detaillierte Beschreibung sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [203, 204].

2.2.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 10 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Zunächst wird der zur Anregung verwendete Laserstrahl auf eine Lochblende fokussiert, sodass eine punktförmige Lichtquelle resultiert. In der vorliegenden Studie wurde statt des Anregungspinholes eine Glasfaser zur Erzeugung der punktförmigen Lichtquelle verwendet. Die divergente Strahlung der Punktlichtquelle wird nun mittels einer Linse kollimiert und trifft auf einen dichroitischen Strahlteiler, welcher das Anregungslicht in Richtung des Objektivs reflektiert. Dieses wiederum fokussiert den anregenden Laserstrahl in den Probenraum und bildet damit die punktförmige Lichtquelle in die Probe ab, sodass nur ein minimaler, beugungslimitierter Bereich des Präparates ausgeleuchtet wird. Befindet sich ein Fluorophor im kleinen Bereich der Strahltaile des fokussierten Anregungslichtes, auf welchen sich die Anregungswahrscheinlichkeit konzentriert, so wird dieser angeregt und strahlt Fluoreszenzlicht in alle Raumrichtungen ab. Dasselbe Objektiv, welches bereits zur Fokussierung des anregenden Laserstrahles verwendet wurde, sammelt gleichzeitig sowohl einen Teil des emittierten Lichtes als auch gestreutes Anregungslicht aus dem beleuchteten Fokusvolumen ein und leitet dieses in Richtung des Detektionsstrahlenganges. Auf dem Weg dorthin passiert das eingesammelte Licht denselben dichroitischen Strahlteiler, der zuvor das Laserlicht in das Objektiv lenkte. Am dichroitischen Spiegel wird das gestreute Anregungslicht erneut reflektiert und damit vom Fluoreszenzlicht, welches aufgrund seiner Rotverschiebung den Strahlteiler passieren kann, abgetrennt.

Oftmals genügt der dichroitische Strahlteiler allein jedoch nicht, um eine nahezu vollständige spektrale Aufreinigung des Fluoreszenzlichtes zu gewährleisten. Daher kann zur weiteren Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zusätzlich ein Langpassfilter in den Detektionsstrahlengang platziert werden, welcher restliches Streulicht unterdrückt. Anschließend wird das

2 Theoretische Grundlagen

verbleibende, vom Fluorophor emittierte Licht mittels einer Tubuslinse auf eine Lochblende in der Zwischenbildebene fokussiert, wodurch das Beobachtungsvolumen sowohl in axialer als auch in lateraler Richtung begrenzt werden kann (siehe Abbildung 11). Lediglich Fluoreszenzlicht, welches von Fluorophoren oder Verunreinigungen ausgeht, die auf der optischen Achse in der Objektebene lokalisiert sind, kann das Detektionsspinnhole ungehindert passieren. Emissionen, die nicht der Fokusregion in der Probe entstammen, werden von der Lochblende stark abgeschwächt bzw. geblockt. Die beschriebene räumliche Selektion bildet die Grundlage für das im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie verbesserte axiale und laterale Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops. Gleichzeitig trägt sie neben der zuvor beschriebenen spektralen Aufreinigung des Fluoreszenzsignales maßgeblich zu einem günstigen Signal-Rausch-Verhältnis bei.

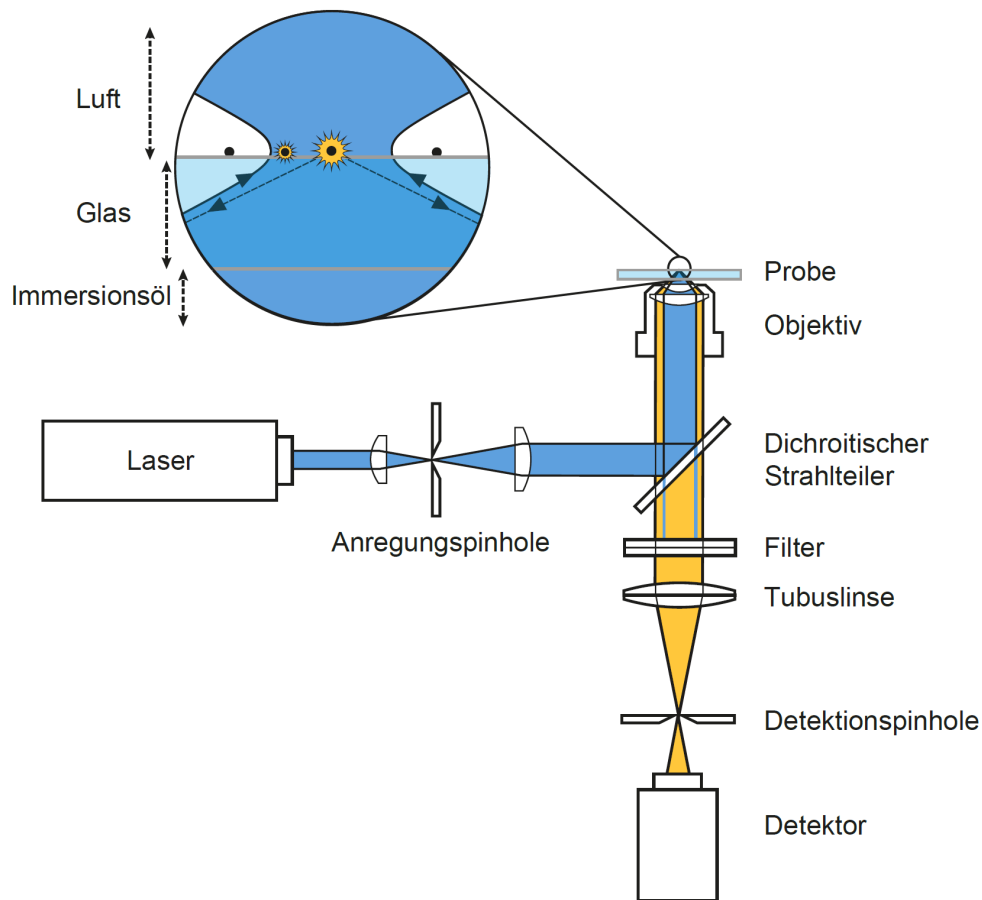


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops. In der Vergrößerung wird die Strahltaile des in den Probenraum fokussierten Anregungslichtes (blau) dargestellt. Im gezeigten Beispiel sind die Probenmoleküle (schwarze Punkte), die zur Fluoreszenz (gelb) angeregt werden, auf der Glasoberfläche immobilisiert. Es können jedoch auch frei in Lösung diffundierende Systeme untersucht werden. Hierzu muss das Laserlicht in die Lösung fokussiert werden. Leicht modifiziert nach [205].

Statt des Detektionsspinnholes kann, wie bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten konfokalen Mikroskop, eine Avalanche-Photodiode (APD) in die Zwischenbildebene platziert werden. Ist deren aktive Fläche hinreichend klein, so kann sie die Funktion der Lochblende übernehmen. Das erläuterte konfokale Prinzip bedingt, dass die Probe zu keiner Zeit als Ganzes ausgeleuchtet wird, vielmehr wird lediglich das kleine Volumen des Laserfokus bestrahlt. Daher ist es unabdingbar, den Anregungsfokus relativ zur Probe zu bewegen, um ein Fluoreszenzbild des untersuchten Präparates zu erhalten. Hierzu kann entweder die Probe selbst relativ zum stationären Beobachtungsvolumen verschoben werden oder aber der Fokus wird über das ortsfeste Präparat gerastert.

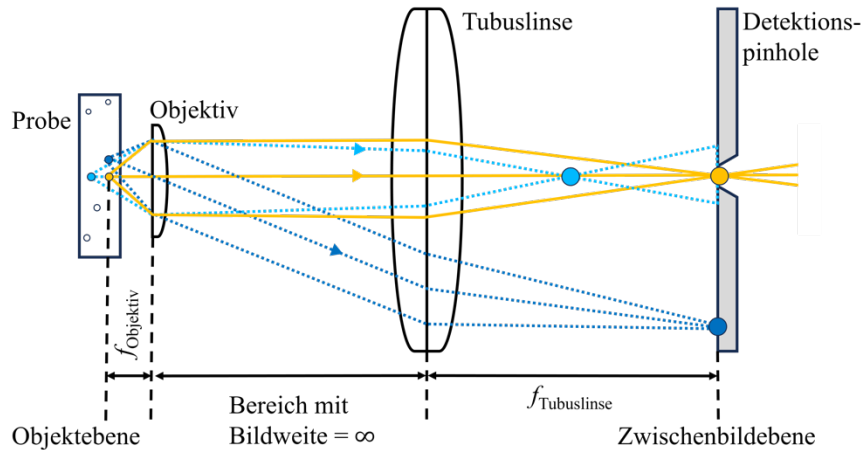


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Verbesserung des axialen und lateralen Auflösungsvermögens eines konfokalen Mikroskops durch räumliche Selektion des eingesammelten Fluoreszenzlichtes mittels eines Detektionspinholes in der Zwischenbildebene: Die Fluoreszenz eines Farbstoffes, der auf der optischen Achse in der Objektebene lokalisiert ist (gelber Punkt), wird in das Zentrum des Detektionspinholes abgebildet und kann folglich die Lochblende weitestgehend ungehindert passieren. Dahingegen kann Licht, dessen Ursprung lateral zum Anregungsfokus versetzt ist (dunkelblauer Punkt) in der Detektion ausgeblendet werden, während Emissionen axial versetzten Ursprunges (hellblauer Punkt) stark abgeschwächt werden. Leicht modifiziert nach [206].

2.2.3.2 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) ist eine Standardmethode zur Untersuchung der Dynamik von fluoreszenzmarkierten Molekülen, die durch das kleine Beobachtungsvolumen V_{eff} eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops diffundieren. Dabei wird die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Über eine statistische Analyse der Fluoreszenzfluktuationen werden Informationen über die Kinetik der Prozesse, die den Intensitätsschwankungen zugrunde liegen, erhalten. [155, 207–210]

Da die FCS eine minimal invasive Methode darstellt, findet sie breite Anwendung in biophysikalischen Studien [211–213].

Funktionsprinzip der FCS

Das Funktionsprinzip der FCS ist in Abbildung 12 dargestellt. Frei in Lösung diffundierende Fluorophore werden mit einem in die Probenlösung fokussierten Laser zur Fluoreszenz angeregt und die resultierende Emission konfokal detektiert. Das Detektionsprofil $p(r)$ des konfokalen Beobachtungsvolumens V_{eff} , innerhalb dessen die Fluoreszenzintensität aufgezeichnet wird, ergibt sich aus einer Faltung des Profils der Anregungsintensität $I(r)$ mit der räumlichen Verteilung der Detektionseffizienz (*collection efficiency function*, CEF) des Mikroskops und kann mit Hilfe einer dreidimensionalen Gaußverteilung beschrieben werden [155]:

$$p(r) = \text{CEF}(r) \cdot I(r) = I_0 \exp\left(-2 \frac{x^2 + y^2}{w_0^2}\right) \exp\left(-2 \frac{z^2}{z_0^2}\right) \quad (27)$$

Hierbei bezeichnen w_0 und z_0 die beiden Halbachsen des ellipsoiden Beobachtungsvolumens, bei denen das Detektionsprofil auf $1/e^2$ der maximalen Intensität I_0 abgefallen ist [155]. Die Dimensionen beider Halbachsen bestimmen folglich die Größe des konfokalen Beobachtungsvolumens V_{eff} [155]:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} w_0^2 \cdot z_0 \quad (28)$$

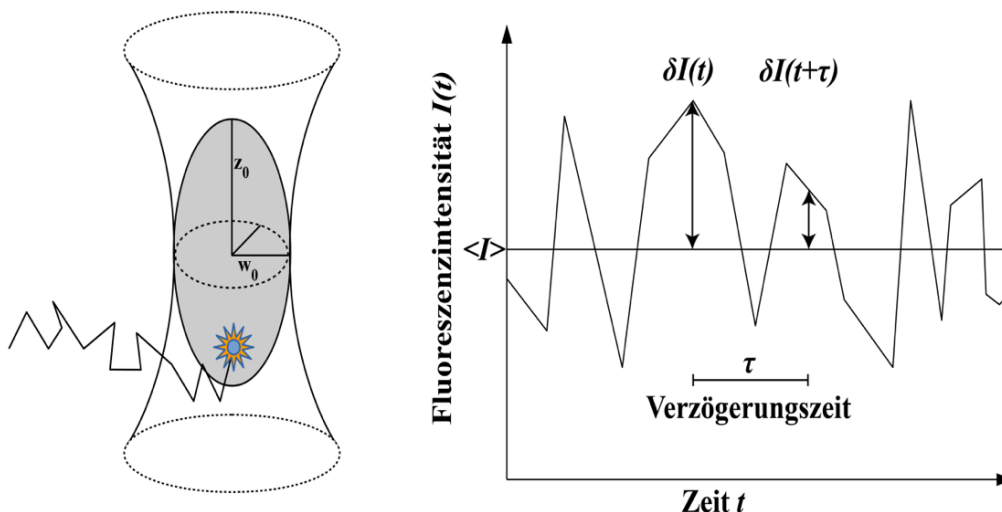


Abbildung 12: Funktionsprinzip der FCS. Links ist das ellipsoide Beobachtungsvolumen V_{eff} grau schattiert dargestellt (w_0 : Radius des Ellipsoids in der Fokalebene; z_0 : Radius des ellipsoiden Beobachtungsvolumens entlang der optischen Achse). U. a. aufgrund der Tatsache, dass die Moleküle in das Beobachtungsvolumen hinein und aus diesem heraus diffundieren, werden Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität $\delta I(t)$ um den Mittelwert $\langle I \rangle$ in der Intensitäts-Zeitspur beobachtet (rechter Teil der Abbildung). [214]

Innerhalb des konfokalen Beobachtungsvolumens V_{eff} wird die Fluoreszenzintensität $I(t)$ in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen (Intensitäts-Zeitspur). Nur Fluorophore, die sich im Beobachtungsvolumen befinden, werden zur Fluoreszenz angeregt und können zum Messsignal beitragen. Aufgrund verschiedener dynamischer Prozesse, wie beispielsweise der Translationsdiffusion [215], kommt es zu zeitabhängigen Fluktuationen $\delta I(t)$ in der Fluoreszenzintensität um den Mittelwert $\langle I(t) \rangle$:

$$\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle \quad (29)$$

Sämtliche Informationen über die Kinetik der Prozesse, welche den Schwankungen zugrunde liegen, sind in den Fluoreszenzintensitätsfluktuationen verschlüsselt und können durch eine statistische Analyse mit einer Korrelationsfunktion herausgefiltert werden. Dabei geben Korrelationen ganz allgemein Auskunft über den Grad eines Zusammenhangs zwischen zwei oder mehreren Merkmalen [216]. Mit einer Autokorrelation wird der Zusammenhang zwischen zeitlich verschiedenen Messwerten eines einzigen Merkmals betrachtet. Sie beschreibt die Korrelation eines Signals $I(t)$ zum Zeitpunkt t mit einem um die Zeitdifferenz τ verschobenen Signal $I(t + \tau)$. Generell können auch zwei Signale $I_x(t)$ und $I_y(t)$, die mit zwei unterschiedlichen Detektoren x und y aufgenommen wurden, miteinander kreuzkorreliert werden. Die Größe der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit eines gemessenen Signals bzw. für die Ähnlichkeit zweier verschiedener Signale zu verschiedenen Zeiten t und $t + \tau$. Sie liefert daher Informationen über die Zeitskalen der Prozesse, die den zeitabhängigen Fluktuationen zugrunde liegen. Für eine Zeitverschiebung von $\tau = 0$ hat die klassische Autokorrelation den größten Wert, da das unverschobene Signal mit sich selbst am ähnlichsten ist. Die auf das Quadrat der mittleren Intensität normierten Auto- ($x = y$) bzw. Kreuzkorrelationen ($x \neq y$) berechnen sich wie folgt [217, 218]:

$$G_{x,y}(\tau) = \frac{\langle \delta I_x(t) \cdot \delta I_y(t + \tau) \rangle}{\langle I_x(t) \rangle \cdot \langle I_y(t) \rangle} \quad (30)$$

Wenn zwischen den Werten einer Zeitreihe eine Korrelation besteht, hat auch $G_{x,y}(\tau > 0)$ für die entsprechende Zeitverschiebung τ einen von null verschiedenen Wert. Die Amplitude

nimmt mit wachsendem τ ab und wird für $\tau \rightarrow \infty$ null. Je langsamer der dynamische Prozess ist, der den Intensitätsfluktuationen zugrunde liegt, desto langsamer fällt die Korrelationsfunktion auf null ab. Das wiederum bedeutet, dass über Geschwindigkeit und Form des zeitlichen Zerfalls von $G_{x,y}(\tau)$ Informationen über die Kinetik der den Intensitätsfluktuationen zugrunde liegenden dynamischen Prozesse gewonnen werden können. Prinzipiell können mit der FCS sämtliche dynamischen Prozesse, welche die Fluoreszenzemission des betrachteten Systems zeitabhängig beeinflussen und damit Schwankungen in der Fluoreszenzintensität hervorrufen, untersucht werden. Hierzu gehören neben der bereits erwähnten Translationsdiffusion [219, 220] auch molekulare Dynamiken wie z. B. Konformationsübergänge von Biomolekülen [221–227] sowie chemische Reaktionen [219], aber auch photophysikalische Prozesse wie beispielsweise Übergänge in Triplett-Zustände [228, 229].

Palmer und Thompson zeigten 1987, dass die Intensitätskorrelationsfunktion, unter der Voraussetzung, dass die Diffusionskoeffizienten aller beteiligten Spezies identisch sind, als Produkt bestehend aus einem Diffusionsterm $G_{diff}(\tau)$ und einem kinetischen Reaktionsterm $X_{x,y}(\tau)$ formuliert werden kann [230]:

$$G_{x,y}(\tau) = G_{diff}(\tau) \cdot X_{x,y}(\tau) \quad (31)$$

Hierbei umfasst der kinetische Reaktionsterm alle inter- und intramolekularen Prozesse, welche die Helligkeit eines Fluorophors zeitabhängig beeinflussen.

Einfache freie dreidimensionale Translationsdiffusion

Wenn nur die freie dreidimensionale Translationsdiffusion der fluoreszierenden Moleküle zu Schwankungen in der Fluoreszenzintensität führt, findet man für die Korrelationskurve folgende analytische Lösung [231, 232]:

$$G_{diff}(\tau) = G(0) \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{w_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (32)$$

Hierbei ist $G(0)$ die Amplitude der Korrelationsfunktion und τ_D die laterale Diffusionszeit der Moleküle (mittlere Verweildauer der Fluorophore im Beobachtungsvolumen). Die Amplitude der Intensitätskorrelationsfunktion verhält sich reziprok zur mittleren Anzahl an fluoreszenzmarkierten Molekülen $\langle N \rangle$ im Fokaltvolumen und stellt somit ein Maß für die Konzentration c des fluoreszenzmarkierten Analyten dar [231]:

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{c \cdot V_{eff}} \quad (33)$$

Die laterale Diffusionszeit τ_D ist über folgende Gleichung mit dem Translationsdiffusionskoeffizienten D_{trans} des Analyten verknüpft [155]:

$$\tau_D = \frac{(w_0)^2}{4D_{trans}} \quad (34)$$

Aus dem Translationsdiffusionskoeffizienten wiederum kann mit der Viskosität η des Lösungsmittels und der Boltzmann-Konstante k_B über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius R_H der betrachteten Spezies bei einer gegebenen Temperatur T berechnet werden [233]:

2 Theoretische Grundlagen

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_{trans}} \quad (35)$$

Werden zwei Signale mit zwei unabhängigen Detektoren x und y aufgenommen, beispielsweise die Intensitäten eines Donor-Fluorophors ($I_D(t)$) und eines Akzeptor-Farbstoffes ($I_A(t)$) im Rahmen eines FCS-FRET Experimentes (siehe Kapitel 2.2.3.3), so können gemäß Gleichung (30) zwei Autokorrelationsfunktionen ($G_{D,D}(\tau)$, $G_{A,A}(\tau)$) und zwei Kreuzkorrelationsfunktionen ($G_{D,A}(\tau)$, $G_{A,D}(\tau)$) berechnet werden. Wird nun angenommen, dass das ellipsoide Beobachtungsvolumen in beiden Detektionskanälen identisch ist und weiterhin die unterschiedlichen Spezies übereinstimmende Translationsdiffusionskoeffizienten besitzen, so folgt aus Gleichung (32) unmittelbar, dass die Diffusionsterme aller vier Korrelationsfunktionen ununterscheidbar sind. Schwille *et al.* zeigten 1997 jedoch, dass die Annahme identischer Detektionsvolumina in beiden Kanälen keineswegs in jedem Falle gerechtfertigt ist. Da sich das Detektionsprofil von V_{eff} aus einer Faltung des Anregungsvolumens mit der räumlichen Verteilung der Detektionseffizienz des Mikroskops (siehe Gleichung (27)), die u. a. wellenlängenabhängig ist, ergibt, besteht eine Abhängigkeit der Größe des konfokalen Beobachtungsvolumens von der Anregungswellenlänge, vom optischen Pfad des entsprechenden Detektionskanals sowie von der jeweiligen Emissionswellenlänge. Wird davon ausgegangen, dass die Beobachtungsvolumina von Donor- und Akzeptor-Kanal, beispielsweise aufgrund signifikant verschiedener Emissionswellenlängen der beiden Farbstoffe, ungleich sind, so ergeben sich für die effektiven Beobachtungsvolumina und die durchschnittlichen lateralen Diffusionszeiten folgende Ausdrücke [234]:

Donor-Autokorrelation $G_{D,D}(\tau)$:

$$V_{eff}^{D,D} = \pi^{3/2} w_D^2 \cdot z_D \text{ und } \tau_D^{D,D} = \frac{w_D^2}{4D_{trans}} \quad (36)$$

Akzeptor-Autokorrelation $G_{A,A}(\tau)$:

$$V_{eff}^{A,A} = \pi^{3/2} w_A^2 \cdot z_A \text{ und } \tau_D^{A,A} = \frac{w_A^2}{4D_{trans}} \quad (37)$$

Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelationen $G_{D,A}(\tau)$ und $G_{A,D}(\tau)$:

$$V_{eff}^{D,A} = V_{eff}^{A,D} = \pi^{3/2} \frac{(w_D^2 + w_A^2) \cdot (z_D^2 + z_A^2)^{1/2}}{2^{3/2}} \text{ und } \tau_D^{D,A} = \tau_D^{A,D} = \frac{w_D^2 + w_A^2}{4D_{trans} \cdot 2} \quad (38)$$

Hierbei bezeichnen w_D und z_D die beiden Halbachsen des ellipsoiden Beobachtungsvolumens im Donor-Kanal, während w_A und z_A die Radien des Detektionsellipsoids im Akzeptor-Kanal symbolisieren. Durch Vergleich der Ausdrücke für die lateralen Diffusionszeiten in den Gleichungen (36) – (38) ergibt sich, dass die Kreuzkorrelationsfunktion im Falle abweichender Detektionsvolumina in beiden Kanälen genau zwischen den Donor- und Akzeptor-Autokorrelationsfunktionen zu liegen kommt, sofern lediglich die freie dreidimensionale Translationsdiffusion zu Intensitätsfluktuationen führt [234].

2.2.3.3 FCS-FRET-Experiment

Wie im vorstehenden Kapitel erwähnt, kann prinzipiell jedes schwankende Fluoreszenzsignal einer Korrelationsanalyse unterzogen werden, mithilfe derer die Kinetik, der den Schwankungen zugrunde liegenden Prozesse, bestimmt werden kann. Aufgrund dieser Tatsache kann es interessant sein, ein Biomolekül, welches konformationelle Übergänge aufweist, mit einem

FRET-Farbstoffpaar auszustatten und dieses System einem FCS-Experiment zu unterziehen. Sind beide Farbstoffe an geeigneten Positionen im Molekül angebracht, sodass sich deren Abstand innerhalb der verschiedenen Konformationen des Biomoleküls unterscheidet, resultieren aufgrund von Konformationsübergängen Fluktuationen in der Energietransfereffizienz, womit es zu messbaren Schwankungen in der Fluoreszenzintensität kommt. Mithilfe einer Korrelationsanalyse kann sodann die Kinetik der Konformationsdynamik aus den Intensitätsfluktuationen extrahiert werden. Die Kombination, bestehend aus einem FCS- sowie einem FRET-Experiment, stellt eine mächtige Methode dar, um intramolekulare Dynamiken zu untersuchen. Dies wird durch eine Reihe von Veröffentlichungen auf diesem Gebiet deutlich [73, 218, 235–237].

Ein beliebiges Biomolekül, welches zwischen zwei Konformationen S_1 und S_2 schalten kann, sei sowohl mit einem Donor-Farbstoff D als auch mit einem Akzeptor-Farbstoff A markiert und liege frei diffundierend in Lösung vor. Der Donor werde direkt mit einem in die Lösung fokussierten Laser angeregt, wobei ein Teil der Anregungsenergie *via* Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden kann. Dabei sei das FRET-Paar derart an das untersuchte Molekül angebracht, dass sich die beiden möglichen Zustände S_1 und S_2 signifikant in ihrer FRET-Effizienz E_{ET} unterscheiden (siehe Abbildung 13). Werden nun die Fluoreszenzintensitäten des Donors ($I_D(t)$) sowie des Akzeptors ($I_A(t)$) mithilfe zweier unabhängiger Detektoren x und y kontinuierlich aufgezeichnet, so stellt die Konformationsdynamik neben der freien dreidimensionalen Translationsdiffusion eine zusätzliche Quelle für Fluoreszenzintensitätsschwankungen dar. Für das beschriebene System können gemäß Gleichung (30) zwei Autokorrelationsfunktionen ($G_{D,D}(\tau)$, $G_{A,A}(\tau)$) und zwei Kreuzkorrelationsfunktionen ($G_{D,A}(\tau)$, $G_{A,D}(\tau)$) berechnet werden. Wird angenommen, dass die Diffusionskoeffizienten beider sich ineinander umwandelnden Spezies identisch sind, so ergeben sich die Korrelationsfunktionen als Produkt aus einem Diffusionsterm und einem kinetischen Reaktionsterm, der die Konformationsdynamik des Biomoleküls berücksichtigt (siehe Gleichung (31)). Um die Kinetik der Konformationsübergänge zuverlässig extrahieren zu können, muss der Diffusionsterm vom kinetischen Reaktionsterm entkoppelt werden, da funktionell wichtige Konformationsdynamiken häufig, ähnlich wie die Translationsdiffusion, im Mikro- bis Millisekunden Bereich stattfinden [73, 221, 238, 239]. Diesbezüglich werden in der Literatur verschiedene Lösungswege skizziert.

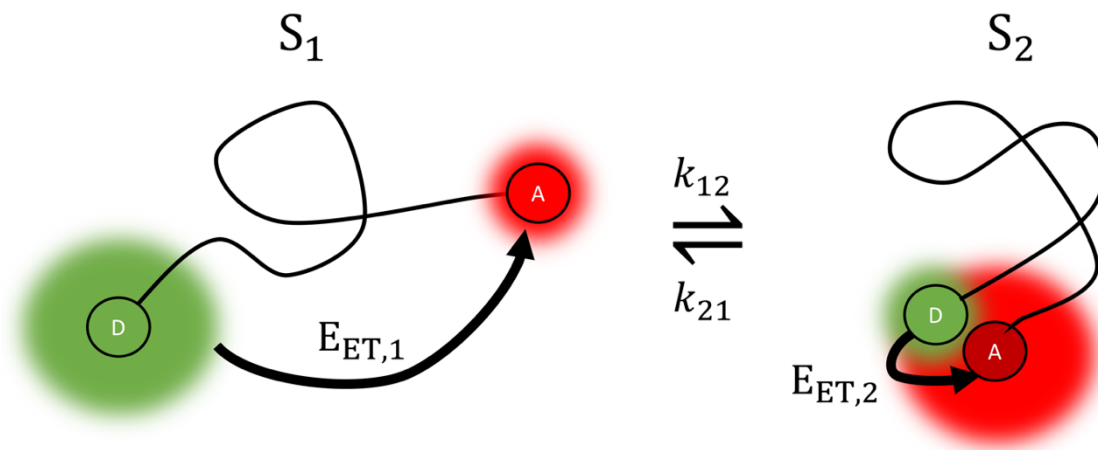


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Konformationsdynamik eines Biomoleküls, welches die beiden Konformationen S_1 und S_2 einnehmen kann, mit einem Donor-Farbstoff D sowie einem Akzeptor-Farbstoff A markiert ist und frei diffundierend in Lösung vorliegt. k_{12} und k_{21} bezeichnen die Geschwindigkeitskonstanten für die Übergänge zwischen beiden Zuständen. Der Donor wird direkt mithilfe eines in die Probenlösung fokussierten Lasers angeregt und kann einen Teil seiner Anregungsenergie *via* Energietransfer auf den Akzeptor übertragen. Da sich der Abstand zwischen dem FRET-Paar in beiden Konformationen signifikant unterscheidet, resultieren die beiden distinkten Energietransfereffizienzen $E_{ET,1}$ und $E_{ET,2}$. In Anlehnung an [218].

2 Theoretische Grundlagen

Ein äußerst pragmatischer Ansatz geht dabei auf eine Arbeit von Torres und Levitus aus dem Jahr 2007 zurück [218]. Diesen gelang die Herleitung der analytischen Ausdrücke für die vier Korrelationsfunktionen des in Abbildung 13 beschriebenen Systems:

$$G_{D,D}(\tau) = G_{diff}(\tau) \cdot \left(1 + \frac{k_{12} \cdot k_{21} \cdot (E_{ET,1} - E_{ET,2})^2}{(k_{21} \cdot (1 - E_{ET,1}) + k_{12} \cdot (1 - E_{ET,2}))^2} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{ex}}} \right) \quad (39)$$

$$G_{A,A}(\tau) = G_{diff}(\tau) \cdot \left(1 + \frac{k_{12} \cdot k_{21} \cdot (E_{ET,1} - E_{ET,2})^2}{(k_{21} \cdot E_{ET,1} + k_{12} \cdot E_{ET,2})^2} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{ex}}} \right) \quad (40)$$

$$G_{D,A}(\tau) = G_{A,D}(\tau) = G_{diff}(\tau) \cdot \left(1 - \frac{k_{12} \cdot k_{21} \cdot (E_{ET,1} - E_{ET,2})^2}{(k_{21} \cdot (1 - E_{ET,1}) + k_{12} \cdot (1 - E_{ET,2})) (k_{21} \cdot E_{ET,1} + k_{12} \cdot E_{ET,2})} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{ex}}} \right) \quad (41)$$

Hierbei ist τ_{ex} eine für die Konformationsdynamik charakteristische Zeitkonstante, deren reziproker Wert sich aus der Summe der Geschwindigkeitskonstanten für die Übergänge zwischen beiden Zuständen ergibt [221]:

$$(\tau_{ex})^{-1} = k_{12} + k_{21} \quad (42)$$

Gemäß Gleichungen (39) – (41) ermöglicht die Bildung des Verhältnisses von zwei beliebigen Korrelationsfunktionen die Entkopplung der Beiträge der Konformationsdynamik von den Beiträgen, die auf die Diffusion zurückzuführen sind. Dies erlaubt den Zugriff auf die Kinetik der Konformationsübergänge des Biopolymers. Allerdings liegt der Vorgehensweise von Torres und Levitus die Annahme zu Grunde, dass der Diffusionsterm $G_{diff}(\tau)$ für sämtliche Korrelationsfunktionen identisch ist. Dies wiederum setzt voraus, dass die konfokalen Beobachtungsvolumina V_{eff} in beiden Detektionskanälen deckungsgleich sind, da deren lateralen und axialen Dimensionen unmittelbar in den analytischen Ausdruck des Diffusionsterms (siehe Gleichung (32)) eingehen. Dass dies jedoch keineswegs der Fall sein muss, zeigten Schwille *et al.* 1997 [234]. Eine detailliertere Beschreibung dieses Sachverhaltes kann dem Abschnitt „Einfache freie dreidimensionale Translationsdiffusion“ des Kapitels 2.2.3.2 entnommen werden.

Durch genaue Betrachtung der obigen drei Gleichungen wird deutlich, dass der konformationelle Austausch zu einem ansteigenden Term in der Kreuzkorrelation führt, wohingegen im Falle beider Autokorrelationen der entgegengesetzte Trend beobachtet wird. Ein Konformationsaustausch, dessen Zeitskala nicht signifikant langsamer als die der Diffusion ist, kann demnach zur Folge haben, dass die Kreuzkorrelationsfunktion langsamer auf null abfällt als beide Autokorrelationen [73].

Die beschriebene Methode nach Torres *et al.* hat den intrinsischen Nachteil, dass das Verhältnis aus zwei unter Umständen verrauschten Korrelationsfunktionen gebildet wird, sodass das Signal-Rausch-Verhältnis durch die Bildung des Quotienten zusätzlich verringert wird. Diesbezüglich gelang Price *et al.* 2010 eine deutliche Verbesserung, indem die vier resultierenden Korrelationsfunktionen einer globalen Anpassung unterzogen wurden [73]. Auf diese Weise

werden die Informationen über die konformationelle Dynamik direkt aus den Korrelationsfunktionen gewonnen und nicht über eine Verhältnisbildung dieser.

2.2.3.4 Einzelmolekül-FRET-Experimente

Die Anfänge sämtlicher smFRET-Experimente können auf das Jahr 1996 datiert werden. Damals gelang einer Gruppe von Wissenschaftlern um Shimon Weiss die erstmalige Detektion des Förster-Resonanzenergietransfers für ein einzelnes FRET-Farbstoffpaar, welches über eine DNA-Struktur verknüpft war [240]. Sie erkannten bereits zu dieser Zeit die enormen Vorzüge eines smFRET-Experimentes, welche sich aus der Kombination des Potentials des Energietransferprozesses als spektroskopisches Lineal für Abstandsmessungen auf molekularem Niveau [188, 189] mit den Vorteilen von Einzelmolekülmessungen, die in Kapitel 2.2.3 erläutert werden, ergeben. So sagten Weiss *et al.* schon damals voraus, dass die Detektion des Energietransfers zwischen einzelnen Donor- und Akzeptor-Molekülen möglicherweise die Beobachtung von Konformationsübergängen einzelner biologischer Makromoleküle ermöglichen wird [240]. Allerdings wurden die FRET-Paar markierten DNA-Moleküle in der beschriebenen Arbeit unspezifisch durch Trocknung auf einem silanisierten Objektträger immobilisiert und an Luft untersucht. Eine derartige Probenpräparation kann unter Umständen zu einem Verlust der Funktionalität des untersuchten Biomoleküls führen. So konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Adsorption von Proteinen an Oberflächen deren Sekundärstruktur beeinflussen und in der Folge eine Denaturierung herbeiführen kann [241]. Weiterhin ist die Funktionalität vieler biologischer Makromoleküle an gewisse Milieubedingungen gekoppelt. Beispielsweise können bereits relativ kleine Änderungen in den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Umgebung eines Proteins dessen Faltung beeinflussen [242]. Relevante Parameter sind hier u. a. die Temperatur sowie der pH-Wert [242]. Sollen also Konformationsübergänge, wie sie im nativen Zustand des Biomoleküls ablaufen, mittels smFRET-Experimenten beobachtet werden, so ist es essentiell, dass eine entsprechende Lösungsumgebung gewährleistet wird. Deniz *et al.* leisteten 1999 einen wesentlichen Beitrag zur Realisierung solcher Experimente, indem sie erstmals eine smFRET-Studie an frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten DNA-Konstrukten präsentierten [243]. Weiterhin wurde im gleichen Jahr über die ersten smFRET-Messungen an spezifisch immobilisierten Biomolekülen, welche in geeigneten Puffersystemen vorlagen, berichtet [66, 70]. Die genannten Experimente waren wichtige Meilensteine, die der smFRET-Technik in den zurückliegenden zwei Jahrzehnten dazu verhalfen, von den rudimentären Ansätzen unter nichtwässrigen Bedingungen aus dem Jahre 1996 zu einem umfangreichen Werkzeugkasten zur Aufklärung wichtiger biologischer Fragestellungen zu reifen [244, 245]. So wurden mit Hilfe von smFRET-Experimenten mechanistische Details der Entwindung von DNA-Molekülen durch Helikasen [246–248], aber auch Schlüsselschritte der Transkription [249] und Translation [250, 251] aufgeklärt. Weiterhin ermöglichten smFRET-Messungen neue Einblicke in die Mechanismen enzymkatalysierter Reaktionen [252, 253] sowie der Faltung von Proteinen [254, 255] und RNA-Molekülen [256–259]. Auch die Analyse der Konformationsdynamik von Proteinen [66, 67], der Substratbindungsdynamik von Enzymen [66] sowie des Einflusses von Liganden auf die Konformation von Biomolekülen [69–72] kann mit Hilfe der smFRET-Methodik bewerkstelligt werden.

Wie den vorstehenden Erläuterungen zu entnehmen ist, können smFRET-Messungen prinzipiell an frei diffundierenden oder an immobilisierten Molekülen durchgeführt werden [65, 74]. Die wesentlichen Aspekte dieser beiden Ansätze sollen in den zwei folgenden Unterkapiteln kurz skizziert werden.

smFRET-Messungen in Lösung: Burst-Analyse und MFD

Zwischen den in den Kapiteln 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschriebenen FCS-Experimenten und der Einzelmolekülspektroskopie an frei in Lösung diffundierenden Molekülen besteht ein konzeptioneller Zusammenhang. In beiden Fällen wird ein zur Anregung verwendeter Laser in die Probenlösung fokussiert. Passiert ein farbstoffmarkierter Analyt das Anregungsvolumen, so wird dieser zur Fluoreszenz angeregt. Als Messgröße wird die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Die FCS nutzt nun zeitabhängige Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität, die auf verschiedenste dynamische Prozesse zurückzuführen sind, um Informationen über die Kinetik dieser Prozesse zu erhalten [155, 207–210]. Hierzu werden Korrelationsfunktionen der Intensität innerhalb eines definierten Zeitintervalls berechnet, was einer statistischen Mittelung über alle Fluoreszenzsignale, die im betrachteten Intervall auftreten, gleichkommt [208, 260–262]. Wird ein FCS-Experiment jedoch bei hinreichend kleinen Konzentrationen des Analyten ($\sim 10^{-12}$ M) [65, 74] durchgeführt, sodass sich im Mittel deutlich weniger als ein Fluorophor im konfokalen Beobachtungsvolumen befindet, dann enthalten die aufgenommenen Datensätze grundsätzlich Informationen über jedes einzelne Molekül, welches während der Messdauer das Fokusbereich durchquert hat, da jeder Transit eines Moleküls durch das Anregungsvolumen mit der Generierung eines Fluoreszenzbursts einhergeht. Demnach sind mit jedem Burst individuelle Informationen über das jeweilige Probenmolekül, welches den Fluoreszenzausbruch hervorgerufen hat, verknüpft. Der in den Daten verschlüsselte informationelle Gehalt geht damit deutlich über die gemittelten Parameter, welche mittels einer Korrelationsanalyse bestimmt werden können, hinaus.

Um an die Einzelmolekülinformationen zu gelangen, müssen die Daten Burst für Burst ausgewertet werden, weshalb die Methode auch als Burst-Analyse bezeichnet wird [65]. Der Grundstein der Burst-Analyse und damit der Einzelmolekülspektroskopie an frei in Lösung vorliegenden Fluorophoren wurde 1990 im Los Alamos National Laboratory gelegt. Damals gelang erstmals die effiziente Detektion von Fluoreszenzbursts einzelner Farbstoffe, die durch das Anregungsvolumen eines in die Probenlösung fokussierten Lasers diffundierten [263]. In Abhängigkeit des jeweiligen Versuchsaufbaus können pro Burst unterschiedliche Fluoreszenzparameter und molekulare Eigenschaften extrahiert werden, deren Häufigkeit in Histogrammen aufgetragen werden kann. Dies ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Subpopulationen in einem heterogenen Ensemble [41, 260, 264–266]. Prinzipiell können die Fluoreszenzmessungen farb-, polarisations- und zeitaufgelöst durchgeführt werden, wodurch sämtliche Fluoreszenzparameter wie Lebensdauer, Anisotropie, Intensität und spektrale Lage der Emission simultan bestimmt werden können [265, 266]. Eggeling *et al.* waren es, die 1997 zum ersten Mal sowohl die Intensität als auch die Lebensdauer gleichzeitig in einer Burst-Messung aufzeichneten. Sie untersuchten einzelne, frei in Lösung diffundierende, fluoreszenzmarkierte DNA-Moleküle. Die burstweise Auswertung der Daten ermöglichte die Konstruktion eines Histogramms über die vorkommenden Fluoreszenzlebenszeiten. Aus der trimodalen Verteilung der Lebensdauern wurde geschlussfolgert, dass die untersuchte doppelsträngige DNA (dsDNA) im Wesentlichen drei verschiedene Konformationen einnehmen kann [264]. Kurze Zeit später führten Schaffer *et al.* eine Studie mit gepulster Anregung und polarisationsaufgelöster Detektion durch und erweiterten somit die Dimensionalität der innerhalb eines Burst-Experimentes simultan zugänglichen Fluoreszenzparameter auf Intensität, Lebensdauer und Anisotropie [267]. 1999 wurde schließlich eine farbaufgelöste Burst-Studie an einem Gemisch von FRET-Paar markierten DNA-Molekülen, die sich im Abstand zwischen Donor und Akzeptor unterschieden, präsentiert. Diese Studie markierte den Startschuss sämtlicher smFRET-Messungen in Lösung. Ein dichroitischer Spiegel erlaubte die getrennte Messung von Donor- und Akzeptor-Emission infolge einer direkten Anregung des Donor-Farbstoffes mit anschließendem Energieübertrag auf das Akzeptor-Molekül. Mittels der beiden pro Burst detektierten Intensitäten konnte mit Hilfe von Gleichung (20) für jedes Einzelmolekülereignis eine

Energietransfereffizienz berechnet werden. Anhand der erhaltenen Verteilung der Transfereffizienzen war es möglich, verschiedene Subpopulationen innerhalb eines heterogenen Ensembles aufzulösen [243]. In der Folge erkannten Seidel und dessen Arbeitsgruppe, dass die simultane Detektion sämtlicher Fluoreszenzparameter (*multiparameter fluorescence detection*, MFD) einen erheblichen informationellen Mehrwert bietet, der aus einem Fluoreszenzburst extrahiert werden kann und trugen somit maßgeblich zur Weiterentwicklung der Einzelmolekülmessungen in Lösung bei [261, 265, 266]. Um sämtliche Dimensionen der Fluoreszenz aufzuzeichnen, konzipierte Seidel einen konfokalen Aufbau, der Burst-Messungen mit Farb-, Polarisations- und Zeitauflösung erlaubte. Die Bedeutung eines solch mächtigen Aufbaus wurde 2006 eindrucksvoll demonstriert, indem dieser die Identifikation von 16 unterschiedlichen Komponenten innerhalb eines heterogenen Gemisches ermöglichte [265].

Anfänglich wurde die Methode der MFD hauptsächlich zur Aufklärung statischer Heterogenitäten eingesetzt, bis schließlich Kalinin *et al.* 2010 ein graphisches Analyseverfahren für MFD-Messungen an FRET-Paar markierten Systemen vorstellten, welches zusätzlich die visuelle Erfassung struktureller Dynamiken ermöglicht [75]. Zu diesem Zwecke müssen für jeden einzelnen Burst sowohl die Energietransfereffizienz als auch dessen mittlere Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ bestimmt und deren Häufigkeiten in einem 2D-Histogramm gegeneinander aufgetragen werden. Nun wird die Kenntnis der aus Gleichung (23) ersichtlichen linearen Beziehung zwischen der Effizienz des Energieübertrages und der Fluoreszenzlebenszeit des Donor-Chromophors ausgenutzt. Diese Korrelation zwischen beiden Messgrößen gilt allerdings nur für statische Populationen FRET-Paar markierter Moleküle, welche auf der Zeitskala des Transits durch das konfokale Beobachtungsvolumen in einem Zustand mit konstanter FRET-Effizienz verharren. Die durch Gleichung (23) beschriebene Gerade wird daher auch als statische FRET-Linie bezeichnet [74]. Sobald das untersuchte System innerhalb der zeitlichen Dauer eines Bursts dynamisch zwischen verschiedenen Konformationen wechselt, die sich in der Effizienz des Energietransfers unterscheiden, treten charakteristische Abweichungen der Daten von der statischen FRET-Linie hin zu größeren Donor-Lebensdauern auf [74, 75]. Somit bietet die Auftragung der Häufigkeiten der einzelnen Bursts innerhalb eines 2D-Histogrammes, aufgelöst nach Donor-Abklingzeit und Energietransfereffizienz, mit anschließendem Vergleich der Lage einzelner Subpopulationen relativ zur statischen FRET-Linie, einen qualitativen Indikator für das Vorhandensein von Konformationsdynamiken. Eine quantitative Betrachtung der aus der Burst-Messung erhaltenen Daten, welche die Zeitskalen der Austauschkinetik zugänglich macht, kann mit den in Abschnitt 2.2.3.3 beschriebenen FCS-FRET Analysemethoden nach Torres *et al.* [218] sowie Price *et al.* [73] durchgeführt werden.

smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen

Ein wesentlicher Nachteil der beschriebenen Burst-Experimente besteht in der limitierten Beobachtungszeit der einzelnen Moleküle. Diese ist auf die Dauer des Transits der farbstoffmarkierten Systeme durch das Fokusvolumen begrenzt und bewegt sich typischerweise im Bereich von unter einer [258] bis hin zu zehn Millisekunden [65]. Sollen nun Prozesse untersucht werden, deren Dynamik im Vergleich zur mittleren Transitzeit durch das Beobachtungsvolumen auf einer signifikant längeren Zeitskala stattfindet, so ist es daher notwendig, die Probenmoleküle zu immobilisieren. Die Immobilisation ermöglicht eine auf die Bleichzeit der Fluorophore begrenzte Observationsdauer [65, 268]. Zusätzlich kann allerdings auch eine frühzeitige Dissoziation der Probenmoleküle von der Objektträgerfläche die Detektionszeit limitieren [74]. Vorteile der Messung an frei diffundierenden Analyten gegenüber der Immobilisationsmethode bestehen jedoch in der vergleichsweise großen Statistik, welche in kurzer Zeit gesammelt werden kann [243, 265], sowie in der Tatsache, dass die Moleküle nicht an eine Oberfläche angebunden und somit keinen weiteren Modifikationen wie der künstlichen Einführung von Ankergruppen unterzogen werden müssen. Die Immobilisierung kann unter Umständen zu Wechsel-

2 Theoretische Grundlagen

wirkungen der angebondenen Moleküle mit der Oberfläche führen und somit Störungen in das beobachtete System einführen [241, 269]. Weiterhin sind Beeinträchtigungen aufgrund der gewählten Immobilisierungsschemie denkbar [244].

Eine der Hauptherausforderungen bei der Durchführung von smFRET-Experimenten an immobilisierten Molekülen besteht daher darin zu gewährleisten, dass die Immobilisierungsmethode die Funktionalität der Biomoleküle nicht beeinträchtigt [65]. Hierzu muss u. a. sichergestellt werden, dass der verwendete Objektträger inert gegenüber unspezifischer Adsorption der Biopolymere ist und weiterhin funktionelle Gruppen aufweist, die eine spezifische Immobilisierung der Moleküle erlauben [270, 271]. So soll eine undefinierte Anbindung der Probenmoleküle auf der Oberfläche weitestgehend verhindert und somit gewährleistet werden, dass wichtige Bindungsstellen des Biopolymers für Liganden zugänglich bleiben [270].

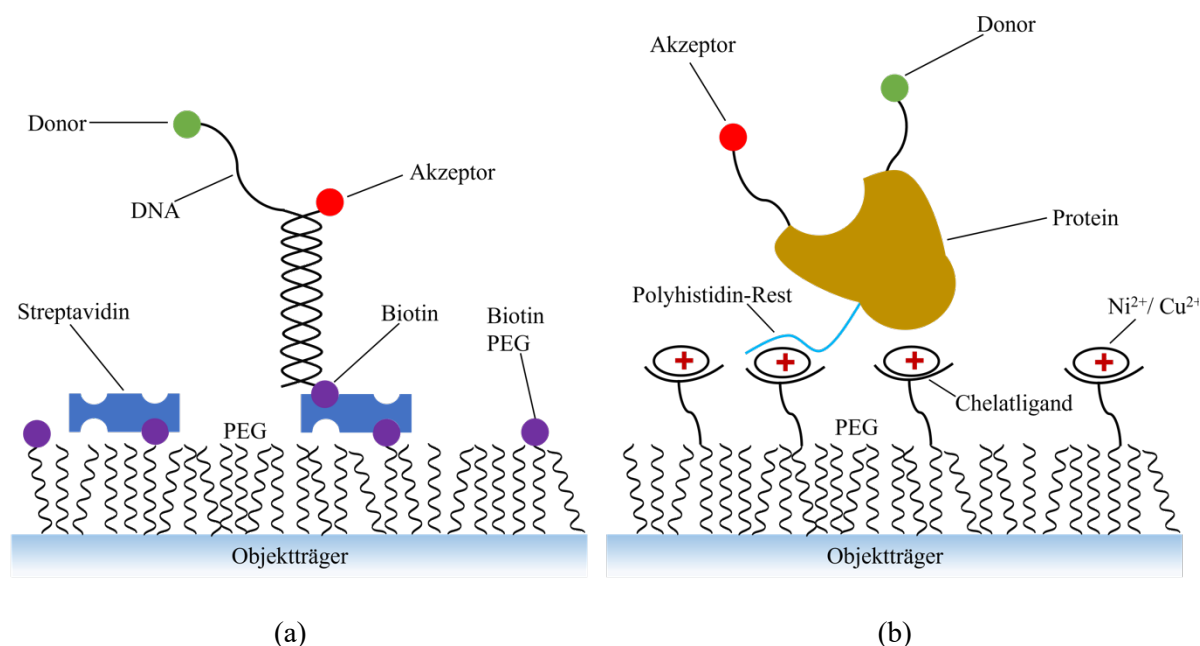


Abbildung 14: Schematische Darstellung ausgewählter Immobilisierungsstrategien. (a) Kontrollierte Immobilisierung biotinylierter Biopolymere über eine Biotin-Streptavidin-Biotin-Bindung. Das Deckgläschen ist zur Passivierung gegenüber unspezifischer Adsorption der Biomoleküle mit einer PEG-Schicht belegt, wobei einzelne PEG-Stränge mit Biotin modifiziert sind, sodass die Biopolymere über eine Streptavidin-Brücke fixiert werden können. (b) Immobilisierung von Proteinen über einen Polyhistidin-Rest. Über diesen können die Polypeptide an freie Koordinationsstellen eines Metallions, das innerhalb eines Chelatkomplexes an einzelne PEG-Ketten angebracht ist, binden. In Anlehnung an [245].

Insbesondere Proteine tendieren aufgrund einer Vielzahl von Wechselwirkungen dazu, unspezifisch an Oberflächen zu haften [241, 271–274]. Da gleichzeitig nachgewiesen wurde, dass solch eine nicht kontrollierte Adsorption einen Verlust der Funktionalität des Biopolymers herbeiführen kann [241, 270, 271], ist eine Passivierung gegenüber unspezifischen Interaktionen im Falle von smFRET-Studien an Proteinen obligatorisch. Ein in diesem Zusammenhang häufig verwendetes Passivierungsmittel zur Beschichtung der Objektträger ist Polyethylenglycol (PEG) [65, 245, 258]. Der passivierende Effekt einer PEG-Schicht wird auf ein fest gebundenes Netzwerk geordneter Wassermoleküle an der PEG-Wasser-Grenzschicht sowie innerhalb des PEG-Films zurückgeführt, welches eine Energiebarriere für die Adsorption von Proteinen darstellt [275–277]. Zur Anbindung der biologischen Makromoleküle müssen einzelne PEG-Ketten mit funktionellen Gruppen, die als Anker für eine Immobilisierung dienen, modifiziert sein. Oft handelt es sich bei dieser Modifikation um einen Biotin-Rest [65]. Dieser erlaubt die kontrollierte Fixierung von biotinylierten Biopolymeren über eine Streptavidin-Brücke (siehe Abbildung 14 (a)).

Speziell zur Immobilisierung von Proteinen bietet sich aber auch die Verwendung von Polyhistidin-Resten an, da diese ohnehin aus Zwecken der säulenchromatographischen Aufreinigung in viele Polypeptide integriert werden [65] und im Allgemeinen weder die Struktur noch die Funktionalität der Proteine beeinflussen [271]. Die Imidazol-Einheiten eines Polyhistidin-Restes können an freie Koordinationsstellen von Metallionen wie Ni^{2+} oder Cu^{2+} , die innerhalb eines Chelatkomplexes an einzelne PEG-Ketten angebracht sind, binden (siehe Abbildung 14 (b)) [65, 270, 271]. Zu diesem Zwecke müssen einige PEG-Ketten Chelatliganden, wie Iminodiessigsäure (*iminodiacetic acid*, IDA) oder Nitrilotriessigsäure (*nitrilotriacetic acid*, NTA), aufweisen [271]. Diese wiederum können, in Abhängigkeit des gewählten Chelators, drei oder vier Koordinationsstellen des zentralen Metallions einnehmen, sodass drei respektive zwei Bindungsstellen für die Koordination an Imidazol-Gruppen des am Protein befindlichen Polyhistidin-Restes verfügbar bleiben [271].

Nachdem die Immobilisierung der FRET-Paar markierten Biomoleküle bewerkstelligt ist, können deren smFRET-Signale in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen werden. Hierzu wird der Donor-Farbstoff direkt angeregt und die Fluoreszenz von Donor und Akzeptor farbaufgelöst detektiert. Zur Aufnahme der Zeitspuren kommen üblicherweise die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM) oder die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz [65, 74, 245]. Beide Methoden zeichnen sich durch bestimmte Vor- und Nachteile aus. Mit Hilfe der TIRFM kann die Fluoreszenz einer Vielzahl von immobilisierten Molekülen gleichzeitig erfasst und das Hintergrundsignal, aufgrund der vergleichsweise geringen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe, verringert werden [65, 74]. Dahingegen ist der Durchsatz der Datenerfassung unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie gewissermaßen limitiert, da jedes Molekül einzeln in den Fokus genommen werden muss. Im Gegensatz zur TIRFM ermöglicht ein konfokaler Aufbau allerdings eine Datenaufnahme mit wesentlich besserer Zeitauflösung [65].

Die in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichneten Intensitäten im Donor- und Akzeptor-Kanal können mit Hilfe von Gleichung (20) in eine Zeitspur der Energietransfereffizienz (FRET-Zeitspur) überführt werden. Übergänge zwischen unterschiedlichen Konformationen des Biomoleküls, die sich signifikant in ihrer FRET-Effizienz unterscheiden, werden sich in einem antikorrelierten Verhalten der Intensitäten im Donor- und Akzeptor-Kanal und damit in Änderungen der Energietransfereffizienz, äußern [74]. Voraussetzung hierfür ist, dass die Konformationswechsel auf einer Zeitskala stattfinden, die langsamer als die Integrationszeit der einzelnen Datenpunkte der Zeitspuren ist. Eine Analyse der FRET-Zeitspuren kann daher die Identifikation vorhandener Subpopulationen sowie die Bestimmung der Austauschraten zwischen diesen ermöglichen [278]. Hierzu muss zunächst anhand der FRET-Zeitspur bestimmt werden, wann sich das untersuchte System in welchem Zustand befand und für welche Dauer es in diesem verweilte [74, 278]. Die Identifizierung der einzelnen Zustände innerhalb einer Zeitspur kann auf unterschiedliche Art und Weise bewerkstelligt werden. Einfach zu implementierende Methoden, die vor allem in frühen smFRET-Studien an immobilisierten Molekülen Verwendung fanden, sind die Zuordnung per Augenmaß [74, 278, 279] oder mittels eines Schwellenwertverfahrens [74, 278, 280, 281]. Im ersteren Falle bestimmt der Experimentator aufgrund seiner persönlichen Empirie, welche Änderungen in der Energietransfereffizienz die Annahme eines Konformationswechsels rechtfertigen, weshalb die erhaltenen Ergebnisse mit einer gewissen Subjektivität behaftet sein können [278]. Dahingegen erfordert die Identifizierung einzelner Zustände mittels eines Schwellenwertverfahrens die Festlegung von Grenzwerten, welche Bereiche der Energietransfereffizienz definieren, die den unterschiedlichen Zuständen des Biomoleküls zugeordnet werden [278]. Beide Methoden eint die Einschränkung, dass sie nicht für die Analyse von Systemen geeignet sind, die mehr als drei Zustände einnehmen können [74, 278]. Um in solchen Fällen eine zuverlässigere, reproduzierbarere und unvoreingenommene Zuordnung der Zustände vornehmen zu können, bietet sich die Auswertung auf Grundlage ei-

2 Theoretische Grundlagen

nes Hidden-Markov-Modells an [74]. 2006 präsentierten McKinney *et al.* einen entsprechenden Algorithmus, um mit diesem die Abfolge von Konformationszuständen innerhalb einer FRET-Zeitspur zu identifizieren [278].

Nachdem den einzelnen FRET-Zeitspuren Sequenzen an Molekülzuständen zugeordnet wurden, können nachfolgend die Ratenkonstanten für die verschiedenen Übergänge bestimmt werden. Für ein simples Zweizustandssystem, welches mit den Ratenkonstanten k_{12} und k_{21} zwischen beiden Zuständen schalten kann (siehe Abbildung 13), werden hierzu Histogramme über die ermittelten Verweildauern in den beiden Zuständen aufgestellt. Eine Anpassung mit einem einfachen exponentiellen Zerfall an das jeweilige Histogramm liefert dann die korrespondierenden Übergangsraten [245, 256, 257, 280–282].

2.2.4 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (*time-correlated single-photon counting*, TCSPC) stellt die am häufigsten verwendete Methode zur Aufnahme von Fluoreszenzabklingkurven dar [154]. Hierbei werden die Fluorophore mit einer gepulsten Lichtquelle wiederholt zur Fluoreszenz angeregt, wobei jeweils die Zeitdifferenz zwischen der Aussendung des Anregungspulses und der Detektion des darauffolgenden Fluoreszenzphotons mit Hilfe einer Elektronik (TCSPC-Modul), welche die Funktion einer Stoppuhr übernimmt, aufgezeichnet wird [155, 283]. Als Startsignal der Zeitmessung fungiert dabei ein Trigger-Signal der Anregungsquelle, welches beim Aussenden des Laserpulses an das TCSPC-Modul weitergeleitet wird [154]. Das Stoppsignal bildet ein elektrischer Impuls, welcher vom Detektor infolge der Detektion eines Fluoreszenzphotons ausgegeben und an das TCSPC-Modul übergeben wird [154]. Die gemessene Zeitdifferenz zwischen der Aussendung des Anregungspulses und der Detektion des ersten Fluoreszenzphotons wird in einem Speicher im zugehörigen Zeitkanal abgelegt [155]. Werden sodann die mittels vielfach wiederholten Start-Stopp-Messungen bestimmten Häufigkeiten der auftretenden Zeitdifferenzen der einzelnen Fluoreszenzphotonen relativ zum Anregungspuls in einem Histogramm zusammengetragen, so wird schließlich die Fluoreszenzabklingkurve erhalten [154]. Im Falle von TCSPC-Messungen an einem Ensemble muss die Anregungsleistung jedoch ausreichend klein gewählt werden, sodass typischerweise lediglich ein Fluoreszenzphoton auf 100 Anregungspulse erhalten wird [155]. Andernfalls wäre die Wahrscheinlichkeit mehrere Fluoreszenzphotonen pro Anregungspuls zu erhalten signifikant groß. Dies hätte zur Folge, dass das resultierende Histogramm zu kürzeren Zeiten verzerrt wird [155] und der Fluoreszenzzerfall daher kürzer erscheinen würde, als er tatsächlich ist [154]. Ursache hierfür ist, dass die gegenwärtige TCSPC-Elektronik nicht ausreichend schnell ist, um mehrere Fluoreszenzphotonen pro Anregungspuls zu verarbeiten, sofern die zu bestimmende Fluoreszenzlebensdauer im Bereich von Nanosekunden liegt [155]. Folglich kann jeweils lediglich das erste Fluoreszenzphoton, welches auf einen Anregungspuls folgt, registriert werden [154].

3 Experimentelles

Das zentrale Forschungsobjekt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten spektroskopischen Studien ist die NS2B-NS3-Protease des Serotyps 2 des DENV (DENV-2-PR). Hierbei können die angestellten Untersuchungen in zwei größere Themenkomplexe unterteilt werden.

Die Experimente des ersten Themenblocks beschäftigten sich mit der Charakterisierung von Bindungswechselwirkungen zwischen der DENV-2-PR und diversen Liganden. Im Wesentlichen wurden diesbezüglich zwei unterschiedliche Vorgehensweisen verfolgt. In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob die Bindung eines nicht-markierten Liganden an eine einfach farbstoffmarkierte DENV-2-PR Änderungen der photophysikalischen Parameter des Fluorophores hervorruft. Als alternative Herangehensweise zur Untersuchung der Bindungswechselwirkungen wurden farbstoffmarkierte Inhibitoren im Rahmen von FCS-Bindestudien mit dem nicht-markierten WT der DENV-2-PR umgesetzt.

Der zweite Themenblock soll zu einem besseren Verständnis der Proteindynamik beitragen. Diesbezüglich wurde u. a. untersucht, ob in Lösung ein Gleichgewicht zwischen mehreren Konformationen der DENV-2-PR vorliegt und inwiefern die Anwesenheit verschiedener Liganden das Konformationsgleichgewicht beeinflusst. Hierzu wurden konfokale Fluoreszenzmessungen an frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten DENV-2-PRs, jeweils vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden, durchgeführt. Aus den erhaltenen Datensätzen wurden sowohl FCS-FRET- als auch smFRET-Informationen extrahiert. Zur Quantifizierung der Proteindynamik kamen zusätzlich smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen der DENV-2-PR zum Einsatz.

Nachfolgend werden die experimentellen Details der durchgeführten spektroskopischen Studien skizziert. Hierzu werden zunächst die untersuchten Probensysteme, die Probenpräparation sowie die experimentellen Aufbauten vorgestellt. Zum Abschluss werden die Durchführung sowie die Datenanalyse der unterschiedlichen Versuche beschrieben.

3.1 Untersuchte Proben

Zu Beginn dieses Unterkapitels werden zunächst relevante Parameter der Farbstoffe, welche zur Markierung des Enzyms bzw. der Liganden verwendet wurden, präsentiert. Daran anschließend werden die unterschiedlichen Modifikationen der DENV-2-PR sowie deren diversen Liganden, welche in Abhängigkeit des jeweiligen Experimentes zum Einsatz kamen, vorgestellt. Abschließend folgt die Beschreibung zweier FRET-Paar-markierter dsDNA-Proben, die als Referenzsystem für die Energietransferexperimente an der DENV-2-PR herangezogen wurden.

3.1.1 Farbstoffe

In der vorliegenden Arbeit kamen die käuflich erworbenen Fluoreszenzfarbstoffe ATTO 488, ATTO 647N und Cy5 zum Einsatz. Abbildung 15 gibt einen Überblick über die Strukturen der verwendeten Fluorophore [284–286]. In Abhängigkeit der jeweiligen Anwendung wurden

3 Experimentelles

unterschiedliche Derivate der Farbstoffe eingesetzt, welche sich lediglich in ihrer Ankergruppe R unterscheiden. Die beiden ATTO-Farbstoffe wurden für sämtliche Referenzmessungen an ihrer ungebundenen Form als Carbonsäure-Derivat ($R = A$) von der ATTO-TEC GmbH bezogen. Dahingegen wurde für Vergleichsmessungen am freien Cy5-Fluorophor dessen NHS-Ester-Derivat ($R = B$), welches von Amersham Biosciences erworben wurde, eingesetzt. Zur Farbstoffmarkierung des Enzyms sowie der Liganden wurden sämtliche Fluorophore in ihrer Maleimid-Ausführung ($R = C$) bestellt. Die Maleimid-Derivate beider ATTO-Farbstoffe wurden über die ATTO-TEC GmbH bezogen, wohingegen die Maleimid-Modifikation des Cy5-Fluorophores bei GE Healthcare bestellt wurde.

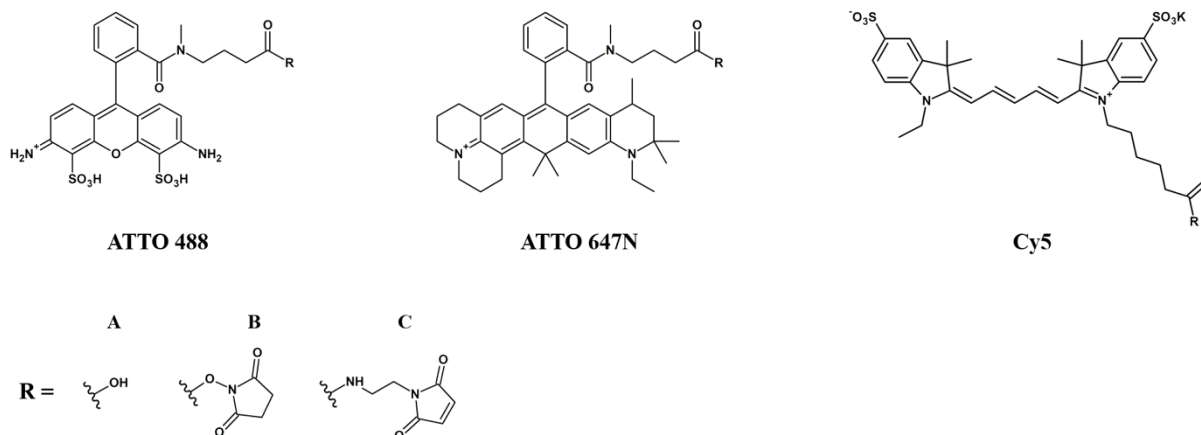


Abbildung 15: Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ATTO 488 [284], ATTO 647N [284] und Cy5 [285, 286]. In Abhängigkeit des jeweiligen Verwendungszwecks wurden unterschiedliche Modifikationen der Fluorophore, welche sich in ihrem Rest R ($R = A$: Carbonsäure-Derivat; $R = B$: NHS-Ester-Derivat; $R = C$: Maleimid-Derivat) unterscheiden, eingesetzt.

Tabelle 1 fasst wichtige Eckdaten der Farbstoffe zusammen. Neben den in der Tabelle aufgelisteten Parametern kann auch die Wasserlöslichkeit eines Fluorophors von Bedeutung sein. Sowohl ATTO 488 [284] als auch Cy5 [285, 286] zeichnen sich durch eine stark ausgeprägte Hydrophilie aus. Dahingegen ist ATTO 647N nur mäßig hydrophil [284]. Ein entscheidender Vorteil von ATTO 647N gegenüber Cy5 ist jedoch dessen deutlich höhere Photostabilität [284].

Tabelle 1: Herstellerangaben zu einigen relevanten Eckdaten der verwendeten Farbstoffe ATTO 488 [284], ATTO 647N [284] und Cy5 [285–288]: Molare Masse M der jeweiligen Derivate, spektrale Lage des Absorptionsmaximums $\lambda_{\text{max,abs}}$, Extinktionskoeffizient ϵ_{max} am Absorptionsmaximum, spektrale Lage des Fluoreszenzemissionsmaximums $\lambda_{\text{max,fl}}$, Fluoreszenzquantenausbeute ϕ und Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} .

| Farbstoff | $M / \text{g mol}^{-1}$ | | $\lambda_{\text{max,abs}} / \text{nm}$ | $\epsilon_{\text{max}} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ | $\lambda_{\text{max,fl}} / \text{nm}$ | ϕ | $\tau_{\text{fl}} / \text{ns}$ |
|-----------|-------------------------|----------|--|--|---------------------------------------|--------|--------------------------------|
| ATTO 488 | Carboxy | Maleimid | 500 | 90 000 | 520 | 0,8 | 4,1 |
| | 804 | 1067 | | | | | |
| ATTO 647N | Carboxy | Maleimid | 646 | 150 000 | 664 | 0,65 | 3,5 |
| | 746 | 868 | | | | | |
| Cy5 | NHS-Ester | Maleimid | 649 | 250 000 | 670 | 0,28 | 1,0 |
| | 792 | 817 | | | | | |

3.1.2 DENV-2-PR

Wie eingangs bereits erwähnt, wurden in Abhängigkeit des jeweiligen Experimentes unterschiedlich modifizierte Konstrukte der DENV-2-PR, welche von Mitarbeitern der Arbeitsgruppen um [REDACTED]¹ und [REDACTED]² bereitgestellt wurden, eingesetzt. In den folgenden Unterkapiteln werden diese Modifikationen und deren Biosynthese im Detail vorgestellt.

3.1.2.1 Proteinkonstrukte

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über sämtliche Konstrukte der DENV-2-PR, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen und spezifiziert ferner die Bereitsteller der korrespondierenden Plasmide, welche jeweils auch für die Proteinexpression und -reinigung (siehe Kapitel 3.1.2.2) zuständig waren. Alle aufgeführten Modifikationen basieren auf einem PR-Konstrukt, welches lediglich die Cofaktor-Domäne von NS2B sowie die *N*-terminale Protease-Domäne von NS3 umfasst und somit auf ein Minimum reduziert ist [60, 140, 141]. Um die Stabilität des Enzyms gegenüber einer autokatalytischen Spaltung zu erhöhen, wurden die NS2B_{cf}- und die NS3_{pro}-Domäne zusätzlich über einen Gly₄-Ser-Gly₄-Linker kovalent miteinander verknüpft [60, 140]. Weiterhin wurde ein Hexahistidin-Rest (His-Tag), welcher die Aufreinigung des Enzyms nach dessen Biosynthese [289–291] sowie dessen Immobilisierung im Rahmen von Einzelmolekülexperimenten [65, 292–294] (siehe Kapitel „smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen“) ermöglicht, an das *N*-terminale Ende von NS2B_{cf} angebracht. Das vorstehend beschriebene Konstrukt wird nachfolgend als WT-PR bezeichnet.

Tabelle 2: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten DENV-2-PR-Konstrukte, unter Angabe der für die einzelnen Arbeitsschritte verantwortlichen Personen.

| DENV-2-PR-Konstrukt | Bereitstellung des Plasmids, Proteinexpression und -reinigung |
|----------------------|--|
| WT-PR | [REDACTED] |
| DENV-2-G14C-PR | [REDACTED] und [REDACTED] |
| DENV-2-S79C-PR | [REDACTED] |
| DENV-2-S79C-G14C-PR | [REDACTED] |
| DENV-2-S79C-S158C-PR | [REDACTED] |

Um die Proteinexpression der WT-PR, welche im nachfolgenden Unterkapitel skizziert wird, zu ermöglichen, wurde das für den WT codierende Genom in einen pET15b-Vektor integriert. In dieser Studie fanden neben der WT-PR auch unterschiedlich farbstoffmarkierte Modifikationen der DENV-2-PR zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung des Enzyms Verwendung. In Abhängigkeit von dem jeweiligen Experiment wurde das Protein mit einem oder zwei Farbstoffen markiert. Auch die Lokalisierung der Fluorophore innerhalb der PR wurde variiert. Im Hinblick auf eine ortsspezifische Farbstoffmarkierung des Enzyms erwies es sich in diesem Zusammenhang als günstig, dass die Aminosäuresequenz der WT-PR keine Cysteine enthält [29]. Durch deren zielgerichteten Einbau in die Peptidsequenz des Wildtyps konnte unter

¹ Mitarbeiter der Arbeitsgruppe [REDACTED]: [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED]

² Mitarbeiter der Arbeitsgruppe [REDACTED]: [REDACTED]

3 Experimentelles

Verwendung von Maleimid-Farbstoffderivaten, welche mit der Thiolgruppe des eingeführten Cysteins eine effiziente Kopplungsreaktion eingehen können, eine spezifische Markierung des Enzyms realisiert werden [245, 295, 296] (siehe Kapitel 3.1.2.3). Um das Protein mit einem FRET-Farbstoffpaar zu markieren, wurden entsprechend zwei Cystein-Reste artifiziell in die Aminosäureabfolge des Wildtyps eingeführt. Hierbei diente das pET15b-Plasmid, welches das für die WT-PR codierende Genom enthält, jeweils als Vorlage für die Einführung von Cystein-Punktmutationen *via* ortsgerichteter Mutagenese. Als Produkt der Mutagenese wurden die Plasmide der für die spezifische Farbstoffmarkierung benötigten Cystein-Mutanten des Enzyms erhalten.

3.1.2.2 Proteinexpression und -reinigung

Im Folgenden werden Biosynthese und Aufreinigung der zuvor skizzierten PR-Konstrukte beschrieben. Zunächst wurden kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen (BL21-Gold (DE3) Competent Cells, Agilent Technologies) mit dem entsprechenden pET15b-Plasmid, welches das Genom des jeweiligen Proteinkonstrukts enthielt, versetzt und inkubiert. Die mit dem jeweiligen Plasmid transformierten *E. coli* Zellen wurden sodann in einem Nährmedium (LB-Medium) kultiviert. Hierbei wurde das Zellwachstum durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Nach Erreichen der angestrebten Bakterienkonzentration wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Um schließlich die *E. coli* Zellen zu ernten, wurde die Bakterienkultur 16 h nach Initiierung der Proteinbiosynthese für 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Durch Dekantieren wurde das Zellpellet vom Überstand isoliert. Im nächsten Schritt folgte der Aufschluss der Bakterien. Hierzu wurde das Zellpellet in Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,1 Vol.-% Triton X-100, 20 mM Imidazol, RNase, DNase, Lysozym, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin) suspendiert und die Bakterien durch Behandlung mit Ultraschall lysiert. Um die entstandenen Zellfragmente von den exprimierten Proteinen abzutrennen, wurde das Lysat anschließend für 45 min bei 15 000 U/min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung des Enzyms auf eine Trennsäule, welche mit Nickel-NTA Agarose (Qiagen) befüllt war, gegeben. Unspezifisch gebundene Moleküle konnten schließlich durch Spülen mit Waschlösung (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) entfernt werden. Im Anschluss wurden jene Proteine, welche mithilfe des His-Tags spezifisch an die Ni^{2+} -Ionen des Säulenmaterials binden konnten [291], durch Zugabe einer hochkonzentrierten Imidazolösung (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Zur abschließenden Aufreinigung des Enzyms wurden die eluierten Proteine schließlich auf eine Gel-Permeations-Chromatographie-Säule aufgetragen und im Lagerungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) eluiert. Das gereinigte Protein wurde in flüchtigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. [52]

3.1.2.3 Farbstoffmarkierung

Im Anschluss an die Biosynthese und Aufreinigung der unterschiedlichen DENV-2-PR-Konstrukte folgte je nach Bedarf die Fluoreszenzmarkierung der in Tabelle 2 aufgelisteten Cystein-Mutanten des Enzyms. Die Markierungen wurden von [REDACTED] durchgeführt. Nachstehend wird die hierbei gewählte Vorgehensweise grob umrissen. In den beiden darauffolgenden Unterabschnitten des vorliegenden Kapitels werden die einzelnen farbstoffmarkierten Modifikationen des Enzyms vorgestellt.

Zunächst wurde die jeweils zu markierende und im Lagerungspuffer eingefrorene Cystein-Mutante auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurde der Lagerungspuffer mithilfe eines Membranfilters (VivaspinTM, Molecular Weight Cut Off 10 kDa, GE Healthcare) gegen den Markierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 6.8-7.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP), in welchem die anschließende

Farbstoffmarkierung durchgeführt wurde, ausgetauscht. Nach erfolgtem Pufferaustausch wurde die jeweilige Proteinlösung unter Lichtausschluss mit einem Überschuss des entsprechenden Maleimid-Farbstoffderivates versetzt und 2 h bei Raumtemperatur sowie unter Schütteln inkubiert. Um nicht umgesetzten, freien Farbstoff abzutrennen, wurde das resultierende Gemisch anschließend dialysiert. Zur finalen Aufreinigung wurde das markierte Enzym auf eine Gel-Permeations-Chromatographie-Säule aufgetragen und im Lagerungspuffer eluiert. Daraufhin wurde mit einem fluorimetrischen Assay unter Verwendung eines fluorogenen Peptidsubstrates die enzymatische Aktivität der jeweiligen farbstoffmarkierten PR verifiziert [29, 297]. Das gereinigte, farbstoffmarkierte Enzym wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. [52]

Einfach markierte DENV-2-PRs

Zur Untersuchung der Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen wurden die beiden in Tabelle 2 aufgeführten Cystein-Einzelmutanten G14C und S79C der DENV-2-PR gemäß der obenstehenden Vorgehensweise mit Cy5 umgesetzt. Die erstgenannte Einzelmutante wurde zusätzlich mit ATTO 647N markiert. Tabelle 3 spezifiziert die im Rahmen der Markierungen eingesetzten Konzentrationen der nicht-markierten PR-Konstrukte sowie die verwendeten molaren Überschüsse der Farbstoffe. Ferner werden die jeweils erzielten Konzentrationen der resultierenden farbstoffmarkierten Systeme aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten einfach farbstoffmarkierten Cystein-Einzelmutanten der DENV-2-PR unter Angabe der jeweiligen Probenbezeichnung und der jeweils erzielten Konzentration. Zusätzlich werden die während der Markierung eingesetzten Konzentrationen der entsprechenden nicht-markierten DENV-2-PR-Konstrukte sowie die angewendeten molaren Überschüsse des jeweiligen Fluoreszenzmarkers spezifiziert [298].

| DENV-2-PR-Konstrukt | Fluoreszenzmarker | Probenbezeichnung der einfach markierten PR |
|---|--|---|
| Konzentration des DENV-2-PR-Konstruktes / μM | molarer Überschuss des Fluoreszenzmarkers | Konzentration der einfach markierten PR / μM |
| DENV-2-G14C-PR 122,5 | ATTO 647N 2,5 | G14C-ATTO 647N 0,88 |
| DENV-2-G14C-PR N/A | Cy5 5,7 | G14C-Cy5 2,36 |
| DENV-2-S79C-PR 68,0 | Cy5 6,5 | S79C-Cy5 16,60 |

Abbildung 16 veranschaulicht jeweils die Position der Cystein-Punktmutation beider Einzelmutanten und damit die Lokalisierung der jeweiligen Fluoreszenzsonde innerhalb der PR. Die Wahl der Lage der Punktmutationen wurde hierbei maßgeblich von dem Leitgedanken geprägt, sowohl die Funktionalität als auch die Faltung des Enzyms trotz der Farbstoffmarkierung zu bewahren [296, 298]. Daher wurden insbesondere Aminosäuren, welche verhältnismäßig weit entfernt von der allosterischen Bindetasche sowie vom aktiven Zentrum lokalisiert sind, durch einen Cystein-Rest ersetzt [298]. Aufgrund der ähnlichen Ladung, Größe und Hydrophobie von Cystein und Serin wurden bevorzugt Serin-Reste zu Cystein mutiert [296]. Die Punktmutation G14C ist in der NS3_{pro}-Domäne lokalisiert, wohingegen sich das zu einem Cystein mutierte Serin 79 im NS2B-Cofaktor befindet.

3 Experimentelles



Abbildung 16: Gegenüberstellung der Lage beider künstlich eingeführten Cystein-Reste C14 (Cystein-Einzelmutante G14C, Teilabbildung (a)) und C79 (Cystein-Einzelmutante S79C, Teilabbildung (b)) und damit der beiden Markierungspositionen in der geschlossenen Konformation der DENV-2-PR (PDB-Code: 2M9P [299, 300]). Rot: NS2B, blau: NS3, gelb: allosterische Bindetasche, roter Stern: Fluoreszenzmarker. Die halbtransparenten Oberflächen darstellungen des Enzyms wurden von H. Maus mit PyMOL erstellt.

FRET-Paar markierte DENV-2-PRs

Zur Untersuchung der Proteindynamik wurden die beiden in Tabelle 2 aufgeführten Cystein-Doppelmutanten S79C-G14C und S79C-S158C entsprechend der zu Beginn von Kapitel 3.1.2.3 skizzierten Vorgehensweise jeweils in einer Eintopfreaktion statistisch mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markiert. Die letztgenannte Doppelmutante wurde zusätzlich mit den beiden Farbstoffen ATTO 488 und Cy5 statistisch markiert. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die hierbei eingesetzten Konzentrationen der nicht-markierten PR-Konstrukte sowie über die verwendeten molaren Überschüsse der Farbstoffe. Ferner werden die Probenbezeichnungen der erhaltenen FRET-Paar markierten PR-Konstrukte sowie die jeweils erzielten Markierungseffizienzen eingeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR unter Angabe der jeweiligen Probenbezeichnung und der jeweils erzielten Markierungseffizienz. Zusätzlich werden die während der Farbstoffmarkierung eingesetzten Konzentrationen der entsprechenden nicht-markierten DENV-2-PR-Konstrukte sowie die aufgewendeten molaren Überschüsse der jeweiligen Fluoreszenzmarker spezifiziert [298].

| DENV-2-PR-Konstrukt | Fluoreszenzmarker | Probenbezeichnung der FRET-Paar markierten PR |
|---|---|--|
| Konzentration des DENV-2-PR-Konstruktes / μM | molarer Überschuss der Fluoreszenzmarker | Markierungseffizienz / % |
| DENV-2-S79C-G14C-PR 40 | ATTO 488 / ATTO 647N 4,7 / 5,8 | S79C-G14C ATTO 488: 69; ATTO 647N: 13 |
| DENV-2-S79C-S158C-PR 24 | ATTO 488 / ATTO 647N 2,1 / 2,6 | S79C-S158C A ATTO 488: 36; ATTO 647N: 59 |
| DENV-2-S79C-S158C-PR 75 | ATTO 488 / Cy5 2,6 / 2,4 | S79C-S158C B ATTO 488: 46; Cy5: 54 |

Aufgrund der statistischen Natur der Farbstoffmarkierungen ist davon auszugehen, dass jeweils eine Mischung aus PRs, welche entweder nur mit Donor-Farbstoff (Donor-Only-Spezies), nur

mit Akzeptor-Farbstoff (Akzeptor-Only-Spezies) oder mit beiden Farbstoffen markiert sind, erhalten wurde. Dabei sind in FRET-Experimenten lediglich Letztere informativ. [301]

Abbildung 17 veranschaulicht die Positionen der Cystein-Punktmutationen beider Doppelmultanten und damit die Lokalisierungen der Markierungspositionen innerhalb der PR.

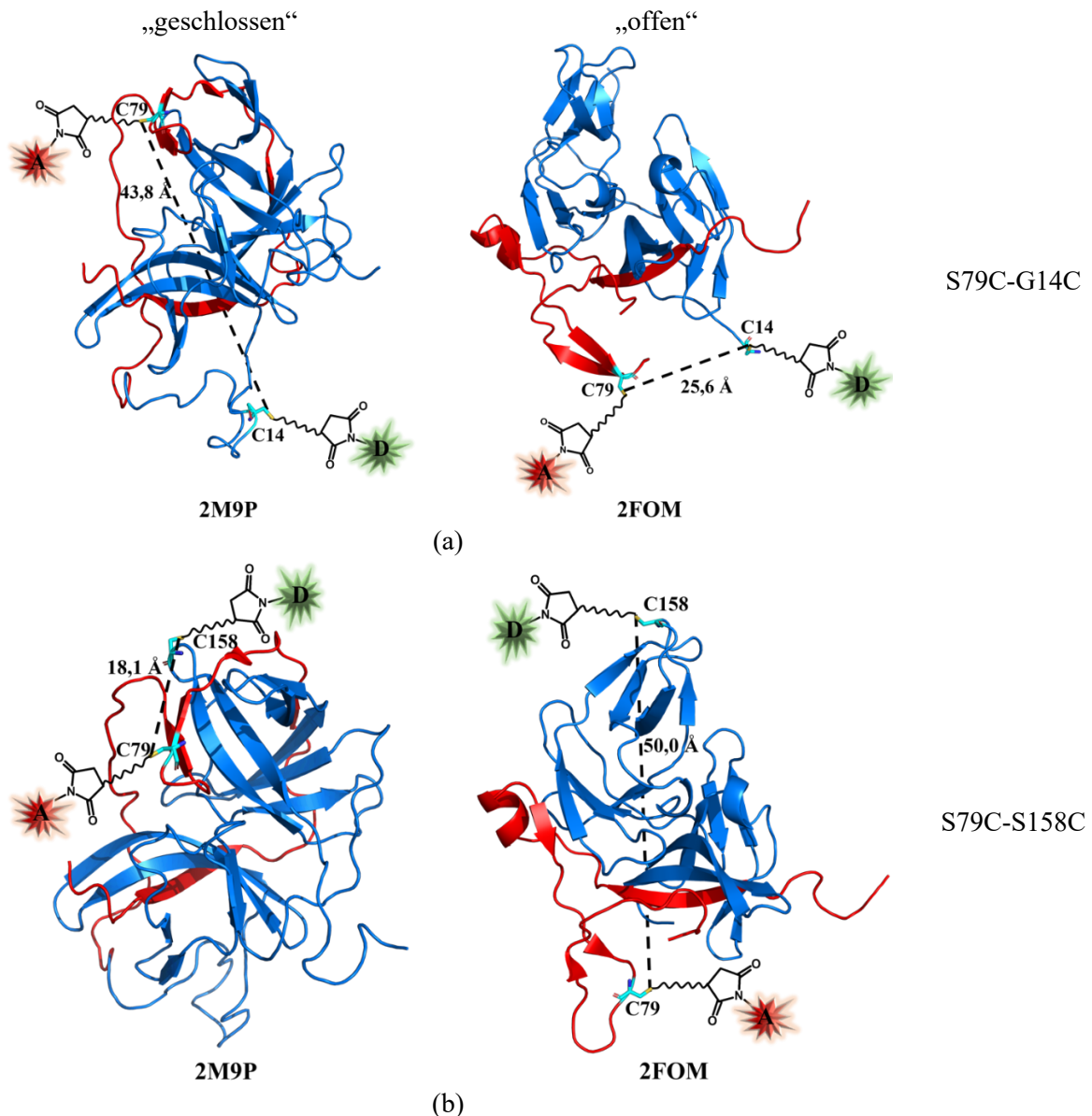


Abbildung 17: Tertiärstrukturen der DENV-2-PR (PDB-Code links: 2M9P [299, 300], PDB-Code rechts: 2FOM [143]) einschließlich der gewählten Markierungspositionen. Ferner werden die Abstände zwischen den artifizell eingeführten Cystein-Resten C79 und C14 (Doppelmultante S79C-G14C, Teilabbildung (a)) bzw. C79 und C158 (Doppelmultante S79C-S158C, Teilabbildung (b)) sowohl in der geschlossenen (links) als auch in der offenen (rechts) Konformation aufgeführt. Rot: NS2B, blau: NS3, Stern: Akzeptor-Farbstoff A bzw. Donor-Farbstoff D. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [52] erstellt, wobei die Darstellungen des Enzyms im Bändermodell von H. Maus mit PyMOL angefertigt wurden.

Die Mutationspositionen wurden derart gewählt, dass in beiden Doppelmultanten sowohl in der NS2B-Domäne (S79) als auch in der NS3-Domäne (G14 bzw. S158) jeweils ein Cystein vorhanden ist und sich deren Abstand bei einem Wechsel der Konformation deutlich ändert. Im direkten Vergleich zeichnen sich beide Doppelmultanten im Falle eines Konformationsübergangs durch invertierte Abstandsänderungen zwischen den Markierungspositionen aus. Auch wurde berücksichtigt, dass beide Cystein-Reste in jeweils einer Konformation eine Entfernung aufweisen, welche annähernd der Distanz des Förster-Radius R_0 des jeweiligen Farbstoffpaares

3 Experimentelles

entspricht. Durch Vergleich von Abbildung 17 (a) und (b) ergibt sich, dass die beiden in die NS3-Domäne eingeführten Punktmutationen G14C und S158C jeweils an entgegengesetzten Enden der Protease-Domäne lokalisiert sind. Hierbei befindet sich S158C in einer β -Schleife, weshalb vermutet wird, dass diese Position weniger flexibel sein sollte als die G14-Position [52]. Ein weiteres Indiz für die erhöhte Flexibilität von G14 ist, dass dieser Rest im Gegensatz zu S158 in der Kristallstruktur 2FOM nicht aufgelöst ist [143]. Tabelle 5 fasst wichtige Parameter der FRET-Paar markierten Doppelmutanten des Enzyms zusammen.

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung relevanter Parameter der drei FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR. R_0 : Förster-Radius des jeweiligen FRET-Farbstoff-paares; r : Abstände zwischen den beiden artifiziell eingeführten Cystein-Resten sowohl in der offenen als auch in der geschlossenen Konformation der DENV-2-PR. Die Abstände r beruhen auf den in Abbildung 17 gezeigten Positionen der Cystein-Reste innerhalb der mittels NMR-Spektroskopie bzw. Röntgenbeugung bestimmten Tertiärstrukturen des Enzyms; E_{ET} : Energietransfereffizienz, berechnet nach Gleichung (19) sowohl im offenen als auch im geschlossenen Zustand der PR. Zur Berechnung der Energietransfereffizienz E_{ET} wurde der interchromophore Abstand R_{DA} mit dem Abstand r zwischen den beiden künstlich eingeführten Cystein-Resten approximiert. Die tatsächlichen Abstände R_{DA} zwischen Donor und Akzeptor können jedoch aufgrund der räumlichen Abmessungen der Farbstoffe sowie deren Linker-Gruppen von den angegebenen Abständen r der Cystein-Reste abweichen. [52]

| Probe | FRET-Paar | R_0 / nm | r / nm | | E_{ET} | |
|--------------|-------------------|--------------|----------|-------------|----------|-------------|
| | | | offen | geschlossen | offen | geschlossen |
| S79C-G14C | ATTO 488 / | 4,9 [284] | 2,6 | 4,4 | 98,0 % | 66,2 % |
| S79C-S158C A | ATTO 647N | | | | 47,0 % | 99,7 % |
| S79C-S158C B | ATTO 488 / Cy5 | 5,1 [302] | 5,0 | 1,8 | 53,0 % | 99,8 % |

3.1.3 Liganden

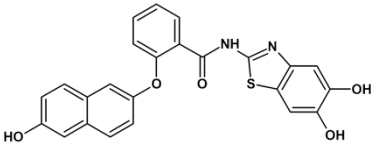
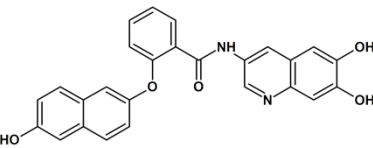
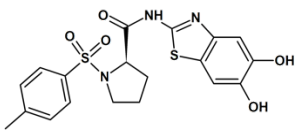
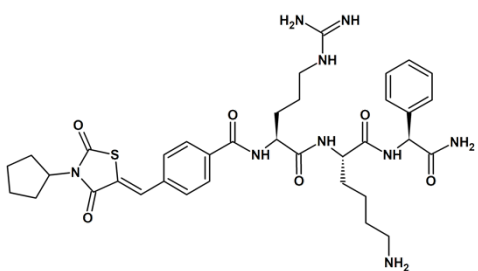
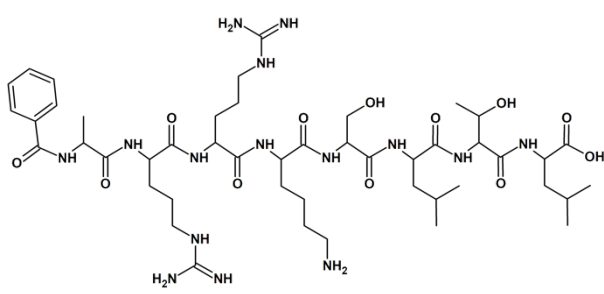
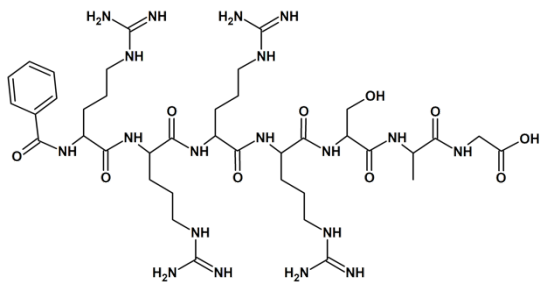
Die zuvor vorgestellten Modifikationen der DENV-2-PR wurden in Abhängigkeit des jeweiligen Experimentes mit unterschiedlichen Liganden des Enzyms umgesetzt. Tabelle 6 können die Strukturen der eingesetzten nicht-markierten Liganden entnommen werden. Ferner werden die Dissoziationskonstanten K_D der entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexe spezifiziert.

Der nicht-kompetitive Inhibitor HWu180 wurde von Hongmei Wu *et al.* im Rahmen einer Studie zur Identifizierung neuartiger Inhibitoren der DENV-PR entwickelt [303] und für die im Kontext dieser Arbeit durchgeführten Experimente von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Die von Wu *et al.* präsentierten Inhibitoren, von welchen HWu180 die größte inhibitorische Aktivität zeigte, basieren im Wesentlichen auf einer Benzothiazol-Einheit, welche über eine Amidbindung mit einem Diarylether- bzw. einem Diarylthioether-Rest verknüpft ist [303]. Die pharmakologische Einsetzbarkeit, der von Wu *et al.* entwickelten Liganden, leidet unter einer mangelhaften Wasserlöslichkeit der oben skizzierten Leitstruktur, sodass in der Vergangenheit gezielt Anstrengungen unternommen wurden, um die Grundstruktur der Inhibitoren hinsichtlich Hydrophilie und Protease-Affinität zu optimieren [29]. Im Rahmen dieser Bemühungen wurden die beiden weiteren in Tabelle 6 aufgeführten nicht-kompetitiven Inhibitoren BM1 und BM214 [29] jeweils von [REDACTED] (Arbeitsgruppe [REDACTED]) bereitgestellt. Um BM214 zu erhalten, wurde das ortho-substituierte aromatische Ringsystem von HWu180 durch einen Prolin-Rest ersetzt, wodurch eine signifikante Steigerung der Hydrophilie erzielt werden konnte [29]. Der kompetitive Inhibitor mb43 wurde von der Arbeitsgruppe um [REDACTED]

3.1 Untersuchte Proben

(Universität Heidelberg) erhalten [304]. Die beiden Substrate S1 und S2 wurden von konzipiert und käuflich über die Firma GenScript bezogen.

Tabelle 6: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten nicht-markierten Liganden der DENV-2-PR. Neben Struktur und Funktion des jeweiligen Liganden, werden zusätzlich die Dissoziationskonstanten K_D der entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexe, bestehend aus dem jeweiligen Inhibitor und dem WT der DENV-2-PR, angeführt.

| Ligand | Strukturformel | Funktion | $K_D / \mu\text{M}$ |
|-----------------|---|------------------------------|---------------------|
| HWu180 [303] |  | nicht-kompetitiver Inhibitor | $4,2 \pm 0,44$ |
| BM1 [305] |  | nicht-kompetitiver Inhibitor | ~ 40 |
| BM214 [29] |  | nicht-kompetitiver Inhibitor | $19,7 \pm 1,50$ |
| mb43 [304] |  | kompetitiver Inhibitor | 0,4 |
| S1 |  | Substrat | - |
| S2 |  | Substrat | - |

Eine weitere in dieser Arbeit gewählte Herangehensweise zur Untersuchung der Bindungswechselwirkungen zwischen der DENV-2-PR und nicht-kompetitiven Inhibitoren bestand darin, die nicht-markierte WT-PR mit den in Tabelle 7 aufgeführten farbstoffmarkierten Liganden

3 Experimentelles

im Rahmen von FCS-Bindestudien umzusetzen. In diesem Zusammenhang wurde zunächst die Verbindung AG124 von [REDACTED] entwickelt und bereitgestellt [298]. Im Wesentlichen setzt sich dieser Ligand aus dem bereits bekannten 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Grundgerüst, welches für die inhibitorische Aktivität essentiell ist [29, 303], und dem Farbstoff ATTO 488 zusammen. Um beide Fragmente miteinander zu verknüpfen, wurde das in Tabelle 7 blau hinterlegte Maleimid-Derivat des ATTO 488-Fluorophores mit der gelb hinterlegten Thiol-funktionalisierten Benzothiazol-Einheit umgesetzt. Um HM076 zu erhalten, wurde das mit einer Prolin-Einheit sowie einer Thiol-Funktionalität modifizierte 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Grundgerüst, welches von [REDACTED] bereitgestellt wurde und in Tabelle 7 grün hervorgehoben wird, mit dem in roter Farbe hinterlegten Maleimid-Derivat des Cy5-Fluorophores, gekoppelt. Die Kopplung beider Fragmente wurde von [REDACTED] vorgenommen.

Tabelle 7: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten farbstoffmarkierten nicht-kompetitiven Inhibitoren der DENV-2-PR. Neben Struktur und Funktion des jeweiligen Liganden, werden zusätzlich die Dissoziationskonstanten K_D der entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexe, bestehend aus dem jeweiligen Inhibitor und dem WT der DENV-2-PR, angeführt. Gelbes bzw. grünes Strukturelement: Thiol-funktionalisierte Inhibitor-Fragmente, blaues bzw. rotes Strukturelement: Maleimid-Derivate von ATTO 488 bzw. Cy5.

| Ligand | Strukturformel | Funktion | $K_D / \mu\text{M}$ |
|----------------|----------------|------------------------------|---------------------|
| AG124 [298] | | nicht-kompetitiver Inhibitor | $41,5 \pm 3,77$ |
| HM076 [306] | | nicht-kompetitiver Inhibitor | > 100 |

3.1.4 Puffer der DENV-2-PR

Um die Funktionalität des Enzyms während der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zu gewährleisten, war es notwendig, sämtliche Messungen in einer Pufferlösung, welche die enzymatische Aktivität der DENV-2-PR sicherstellt, durchzuführen. Zahlreiche Studien ergaben, dass eine lipophile Umgebung, welche durch die Zugabe von Glycerin eingestellt werden kann, die Enzymaktivität positiv beeinflusst [297]. An dieser Stelle sei jedoch aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt, dass die Anwesenheit von Glycerin für die enzymatische Aktivität der

PR nicht zwingend erforderlich ist [297]. Auch wirkt sich eine leicht basische Umgebung positiv auf die Aktivität der PR aus [140], weshalb die meisten *in vitro* Untersuchungen des Enzyms mit Tris-HCl-gepufferten Systemen im pH-Bereich zwischen 8,0 und 9,5 arbeiten [297]. Weiterhin kann die enzymatische Aktivität durch die Zugabe von Detergenzien, wie beispielsweise 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), gesteigert werden [60, 140, 297]. Für das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Konstrukt der DENV-2-PR, welches lediglich die Cofaktor-Domäne von NS2B sowie die N-terminale Protease-Domäne von NS3 umfasst, konnte gezeigt werden, dass eine maximale PR-Aktivität mit folgender Puffer-Zusammensetzung erreicht werden kann: 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 1 mM CHAPS, 20 Vol.-% Glycerin [140]. Folglich wurde eine Vielzahl der Messungen in diesem Puffersystem, das nachstehend als Assay-Puffer 1 bezeichnet wird, durchgeführt. Da im Laufe der Zeit festgestellt wurde, dass das im Assay-Puffer 1 enthaltene Glycerin eine signifikante Anzahl an fluoreszierenden Verunreinigungen enthält, wurden spätere Messungen im Assay-Puffer 2 (50 mM Tris-HCl pH 9,0, 1 mM CHAPS), welcher kein Glycerin enthält, vorgenommen. Wie in den Kapiteln 3.1.2.2 sowie 3.1.2.3 skizziert, wurden die unterschiedlichen Konstrukte der PR nach ihrer Herstellung zunächst im Lagerungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert [52]. Die entsprechenden Stammlösungen der PR wurden daher in Vorbereitung auf die verschiedenen Fluoreszenzmessungen mit Assay-Puffer 1 bzw. Assay-Puffer 2 auf die jeweils gewünschte Enzymkonzentration verdünnt. Im Falle einiger Ensemblemessungen an G14C-ATTO 647N war die zur Verfügung gestellte Stammkonzentration des Enzyms (siehe Tabelle 3) für eine weitere Verdünnung mit den vorstehend aufgeführten Assay-Puffern zu gering, sodass die entsprechenden Messungen im Lagerungspuffer durchgeführt wurden. Tabelle 8 fasst die Zusammensetzungen der drei eingesetzten Puffer zusammen.

Tabelle 8: Übersicht über die Zusammensetzung der im Rahmen der unterschiedlichen fluoreszenzspektroskopischen Messungen an der DENV-2-PR eingesetzten Puffersysteme.

| Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------|---|
| Lagerungspuffer | 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl |
| Assay-Puffer 1 | 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 1 mM CHAPS, 20 Vol.-% Glycerin |
| Assay-Puffer 2 | 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 1 mM CHAPS |

Abschließend sei zur Vollständigkeit erwähnt, dass die in Kapitel 3.1.3 vorgestellten Liganden der DENV-2-PR eine geringe Löslichkeit in den drei genannten Puffersystemen aufweisen. Daher wurde der jeweils eingesetzte Puffer mit 10 Vol.-% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt, sofern vergleichende Untersuchungen vor und nach Zugabe eines Liganden angestellt wurden [52]. In den Unterabschnitten des Kapitels 3.4 wird die Durchführung der unterschiedlichen fluoreszenzspektroskopischen Messungen an der DENV-2-PR im Detail beschrieben und in diesem Zusammenhang die jeweilig eingesetzte Pufferlösung spezifiziert.

3.1.5 FRET-Paar markierte dsDNA

Als Referenzsystem für die Energietransferexperimente an der DENV-2-PR wurden zwei statische DNA-Doppelstrang-Proben (dsDNA-1 und dsDNA-2), welche beide mit einem FRET-Paar bestehend aus ATTO 488 und ATTO 647N ausgestattet sind, über die IBA Lifesciences GmbH bezogen [307]. Abbildung 18 zeigt schematisch den grundlegenden Aufbau der DNA-Referenzsysteme.

Beide dsDNA-Proben setzen sich aus je zwei komplementären DNA-Einzelsträngen, die jeweils aus 36 Nukleotiden aufgebaut sind, zusammen. Hierbei trägt je ein Nukleinsäurestrang

3 Experimentelles

den Donor-Farbstoff ATTO 488, während an den entsprechend komplementären Strang der Akzeptor-Farbstoff ATTO 647N gebunden ist. Um die Fluorophore an die Oligonukleotide zu koppeln, wurde in die Sequenz der komplementären Nukleinsäureketten jeweils ein Nukleotid, welches eine Aminomodifikation aufweist, eingebaut. Die Aminogruppe erlaubte die Kopplung der komplementären DNA-Einzelstränge mit den NHS-Ester-Derivaten der beiden Farbstoffe. Abschließend wurden die beiden komplementären und mit ATTO 488 bzw. ATTO 647N markierten Nukleinsäureketten zu einem FRET-Paar markierten Doppelstrang zusammengefügt.

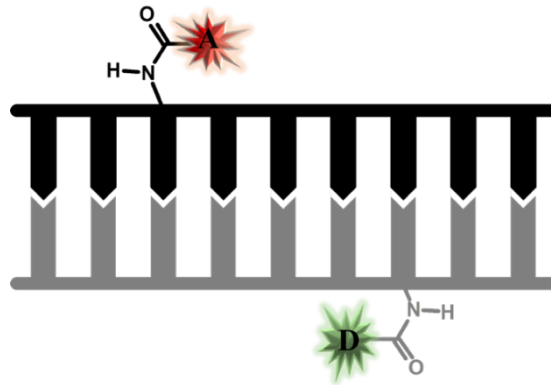


Abbildung 18: Schematischer Aufbau der FRET-Paar markierten DNA-Doppelstrang-Referenzsysteme. Diese bestehen jeweils aus den beiden in schwarz bzw. grau dargestellten komplementären DNA-Einzelsträngen. Stern: Akzeptor-Farbstoff A bzw. Donor-Farbstoff D.

Die beiden in dieser Arbeit eingesetzten dsDNA-Proben unterscheiden sich im Wesentlichen in den Positionen der mit einer Aminogruppe modifizierten Nukleotide innerhalb der Sequenz der komplementären Einzelstränge und damit in der Anzahl der Basenpaare, welche zwischen beiden Fluorophoren im DNA-Doppelstrang zu liegen kommen. Im Detail weisen die beiden DNA-Doppelstrang-Proben folgende Nukleotidsequenzen auf [308]:

dsDNA-1: 5'- G CTG AAA GTG TCG AGT TTG TwT GAG TGT TTG TCT GG -3'
3'- C GAC TzT CAC AGC TCA AAC AAA CTC ACA AAC AGA CC -5'

dsDNA-2: 5'- G CTG AAA GTG TCG AGw TTG TTT GAG TGT TTG TCT GG -3'
3'- C GAC TTz CAC AGC TCA AAC AAA CTC ACA AAC AGA CC -5'

In obiger Notation wird die Nukleotidsequenz durch die Abfolge der in den Nukleotiden enthaltenen Nucleobasen, spezifiziert. Dabei wurde folgende Nomenklatur der Nucleobasen angewandt [309]:

A \triangleq Adenin; G \triangleq Guanin; C \triangleq Cytosin; T \triangleq Thymin

Die Buchstabensymbole **w** und **z** kennzeichnen jeweils die farbstoffmarkierten Nukleotide. Beide Nukleotide enthalten die Nucleobase Thymin, wobei das mit **w** gekennzeichnete Nukleotid mit ATTO 488 und das mit **z** gekennzeichnete Nukleotid mit ATTO 647N markiert ist. Entsprechend der obig aufgeführten Sequenzen ist das FRET-Paar im Falle der Probe dsDNA-1 15 Basenpaare voneinander separiert, wohingegen zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor im Falle der zweiten Probe (dsDNA-2) neun Basenpaare zu liegen kommen. Da die Distanz zwischen zwei benachbarten Basenpaaren 0,34 nm beträgt [309], folgt hieraus, dass sich der Abstand r zwischen den Nukleotiden, an welchen das Farbstoffpaar angebracht wurde, auf

$$r(\text{dsDNA-1}) = 5,1 \text{ nm sowie}$$

$$r(\text{dsDNA-2}) = 3,1 \text{ nm}$$

beläuft. Wird der interchromophore Abstand R_{DA} mit dem Abstand r zwischen den farbstoffmarkierten Nukleotiden approximiert, so können mithilfe des in Tabelle 5 aufgeführten För-

3.2 Probenpräparation für konfokale Fluoreszenzmessungen

ter-Radius R_0 des gewählten Farbstoffpaares von 4,9 nm [284] sowie unter Verwendung von Gleichung (19) die theoretisch erwarteten Energietransfereffizienzen beider Referenzproben berechnet werden. Hierbei ergeben sich folgende Werte:

$$E_{ET}(\text{dsDNA-1}) = 44 \%$$

$$E_{ET}(\text{dsDNA-2}) = 94 \%$$

3.2 Probenpräparation für konfokale Fluoreszenzmessungen

Wie in Kapitel 3.1.4 erläutert, sollte die PR während aller Messungen in einem geeigneten Puffersystem (Assay-Puffer 1 bzw. Assay-Puffer 2), welches die enzymatische Aktivität des Enzyms sicherstellt, vorliegen. Um dies gewährleisten zu können, wurden sämtliche konfokalen Fluoreszenzmessungen an der DENV-2-PR in selbsthergestellten Bechergläschen durchgeführt. Diese bestanden im Wesentlichen aus einem Deckglas, auf welches ein ca. 1,5 cm hoher Zylinder aus proteinabweisendem Kunststoff (Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes) aufgebracht und mit Zweikomponentenkleber befestigt wurde [52]. Wurden frei in Lösung diffundierende PR-Moleküle untersucht, wie beispielsweise im Rahmen sämtlicher FCS- sowie Burst-Experimente, so fanden mit PEG beschichtete Glaträger (PEG_01 & 02, MicroSurfaces Inc.) Verwendung. Die PEG-Schicht war hierbei unabdingbar, um einer unspezifischen Adsorption der Enzyme an die Glasoberfläche vorzubeugen [245, 258]. Daher wurden auch für die smFRET-Messungen an immobilisierten PR-Molekülen mit PEG beschichtete Deckgläser eingesetzt. Um die Proteine allerdings spezifisch an die Oberfläche der Objektträger anbinden zu können, trugen einzelne PEG-Ketten einen endständigen Nickel-NTA-Anker (Ni_01, MicroSurfaces Inc.). Diese Anker bestehen jeweils aus dem vierzähligen Chelatliganden NTA, welcher kovalent an die jeweilige PEG Kette gebunden vorliegt und über vier koordinative Bindungen ein zentrales Ni^{2+} -Ion komplexiert (siehe Abbildung 19) [271, 291, 310]. Demzufolge bleiben zwei Bindungsstellen der oktaedrischen Koordinationssphäre des Ni^{2+} -Ions vakant, sodass die Imidazol Einheiten des am Enzym befindlichen Hexahistidin-Restes (siehe Kapitel 3.1.2.1) unter Ausbildung eines oktaedrisch koordinierten Ni^{2+} -Komplexes an diese beiden freien Koordinationsstellen binden können [271, 291, 310].

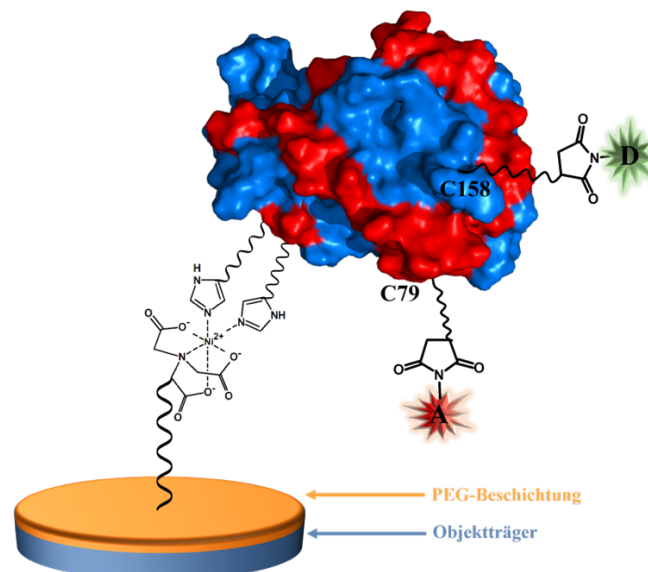


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Immobilisierung der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR (PDB-Code: 2M9P [299, 300]) über deren Hexahistidin-Rest an einem Nickel-NTA-Anker eines PEG-beschichteten Glaträgers. Rot: NS2B, blau: NS3, Stern: Akzeptor-Farbstoff A bzw. Donor-Farbstoff D. Die Abbildung wurde in Anlehnung an [298] erstellt, wobei die Oberflächendarstellung des Enzyms von H. Maus mit PyMOL erstellt wurde.

3 Experimentelles

In die beschriebenen Messgefäße wurde die jeweilige Probe vorgelegt, von der dann an einem Einzelmolekülspektrometer mit konfokaler Optik (siehe Kapitel 3.3.2) Zeitspuren der Fluoreszenzintensität aufgenommen wurden. Weitere Details der jeweiligen Versuchsdurchführung werden in den Kapiteln 3.4.1.2, 3.4.2.1 und 3.4.2.3 beschrieben.

3.3 Experimentelle Aufbauten

Nachfolgend werden die experimentellen Aufbauten dieser Arbeit vorgestellt. Den Anfang bilden hierbei die Spektrometer, welche für Untersuchungen im Ensemble genutzt wurden. Zum Abschluss wird der grundlegende Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit welchem sämtliche FCS-Experimente und Einzelmoleküluntersuchungen bewerkstelligt wurden, skizziert.

3.3.1 Ensemblespektroskopie

Im Zuge der vorliegenden Studie wurde eine Vielzahl von Ensemblemessungen durchgeführt. Im Rahmen dieser Messungen kamen kommerzielle Spektrometer, welche nachstehend vorgestellt werden, zum Einsatz. Weitere Details der jeweiligen Versuchsdurchführung, wie beispielsweise eine Auflistung der jeweils gewählten Messparameter, können den Unterkapiteln des Kapitels 3.4.1.1 sowie dem Kapitel 3.4.2.2 entnommen werden.

Absorptionsspektroskopie

Sämtliche Absorptionsspektren wurden mit dem Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometer Lambda 850 (PerkinElmer) aufgenommen. Hierbei wurde als Referenz die jeweils gewählte Lösemittelumgebung verwendet. Die Integrationszeit betrug bei einer Schrittweite von 1 nm und einer spektralen Auflösung von 1 nm stets 0,2 s.

Fluoreszenzspektroskopie

Alle in dieser Studie gezeigten Fluoreszenzemissions- sowie Fluoreszenzanregungsspektren wurden in einer 90° Geometrie mit dem Spektrofluorometer FluoroLog-3 (Horiba Jobin-Yvon) gemessen. Die aufgenommenen Spektren wurden jeweils unter Berücksichtigung der Quanteneffizienz des Photodetektors, des Lampenspektrums sowie der Korrekturkurve des Spektrographengitters korrigiert.

Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Zur Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen unter Verwendung der TCSPC-Methode angestellt. Die entsprechenden Messungen wurden ebenfalls mit dem FluoroLog-3-Spektrofluorometer durchgeführt. Das hierfür benötigte, gepulste Anregungslicht wurde durch einen Weißlicht-Faserlaser (SC-OEM, YSL Photonics), welcher Laserpulse mit einer Dauer von ca. 100 ps [311] generiert, bereitgestellt. Mittels eines akustooptischen Filters (AOTF-VIS-DR, Fianium) konnte die jeweilig gewünschte Anregungswellenlänge selektiert werden. Die Detektionseinheit bestand aus einem Detektor mit Einzelphotonenempfindlichkeit (PMA Hybrid 50, PicoQuant), welcher mit einem TCSPC-Modul (PicoHarp 300, PicoQuant) verbunden wurde. Hierbei ermöglichte das TCSPC-Modul die Aufzeichnung der Ankunftszeiten der einzelnen Photonen relativ zum jeweils korrespondierenden Anregungspuls. Durch Aufsummierung der entsprechenden Zeitdifferenzen in einem Histogramm (Histogramm-Modus) wurden schließlich die entsprechenden Fluoreszenzabklingkurven erhalten. Um die Fluoreszenzlebensdauer von der Zeitskala der molekularen Rotation zu separieren, wurden die Fluorophore mit vertikal polarisiertem Licht angeregt, während das Fluoreszenzlicht auf dem Weg zum Detektor einen Emissionspolarisator, welcher im sogenannten magischen Winkel von 54,7° relativ zur Vertikalen orientiert war, passierte [154, 155].

3.3.2 Konfokales Fluoreszenzmikroskop

In Abbildung 20 ist der Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit welchem sämtliche FCS-Experimente sowie Einzelmoleküluntersuchungen bewerkstelligt wurden, schematisch dargestellt. Die Konfiguration dieses Aufbaus wurde dabei den Anforderungen der unterschiedlichen Experimente entsprechend angepasst und wird daher an den entsprechenden Stellen in den Unterkapiteln von Kapitel 3.4 spezifiziert.

Je nach Aufgabenstellung kamen verschiedene Lasersysteme zur Anregung der Fluoreszenz zum Einsatz. Wurde mit einem gepulsten Weißlicht-Faserlaser (SC-OEM, YSL Photonics) gearbeitet, konnte mittels eines akustooptischen Filters (AOTF-VIS-DR, Fianium) die gewünschte Anregungswellenlänge selektiert werden. Das jeweilige Anregungslicht wurde zunächst über eine Einmoden-Glasfaser zum Experiment geleitet. Die Glasfaser übernahm hierbei u. a. die Funktion eines Modenfilters und lieferte eine reine TEM_{00} -Mode. Nach Passieren der Glasfaser wurde über ein System bestehend aus einem Auskoppler (AK) sowie einer achromatischen Linse (L_A) ein paralleles Strahlenbündel erzeugt. Mit Hilfe eines variablen Abschwächers (A) konnte sodann die gewünschte Anregungsleistung, welche über ein Leistungsmessgerät (LMG) direkt vor dem Mikroskopobjektiv (Plan-Apochromat, 100x, NA=1.4, Ölimmersion, Zeiss) kontrolliert wurde, eingestellt werden.

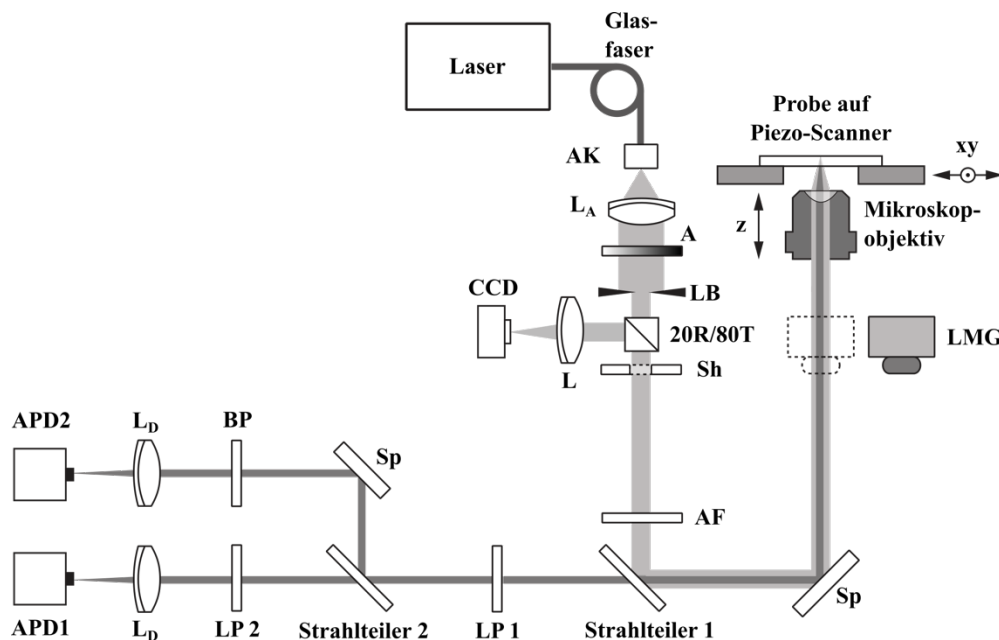


Abbildung 20: Schematischer Aufbau des verwendeten konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von Mathias Haase in Anlehnung an [153] erstellt. Abkürzungen der einzelnen Bauteile: Auskoppler AK, achromatische Linse L_A , variabler optischer Abschwächer A, Lochblende LB, Strahlteiler 20R/80T, *charge coupled device* CCD, Linse L, *shutter* Sh, Anregungsfilter AF, Spiegel Sp, Leistungsmessgerät LMG, Langpassfilter LP, Bandpassfilter BP, Detektionslinse L_D , Avalanche-Photodiode APD.

Die auf den Abschwächer folgende Lochblende (LB) erlaubte es den Durchmesser des kollimierten Laserstrahles auf ca. 5 mm zu reduzieren. Das verjüngte Strahlenbündel traf schließlich auf einen Strahlteiler (20R/80T, Spezialanfertigung, Linos AG), welcher 80 % der Strahlung unreflektiert passieren ließ. Gleichzeitig wurden 20 % des im Probenraum gestreuten und reflektierten Laserlichts über diesen Strahlteiler auf eine CCD-Kamera (*charge coupled device*), die das Licht orts aufgelöst detektierte, gelenkt. Die CCD-Kamera wurde zur Fokussierung des Anregungslichtes in den Probenraum benötigt. Mit einem elektrisch gesteuerten *shutter* (Sh) konnte bei Bedarf der Strahlengang unterbrochen werden, sodass die Probe nur während des eigentlichen Experimentes bestrahlt wurde. Ehe das Anregungslicht in Richtung Probe gelenkt wurde, erfolgte eine spektrale Reinigung des Laserlichtes mittels eines Anregungsfilters (AF).

3 Experimentelles

Als Anregungsfilter kamen hierbei optische Band- bzw. Kurzpassfilter, welche der jeweiligen Anregungswellenlänge angepasst wurden, zum Einsatz. Der Anregungsfilter diente u. a. auch der Unterdrückung von in der Glasfaser angeregter Fluoreszenz. Das spektral gefilterte Anregungslicht wurde über den Strahlteiler 1, bei welchem es sich in Abhängigkeit des jeweiligen Experimentes entweder um einen Neutralstrahlteiler (20R/80T) oder aber um einen dichroitischen Spiegel handelte, in Richtung des Ölimmersionsobjektives reflektiert. Dieses wiederum war auf einem Piezo-getriebenen Objektiv-Positionierer (P-721, PIFOC, Physik Instrumente) montiert, mit dessen Hilfe das Mikroskopobjektiv in z-Richtung verfahren und somit das Anregungslicht in den Probenraum fokussiert werden konnte. Die Probe befand sich dabei in den in Abschnitt 3.2 vorgestellten Messzellen, deren PEGylierte Deckgläschen von quadratischer Geometrie (Seitenlänge: 22 mm) waren, eine Dicke von 0,16 mm bis 0,19 mm [312] aufwiesen und mittels einer magnetischen Folie auf einem xy-Piezoscanner (P-731.8C, Physik Instrumente) befestigt wurden. So konnte bei Bedarf die Probe über den Anregungsfokus gerastert werden.

Das Objektiv wurde nicht nur zur Fokussierung des Anregungslichtes in den Probenraum eingesetzt, sondern sammelte auch einen Teil der Fluoreszenz gemeinsam mit an der Probe gestreutem Laserlicht ein und leitete das eingesammelte Licht als kollimierten Strahl in Richtung des Strahlteilers 1 zurück. Wurde an dieser Stelle ein dichroitischer Spiegel eingesetzt, so reflektierte dieser das im Probenraum zurückgestreute und gegenüber dem Fluoreszenzlicht blauverschobene Laserlicht in Richtung der Anregungsquelle, während er die längerwellige Fluoreszenz der Probe in Richtung der Detektoren transmittieren ließ. So konnte das gestreute Laserlicht bereits zu einem großen Teil vom Fluoreszenzlicht abgetrennt werden. Wurde dagegen ein Neutralstrahlteiler (20R/80T) anstelle eines dichroitischen Spiegels verwendet, so ließ dieser wellenlängenunabhängig ca. 80 % der über das Objektiv eingesammelten Strahlung transmittieren. Um das störende Hintergrundsignal des zurückgestreuten Anregungslichtes von dem zu detektierenden Fluoreszenzlicht weitestgehend zu separieren, war daher der Einsatz eines entsprechenden Langpassfilters (LP 1) in diesem Falle unabdingbar. Dieser blockierte das in der Detektion unerwünschte Laserlicht und ließ die Fluoreszenzemission passieren. Da das im Probenraum zurückgestreute Laserlicht in aller Regel auch zu einem gewissen Anteil einen dichroitischen Spiegel passieren kann, schloss sich hinter diesem im Detektionsstrahlengang ebenso zunächst ein Langpassfilter (LP 1) an. Im Falle sämtlicher Energietransferexperimente wurde das optisch gefilterte Fluoreszenzlicht anschließend mit Hilfe eines weiteren dichroitischen Spiegels (Strahlteiler 2) in zwei Strahlengänge aufgeteilt. Dieser dichroitische Spiegel ließ rotes Licht transmittieren, wohingegen Strahlung höherer Energie in Richtung von APD2 reflektiert wurde. Um eine weitestgehend isolierte Detektion von Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz zu ermöglichen, befanden sich vor beiden Detektoren zusätzliche Filter. So wurde zur weiteren spektralen Aufreinigung des Emissionslichtes vor APD1 ein weiterer Langpassfilter (LP 2) sowie vor APD2 ein Bandpassfilter (BP) platziert. Mithilfe achromatischer Detektionslinsen (L_{D1} und L_{D2}) wurde das Emissionslicht schließlich auf die Detektionsflächen der beiden APDs fokussiert. Dabei fungierte die kleine, aktive Fläche der jeweiligen APD auch als konfokales Detektionsspinhole in der Bildebene (siehe Kapitel 2.2.3.1). Zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass das Emissionslicht lediglich mit einer APD (APD1) detektiert wurde, sofern Strahlteiler 2 im Strahlengang fehlte.

Die Signale der APDs wurden in Form von NIM-Pulsen an ein TCSPC-Modul (PicoHarp 300 oder HydraHarp 400, PicoQuant) weitergeleitet. Die genannten Module unterscheiden sich im Wesentlichen in der Anzahl ihrer Detektionskanäle. Das PicoHarp 300-Modul besitzt einen Detektionskanal, während die HydraHarp über zwei Detektionskanäle verfügt. Zusätzlich weisen beide TCSPC-Module einen Eingang für ein Synchronisationssignal auf. Beide Module können in den sog. TTTR (*time-tagged time-resolved*)-Modi T2 sowie T3 betrieben werden. Im T2-Modus werden sowohl die Ankunftszeiten der einzelnen Photonen in Relation zum Start

des Experimentes (Makrozeit) als auch der Eingangskanal des Detektorsignals registriert. Der T2-Modus erlaubt daher die nachträgliche Berechnung von Korrelationsfunktionen. Weiterhin können durch Auftragung der Häufigkeiten der einzelnen Makrozeiten innerhalb eines Histogramms Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren rekonstruiert werden. An dieser Stelle sei aus Gründen der Vollständigkeit darauf hingewiesen, dass im T2-Modus der Synchronisationskanal auch als Detektionskanal verwendet werden kann, sodass in diesem Modus auch an die Pico-Harp zwei APDs angeschlossen werden können. [313]

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer einzelner Moleküle wurden TCSPC-Experimente mit einer gepulsten Anregungsquelle durchgeführt. Um die Ankunftszeiten der einzelnen Fluoreszenzphotonen relativ zum jeweils korrespondierenden Anregungspuls (Mikrozeit) aufzeichnen zu können, wurde das Trigger-Signal des Anregungslasers in den Synchronisationseingang des entsprechenden TCSPC-Moduls eingespeist, während die Ausgangssignale der APDs an die verbleibenden Detektionskanäle des Moduls übergeben wurden. Mit Hilfe des T3-Modus konnten sodann neben dem jeweiligen Eingangskanal des Detektorsignals auch die Makro- und Mikrozeit für jedes detektierte Photon abgespeichert werden. Folglich konnten aus den erhaltenen Datensätzen neben der Berechnung von Korrelationsfunktionen sowie Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren auch Fluoreszenzlebenszeiten extrahiert werden. [313]

3.4 Versuchsdurchführung und Datenanalyse

Nachstehend werden Durchführung und Datenanalyse der im Rahmen dieser Arbeit angestellten Experimente – getrennt nach den beiden Hauptthemenkomplexen „Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen“ und „Untersuchung der Proteindynamik“ – skizziert.

3.4.1 Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen

Um die Bindungswechselwirkungen zwischen der DENV-2-PR und diversen Liganden zu charakterisieren, wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen, deren experimentelle Realisierung in den beiden folgenden Unterkapiteln 3.4.1.1 sowie 3.4.1.2 vorgestellt wird, verfolgt.

3.4.1.1 Einfach markierte PRs und nicht-markierte Liganden

In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob die Bindung diverser nicht-markierter Liganden an einfach farbstoffmarkierte DENV-2-PRs Änderungen der photophysikalischen Parameter des jeweiligen Fluoreszenzmarkers hervorruft.

Spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkungen

In diesem Zusammenhang wurden zunächst fluoreszenzspektroskopische Ensemblemessungen an den in Tabelle 3 aufgelisteten einfach markierten DENV-2-PRs jeweils vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden durchgeführt. Hierzu wurden die von [REDACTED] bereitgestellten Stammlösungen der PRs durch Zugabe von Assay-Puffer 1 auf eine Enzymkonzentration von ca. 1 μM verdünnt. Um die Löslichkeit der Liganden sicherzustellen, wurde den resultierenden Lösungen des Enzyms zusätzlich 10 Vol.-% DMSO zugesetzt, sodass die in Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen erhalten wurden.

Nun wurden 50 μL der jeweiligen PR-Lösung in eine Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics) vorgelegt. Zur vollständigen fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung der jeweiligen Enzym-Ligand-Bindungswechselwirkungen wurden sodann polarisationsaufgelöste Fluoreszenzabklingkurven unter Verwendung der TCSPC-Methode sowie Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzanregungsspektren aufgenommen. Hierbei fanden in aller Regel die in

3 Experimentelles

Tabelle 10 aufgeführten Messparameter Anwendung. Fälle, in welchen von diesen Einstellungen abgewichen wurde, werden an entsprechender Stelle im Ergebnisteil unter Angabe der modifizierten Messparameter gekennzeichnet. Die spektralen Bandbreiten des Anregungs- und Emissionsmonochromators wurden in der Regel an die jeweilige Signalstärke angepasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der im Rahmen der ensemblespektroskopischen Charakterisierung der Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen verwendeten Konzentrationen der drei einfach farbstoffmarkierten Cystein-Einzelmutanten der DENV-2-PR.

| Probe | Konzentration / μM |
|----------------|-------------------------------|
| G14C-ATTO 647N | 0,79 |
| G14C-Cy5 | 1,06 |
| S79C-Cy5 | 0,83 |

Anschließend wurden 20 μL einer Lösung des entsprechenden Inhibitors in die Küvette zugegeben und die fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen mit den in Tabelle 10 aufgelisteten Einstellungen wiederholt. Hierbei wurden sämtliche in Tabelle 9 aufgelisteten Probenysteme mit dem allosterischen Inhibitor HWu180 umgesetzt. Darüber hinaus wurde die mit ATTO 647N markierte Cystein-Einzelmutante G14C zusätzlich in Gegenwart von BM1 ensemblespektroskopisch untersucht. Die Liganden lagen hierbei, ähnlich wie das Enzym, gelöst in Assay-Puffer 1, welchem 10 Vol.-% DMSO zugesetzt wurden, vor.

Tabelle 10: Auflistung der Messparameter, welche zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven (TCSPC-Messung) sowie der Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzanregungsspektren im Rahmen der ensemblespektroskopischen Charakterisierung der Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen verwendet wurden. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Emissionswellenlänge λ_{Em} , Repetitionsrate R.

| Parameter | | Emissionsspektrum | Anregungsspektrum | TCSPC |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| λ_{Ex} | Marker: ATTO 647N | 600 nm | 400 nm – 665 nm | 649 nm |
| | Marker: Cy5 | | 400 nm – 675 nm | 652 nm |
| λ_{Em} | Marker: ATTO 647N | 610 nm – 800 nm | 675 nm | 665 nm |
| | Marker: Cy5 | | 685 nm | 670 nm |
| Schrittweite | | 1 nm | 1 nm | - |
| R | | - | - | 10 MHz |
| Integrationszeit | | 0,5 s | 0,5 s | 200 s |

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Konzentrationen der zugesetzten Inhibitorlösungen. Um Aussagen über die relative Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe eines Liganden treffen zu können, wurden die TCSPC-Messungen in An- und Abwesenheit des jeweiligen Liganden mit identischen spektralen Bandbreiten des Emissionsmonochromators durchgeführt.

Reagierten photophysikalische Parameter des jeweiligen an der PR befindlichen Fluoreszenzmarkers sensitiv auf die Anwesenheit eines Liganden, so wurden in der Folge Kontrolleexperimente angestellt. An dieser Stelle sei bereits erwähnt, dass vorstehend genannte Bedingung nur

3.4 Versuchsdurchführung und Datenanalyse

Tabelle 11: Zusammenfassung der im Rahmen der ensemblespektroskopischen Charakterisierung der Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen verwendeten Konzentrationen der zugesetzten Inhibitorlösungen.

| Ligand | Konzentration / μM |
|--------|-------------------------------|
| HWu180 | 320 |
| BM1 | 3200 |

durch die mit ATTO 647N markierte Mutante G14C nach Zugabe von HWu180 und BM1 erfüllt wurde. Mithilfe der Kontrollexperimente sollte überprüft werden, ob die detektierten Änderungen der spektroskopischen Parameter auf eine spezifische Wechselwirkung von Ligand und markiertem Enzym zurückzuführen sind. Insbesondere galt es eine Wechselwirkung des Fluoreszenzmarkers mit den Inhibitoren auszuschließen. Hierzu wurden die vorstehend beschriebenen spektroskopischen Ensemblemessungen im nächsten Schritt unter gleichen Bedingungen wiederholt. Dazu wurde statt der ATTO 647N markierten G14C-Mutante der freie ATTO 647N-Farbstoff jeweils vor und nach Zugabe von HWu180 bzw. BM1 untersucht.

Spektroskopische Titration

Nach erfolgreicher Durchführung der Kontrollexperimente wurde eine spektroskopische Titration durchgeführt. Hierzu wurde die mit ATTO 647N markierte Cystein-Einzelmutante G14C jeweils mit HWu180 und BM1 titriert. Ziel beider Titrierreihen war es, Zugriff auf die Dissoziationskonstante K_D des entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes zu erhalten [37]. Hierzu wurden zunächst 180 μL der 0,79 μM Lösung von G14C-ATTO 647N (siehe Tabelle 9) in eine Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics) überführt. In der Folge wurden polarisationsaufgelöste Fluoreszenzabklingkurven sowie Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzanregungsspektren mit den in Tabelle 12 aufgeführten Messeinstellungen aufgenommen.

Tabelle 12: Auflistung der Messparameter, welche zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven (TCSPC-Messung) sowie der Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzanregungsspektren im Rahmen der beiden spektroskopischen Titrations verwendet wurden. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Emissionswellenlänge λ_{Em} , Repetitionsrate R.

| Parameter | Emissionsspektrum | Anregungsspektrum | TCSPC |
|--|-------------------|-------------------|--------|
| λ_{Ex} | 645 nm | 634 nm – 671 nm | 649 nm |
| λ_{Em} | 655 nm – 687 nm | 678 nm | 665 nm |
| spektrale Bandbreite des Anregungsmonochromators | 8 nm | 2 nm | - |
| spektrale Bandbreite des Emissionsmonochromators | 2 nm | 5 nm | 7 nm |
| Schrittweite | 1 nm | 1 nm | - |
| R | - | - | 10 MHz |
| Integrationszeit | 1,0 s | 1,0 s | 200 s |

3 Experimentelles

Nun wurde der in der Küvette vorgelegten Enzymlösung der jeweilige Ligand sukzessive bis zu einer Endkonzentration von 129,6 μM (HWu180) bzw. 940,5 μM (BM1) zugegeben (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14). Hierbei lagen die Liganden gelöst in Assay-Puffer 1, welcher mit 10 Vol.-% DMSO versetzt wurde, vor. Nach jedem Titrationsschritt wurden die fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen mit den in Tabelle 12 aufgeführten Messeinstellungen wiederholt.

Tabelle 13: Konzentrationen der ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C der DENV-2-PR und des Liganden HWu180, welche während der spektroskopischen Titration an den einzelnen Titrationsschritten in der Präzisionsküvette vorlagen.

| Probe | c(HWu180) / μM | c(G14C-ATTO 647N) / μM | Probe | c(HWu180) / μM | c(G14C-ATTO 647N) / μM |
|-------|------------------------------|--------------------------------------|-------|------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0,0 | 0,79 | 7 | 36,1 | 0,65 |
| 2 | 4,2 | 0,75 | 8 | 42,3 | 0,64 |
| 3 | 8,0 | 0,71 | 9 | 48,3 | 0,62 |
| 4 | 15,5 | 0,70 | 10 | 69,8 | 0,57 |
| 5 | 22,7 | 0,68 | 11 | 88,1 | 0,53 |
| 6 | 29,5 | 0,66 | 12 | 129,6 | 0,43 |

Anschließend sollte aus den aufgenommenen Daten durch Anpassung mit einem Zweikomponentenmodell der relative Anteil des Enzym-Inhibitor-Komplexes an der gesamten Enzymmenge für die einzelnen Titrationsschritte bestimmt und gegen die jeweilige Konzentration des

Tabelle 14: Konzentrationen der ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C der DENV-2-PR und des Liganden BM1, welche während der spektroskopischen Titration an den einzelnen Titrationsschritten in der Präzisionsküvette vorlagen.

| Probe | c(BM1) / μM | c(G14C-ATTO 647N) / μM | Probe | c(BM1) / μM | c(G14C-ATTO 647N) / μM |
|-------|---------------------------|--------------------------------------|-------|---------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0,0 | 0,79 | 9 | 141,7 | 0,60 |
| 2 | 25,3 | 0,75 | 10 | 176,0 | 0,57 |
| 3 | 36,9 | 0,73 | 11 | 237,0 | 0,53 |
| 4 | 48,0 | 0,71 | 12 | 324,1 | 0,49 |
| 5 | 58,5 | 0,70 | 13 | 417,5 | 0,45 |
| 6 | 78,1 | 0,66 | 14 | 571,6 | 0,43 |
| 7 | 87,2 | 0,65 | 15 | 708,5 | 0,40 |
| 8 | 104,3 | 0,62 | 16 | 940,5 | 0,36 |

Liganden aufgetragen werden. Weiterhin wurde beabsichtigt, die so erhaltenen Bindungskurven mit einem Eins-zu-Eins-Bindungsmodell anzupassen, um so Zugriff auf die Dissoziations-

konstante K_D des entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes zu erhalten [37, 314]. Aufgrund verschiedener Umstände, auf welche an geeigneter Stelle im Ergebnisteil eingegangen wird, konnte die beschriebene Auswertung jedoch nicht durchgeführt werden.

Chase-Experiment

Abschließend wurde die Reversibilität der Bindungswechselwirkungen zwischen G14C-ATTO 647N und den beiden allosterischen Inhibitoren BM1 und HWu180 mithilfe zweier Chase-Experimente überprüft [37]. Hierzu wurde zunächst jeweils ein Aliquot der 0,79 μM Lösung des markierten Enzyms (siehe Tabelle 9) in eine Präzisionsküvette überführt und ensemblespektroskopisch mit den in Tabelle 10 (Chase-Experiment 1 mit HWu180) bzw. Tabelle 12 (Chase-Experiment 2 mit BM1) aufgeführten Einstellungen vermessen. In der Folge wurde ein Überschuss des jeweiligen Inhibitors zugegeben und das resultierende Gemisch erneut mit unveränderten Messeinstellungen ensemblespektroskopisch charakterisiert. Um zu eruieren, ob die farbstoffmarkierte PR aus den bereits vorgebildeten Enzym-Inhibitor-Komplexen verdrängt werden kann, wurde daraufhin das jeweilige Probengemisch mit einem Überschuss an nicht-markierter WT-PR versetzt und schließlich abermals fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Auch hierbei fanden die in Tabelle 10 bzw. Tabelle 12 aufgelisteten Messparameter Anwendung. Sowohl die zugesetzten Liganden als auch der zugegebene nicht-markierte WT lagen jeweils gelöst in Assay-Puffer 1, welcher mit 10 Vol.-% DMSO versetzt wurde, vor. Tabelle 15 fasst die Konzentrationen der unterschiedlichen Komponenten, welche während der beiden Chase-Experimente in der Präzisionsküvette vorlagen, zusammen.

Tabelle 15: Konzentrationen der ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C der DENV-2-PR, der Liganden HWu180 bzw. BM1 und der nicht-markierten WT-PR, welche während der beiden Chase-Experimente an den einzelnen Titrationspunkten in der Präzisionsküvette vorlagen.

| Chase-Experiment 1 | | | |
|---------------------------|---|---|--|
| Probe | c(G14C-ATTO 647N) / μM | c(HWu180) / μM | c(WT-PR) / μM |
| 1 | 0,79 | - | - |
| 2 | 0,49 | 56,25 | - |
| 3 | 0,33 | 37,5 | 16,95 |
| Chase-Experiment 2 | | | |
| Probe | c(G14C-ATTO 647N) / μM | c(BM1) / μM | c(WT-PR) / μM |
| 1 | 0,79 | - | - |
| 2 | 0,53 | 237,04 | - |
| 3 | 0,32 | 145,46 | 19,65 |

3.4.1.2 WT-PR und markierte Liganden: FCS-Bindestudien

Als alternative Herangehensweise zur Untersuchung der Bindungswechselwirkungen von Protein und Ligand wurden FCS-Bindestudien an den frei in Lösung diffundierenden, farbstoffmarkierten Liganden AG124 und HM076 (siehe Tabelle 7) jeweils vor und nach Zugabe der

3 Experimentelles

nicht-markierten WT-PR durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 150 μL einer 1 nM Lösung des jeweiligen Inhibitors in Assay-Puffer 2, welcher zusätzlich 10 Vol.-% DMSO enthielt, in selbsthergestellten Messgefäßen (siehe Kapitel 3.2) vorgelegt. Dann wurden mit einer modifizierten Form des in Abbildung 20 gezeigten konfokalen Fluoreszenzmikroskops (für Details siehe Tabelle 16) Zeitspuren der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Hierzu wurde das Anregungslicht in die Probenlösung fokussiert und das emittierte Fluoreszenzlicht mithilfe einer APD als Funktion der Zeit detektiert. Die hierbei verwendeten Messparameter können in Tabelle 17 eingesehen werden.

Tabelle 16: Spezifische Konfigurationen des konfokalen Fluoreszenzmikroskops, die zur Durchführung der FCS-Bindestudien an den frei in Lösung diffundierenden farbstoffmarkierten Liganden AG124 und HM076 Verwendung fanden. Die Abkürzungen der einzelnen Bauteile werden in der Bildunterschrift von Abbildung 20 erläutert. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Anregung im Dauerstrichbetrieb cw.

| Bauteil | | Bezeichnung und Anmerkungen | | | |
|----------------|---|-----------------------------|-------|-------------------------|-----------------------------------|
| Laser | Analyt: | λ_{Ex} / nm | Modus | Typ | Bezeichnung |
| | AG124 | 488 | cw | Diodenlaser | iChrome CLE, Toptica Photonics AG |
| | Analyt: | λ_{Ex} / nm | Modus | Typ | Bezeichnung |
| | HM076 | 640 | cw | Diodenlaser | iChrome CLE, Toptica Photonics AG |
| | | Analyt: AG124 | | | Analyt: HM076 |
| AF | LL01-488, Semrock | | | ZET635/10x, Chroma | |
| Strahlteiler 1 | ZT491rdcxrxt-UF1, Chroma | | | 20R/80T F21-008, Chroma | |
| LP1 | LP02-488RU, Semrock | | | ET655lp, Chroma | |
| Strahlteiler 2 | - | | | | |
| LP2 | - | | | | |
| BP | - | | | | |
| L_{D1} | AC254-300-A, Thorlabs GmbH, Brennweite $f = 300$ mm | | | | |
| L_{D2} | - | | | | |
| APD1 | SPCM-AQRH-15, PerkinElmer | | | | |
| APD2 | - | | | | |
| TCSPC-Modul | PicoHarp 300, PicoQuant | | | | |

Mittels eines PicoHarp 300 Moduls wurden im T2-Modus die Makroankunftszeiten der einzelnen Photonen aufgezeichnet, wodurch die nachträgliche Berechnung von Autokorrelationsfunktionen möglich wurde.

Nun wurde die in der Probenzelle vorgelegte Lösung des jeweiligen Liganden mit steigenden Konzentrationen der nicht-markierten WT-PR versetzt. Hierbei lag die PR gelöst in

3.4 Versuchsdurchführung und Datenanalyse

Assay-Puffer 2, welcher mit 10 Vol.-% DMSO versetzt wurde, vor. Nach jeder Zugabe der WT-PR wurden die FCS-Messungen mit den in Tabelle 17 aufgeführten Messparametern wiederholt.

Tabelle 17: Auflistung der Messparameter, welche zur Durchführung der FCS-Bindestudien an den frei in Lösung diffundierenden farbstoffmarkierten Liganden AG124 (FCS-Bindestudie 1) und HM076 (FCS-Bindestudie 2) verwendet wurden. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Anregungsleistung P_{Ex} .

| Experiment Parameter | FCS-Bindestudie 1 | FCS-Bindestudie 2 |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| λ_{Ex} | 488 nm | 640 nm |
| P_{Ex} | 3 μ W | |
| Messdauer | 1800 s | 900 s |
| TTTR-Modus TCSPC-Modul | T2 | |

Tabelle 18 fasst die Konzentrationen der unterschiedlichen Komponenten, welche während der beiden FCS-Bindestudien in den Probenzellen vorlagen, zusammen.

Tabelle 18: Konzentrationen der farbstoffmarkierten Liganden AG124 bzw. HM076 und der nicht-markierten WT-PR, welche während der beiden FCS-Bindestudien an den einzelnen Titrationspunkten in den Probenzellen vorlagen.

| FCS-Bindestudie 1 | | | FCS-Bindestudie 2 | | |
|-------------------|---------------|--------------------|-------------------|---------------|--------------------|
| Probe | c(AG124) / nM | c(WT-PR) / μ M | Probe | c(HM076) / nM | c(WT-PR) / μ M |
| 1 | 1,00 | - | 1 | 1,00 | - |
| 2 | 0,94 | 1,0 | 2 | 0,94 | 1,2 |
| 3 | 0,50 | 7,8 | 3 | 0,88 | 11,9 |
| 4 | 0,50 | 77,9 | 4 | 0,48 | 89,3 |

Um eine eventuelle Bindung zwischen den farbstoffmarkierten Liganden und der WT-PR zu visualisieren, wurde für jeden Datensatz gemäß Gleichung (30) eine Autokorrelationsfunktion $G_{1,1}(\tau)$ der Fluoreszenzintensität berechnet. Hierzu wurde eine Routine, welche von XXXXXXXXXX geschrieben wurde, verwendet.

Neben den vorstehend skizzierten Untersuchungen wurden ferner Kontrolleexperimente durchgeführt, um zu evaluieren, ob die gemessene Bindung der farbstoffmarkierten Liganden an das Enzym spezifisch ist. Im Speziellen musste eine direkte Wechselwirkung des jeweiligen Fluoreszenzmarkers mit der WT-PR ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die FCS-Bindestudien wiederholt. Allerdings wurden statt AG124 der freie ATTO 488-Farbstoff und anstelle von HM076 der ungebundene Cy5-Farbstoff jeweils vor und nach Zugabe der nicht-markierten WT-PR untersucht. Alle weiteren Bedingungen blieben unverändert.

3.4.2 Untersuchung der Proteindynamik

Der zweite große Themenblock dieser Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Proteindynamik der DENV-2-PR beitragen. Hierzu wurden mithilfe eines konfokalen Mikroskops Fluoreszenzmessungen sowohl an frei diffundierenden als auch an immobilisierten FRET-Paar markierten DENV-2-PRs durchgeführt. Die experimentelle Realisierung dieser beiden Ansätze soll in den folgenden Unterkapiteln skizziert werden.

3.4.2.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

Zunächst sollte geklärt werden, ob in Lösung ein Gleichgewicht zwischen mehreren Konformationen der PR vorliegt und inwiefern die Anwesenheit verschiedener Liganden ein solches Gleichgewicht beeinflusst. Hierzu wurden konfokale Fluoreszenzmessungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Doppelmutanten des Enzyms aus Tabelle 5, jeweils vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden, durchgeführt. Aus den erhaltenen Datensätzen wurden sowohl FCS-FRET- als auch smFRET-Informationen extrahiert. Weiterhin galt es zu untersuchen, ob die gewählte Mess- und Auswertemethodik grundsätzlich geeignet ist, um obenstehende Fragestellungen zu adressieren. In diesem Zusammenhang wurden entsprechende Referenzmessungen an einer Mischung der beiden in Kapitel 3.1.5 vorgestellten statischen DNA-Doppelstrang-Proben durchgeführt. Die experimentelle Durchführung dieser Referenzmessungen wird zum Abschluss dieses Unterkapitels skizziert.

FRET-Paar markierte PRs vor und nach Zugabe diverser Liganden

Zunächst wurden 150 μL einer ca. 100 pM Lösung des jeweiligen FRET-Paar markierten Enzyms in Assay-Puffer, welcher zusätzlich 10 Vol.-% DMSO enthielt, in selbsthergestellten Messgefäßen (siehe Kapitel 3.2) vorgelegt. Hierbei lagen die beiden FRET-Paar markierten Konstrukte S79C-S158C A und S79C-S158C B in Assay-Puffer 2 vor, wohingegen die FRET-Paar markierte S79C-G14C-Doppelmutante in Assay-Puffer 1 gelöst war. Daraufhin wurden – unter Verwendung der in Tabelle 19 aufgeführten Messparameter – mit einer modifizierten Form des in Abbildung 20 gezeigten konfokalen Mikroskops (für Details siehe Tabelle 20) Intensitäts-Zeitspuren aufgenommen.

Tabelle 19: Auflistung der Messparameter, welche zur Durchführung der Messungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR jeweils vor und nach Zugabe diverser Liganden verwendet wurden. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Anregungsleistung P_{Ex} , Repetitionsrate R.

| Parameter | λ_{Ex} | P_{Ex} | Messdauer | R | TTTR-Modus TCSPC-Modul |
|-------------|----------------|------------------|-----------|--------|------------------------|
| Einstellung | 502 nm | 10 μW | 3600 s | 10 MHz | T3 |

Hierzu wurde das spektral gefilterte Anregungslicht ($\lambda_{Ex} = 502 \text{ nm}$) eines gepulsten Weißlicht-Faserlasers mithilfe des Mikroskopobjektives in die Probenlösung fokussiert. Das im Probenraum erzeugte Fluoreszenzlicht wurde mithilfe desselben Objektivs eingesammelt und über einen dichroitischen Spiegel (Strahlteiler 1) vom Anregungslicht separiert. Schließlich traf das Fluoreszenzlicht auf einen weiteren dichroitischen Spiegel (Strahlteiler 2). Dieser ließ rotes Licht ab einer Wellenlänge von ungefähr 655 nm in Richtung von APD1 transmittieren, während energiereicheres Licht in Richtung von APD2 reflektiert wurde. Zur weiteren spektralen Aufreinigung der beiden Strahlengänge befand sich im Akzeptor-Kanal A vor APD1 ein Langpassfilter (LP 2) sowie im Donor-Kanal D vor APD2 ein Bandpassfilter (BP). Diese Filterkombination ermöglichte eine weitestgehend isolierte Detektion von Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz. Beide Detektoren wurden an ein HydraHarp 400 Modul (PicoQuant) angeschlossen, sodass im T3-Modus sowohl die Mikro- als auch die Makrozeiten der einzelnen Photonen

3.4 Versuchsdurchführung und Datenanalyse

aufgezeichnet werden konnten. Aus den erhaltenen Datensätzen konnten Korrelationsfunktionen sowie Zeitspuren der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität berechnet werden. Ferner erlaubte die Aufzeichnung der Mikrozeiten die burstweise Berechnung von Fluoreszenzlebensdauern, weshalb die aufgenommenen Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren im Folgenden als farb- und zeitaufgelöst bezeichnet werden.

Tabelle 20: Spezifische Konfiguration des konfokalen Fluoreszenzmikroskops, die zur Durchführung der Messungen an den FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR jeweils vor und nach Zugabe diverser Liganden Verwendung fand. Die Abkürzungen der einzelnen Bauteile werden in der Bildunterschrift von Abbildung 20 erläutert. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , gepulste Anregung p.

| Bauteil | Bezeichnung und Anmerkungen | | | |
|----------------|---|-------|----------------------|-----------------------|
| | λ_{Ex} / nm | Modus | Typ | Bezeichnung |
| Laser | λ_{Ex} / nm | Modus | Typ | Bezeichnung |
| | 502 | p | Weißlicht-Faserlaser | SC-OEM, YSL Photonics |
| AF | BrightLine HC 500/10, Semrock | | | |
| Strahlteiler 1 | ZT491rdexrxt-UF1, Chroma | | | |
| LP1 | ET510lp, Chroma | | | |
| Strahlteiler 2 | ZT640rdc-UF1, Chroma | | | |
| LP 2 | ET655lp, Chroma | | | |
| BP | FF01-550/88, Semrock | | | |
| LD1 | AC254-300-A, Thorlabs GmbH, Brennweite $f = 300$ mm | | | |
| LD2 | AC254-075-A1, Thorlabs GmbH, Brennweite $f = 75$ mm | | | |
| APD1 | SPCM-AQRH-15, PerkinElmer | | | |
| APD2 | PDM 50ct, MPD | | | |
| TCSPC-Modul | HydraHarp 400, PicoQuant | | | |

Anschließend wurden 150 μ L einer Lösung des entsprechenden Liganden in das Bechergläschen hinzugegeben und erneut farb- und zeitaufgelöste Intensitäts-Zeitspuren aufgenommen. Die Messparameter entsprachen hierbei jenen vor Zugabe des jeweiligen Liganden. Es sei erwähnt, dass die zugesetzten Liganden, ähnlich wie das jeweils in der Probenzelle vorgelegte Enzym, in Assay-Puffer 1 bzw. 2, welcher mit 10 Vol.-% DMSO versetzt wurde, vorlagen.

Tabelle 21 liefert eine Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen und fasst ferner die Konzentrationen der unterschiedlichen Komponenten, welche während der Experimente in den Probenzellen vorlagen, zusammen.

Die erhaltenen Photonenströme wurden zwei Auswertungen unterzogen. Um grob abschätzen zu können, ob ein dynamisches Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen des Enzyms vorliegt und inwiefern dieses durch die Zugabe unterschiedlicher Liganden beeinflusst

3 Experimentelles

Tabelle 21: Übersicht über die durchgeführten Messungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR. Es werden die Konzentrationen der jeweiligen FRET-Paar markierten Doppelmutante des Enzyms vor und nach Zugabe der diversen Liganden sowie die Konzentrationen der zugesetzten Liganden im Messgefäß aufgelistet. Zusätzlich wird die Zusammensetzung der Matrix, in welcher die Enzyme sowie die zugesetzten Liganden vorliegen, angegeben.

| Analyt | Probe | c(PR) / pM | zugesetzter Ligand | c(Ligand) / μ M | Matrix |
|--------------|-------|------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------|
| S79C-G14C | 1 | 82,4 | - | 0 | Assay-Puffer 1 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 41,2 | mb43 | 10 | |
| S79C-G14C | 1 | 82,4 | - | 0 | Assay-Puffer 1 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 41,2 | S1 | 100 | |
| S79C-G14C | 1 | 82,4 | - | 0 | Assay-Puffer 1 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 41,2 | S2 | 100 | |
| S79C-S158C A | 1 | 102,6 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 51,3 | mb43 | 10 | |
| S79C-S158C A | 1 | 102,6 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 51,3 | BM214 | 50 | |
| S79C-S158C A | 1 | 102,6 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 51,3 | S1 | 100 | |
| S79C-S158C A | 1 | 102,6 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 51,3 | S2 | 100 | |
| S79C-S158C B | 1 | 128,7 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 64,4 | mb43 | 10 | |
| S79C-S158C B | 1 | 128,7 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 64,4 | BM214 | 50 | |
| S79C-S158C B | 1 | 128,7 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 64,4 | S1 | 100 | |
| S79C-S158C B | 1 | 128,7 | - | 0 | Assay-Puffer 2 mit 10 Vol.-% DMSO |
| | 2 | 64,4 | S2 | 100 | |

wird, wurden zunächst aus den aufgezeichneten Makroankunftszeiten der einzelnen Photonen für jeden Datensatz Korrelationsfunktionen berechnet (FCS-FRET) [73, 218]. Hierzu wurden mit einer von [REDACTED] geschriebenen Routine die Fluoreszenzintensitäten auf beiden APDs gemäß Gleichung (30) auto- und kreuzkorreliert, sodass jeweils eine Akzeptor-Autokorrelationsfunktion $G_{A,A}(\tau)$, eine Donor-Autokorrelationsfunktion $G_{D,D}(\tau)$ sowie eine Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelationsfunktion $G_{A,D}(\tau)$ erhalten wurden. Wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben wurde, kann ein Austausch zwischen verschiedenen Konformationen, die sich in ihrer Energietransfereffizienz unterscheiden, dazu führen, dass die Kreuzkorrelationsfunktion langsamer auf null abfällt als die beiden Autokorrelationen. Voraussetzung hierfür ist, dass der Austausch auf einer Zeitskala, die nicht signifikant langsamer als die Diffusionszeit durch den Fokus ist [73, 218], stattfindet. Dahingegen ergibt ein Vergleich der Gleichungen (36) – (38), dass die Kreuzkorrelationsfunktion in Abwesenheit eines entsprechenden Austausches zwischen $G_{A,A}(\tau)$ und $G_{D,D}(\tau)$ zu liegen kommt [234]. Durch Vergleich der Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen sollten in der vorliegenden Studie demnach qualitative Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer Konformationsdynamik gezogen werden.

Um Aussagen über eventuell vorhandene Subpopulationen treffen zu können, wurden die Daten anschließend auf Einzelmolekülebene betrachtet (smFRET) [65]. Die entsprechende Auswertung wurde von [REDACTED] mit einer in MATLAB geschriebenen Software-Routine vorgenommen. Zunächst wurden für jeden Datensatz aus den Makrozeiten der einzelnen Photonen die Zeitspuren der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität berechnet (Zeitauflösung = 1 ms). Nun wurden einzelne Fluoreszenzbursts, welche auf den Transit einzelner FRET-Paar markierter PR-Moleküle durch das Anregungsvolumen zurückzuführen sind, aus den Zeitspuren extrahiert und anschließend analysiert (Burst-Analyse) [263, 264]. Zur weiteren Auswertung wurden hierbei lediglich Bursts herangezogen, welche in Summe auf beiden APDs mindestens zehn Zählereignisse zeigten. Für jeden Burst wurde schließlich aus den Mikrozeiten der im Donor-Kanal detektierten Photonen eine mittlere Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ (ohne Berücksichtigung der Instrumentenfunktion) berechnet. Weiterhin wurde gemäß Gleichung (20) pro Burst eine Energietransfereffizienz E_{ET} bestimmt. Hierzu wurden die jeweils innerhalb eines Bursts detektierten Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensitäten wie folgt verrechnet:

$$E_{ET} = \frac{I_A}{\gamma I_D + I_A} = \frac{I_{APD1}}{\gamma I_{APD2} + I_{APD1}} \quad (43)$$

Der zur Berechnung der Energietransfereffizienz benötigte Korrekturfaktor γ wurde entsprechend der in Gleichung (21) notierten Vorschrift ermittelt. Hierzu müssen die unterschiedlichen Detektionseffizienzen η_i des experimentellen Aufbaus gegenüber Donor- und Akzeptor-Emission sowie die Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_i beider Farbstoffe berücksichtigt werden. Für Letztere wurden die jeweiligen Herstellerangaben (siehe Tabelle 1) übernommen. Die entsprechenden Detektionseffizienzen wurden mithilfe der Kenndaten der optischen Komponenten des Mikroskops (Quanteneffizienz der Detektoren, Transmissionskurven), welche seitens des jeweiligen Herstellers bekannt gegeben wurden, bestimmt. Die ermittelten Korrekturfaktoren wurden keiner weiteren experimentellen Überprüfung unterzogen. Für das Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N ergab sich ein Korrekturfaktor von nahezu 1. Dahingegen wurde für das zweite FRET-Paar ATTO 488 / Cy5 ein Korrekturfaktor von 0,43 ermittelt. Hierbei ist die Diskrepanz zwischen beiden Korrekturfaktoren auf die deutlich unterschiedlichen Fluoreszenzquantenausbeuten der beiden Akzeptor-Farbstoffe ATTO 647N und Cy5 zurückzuführen. Im Zuge der Berechnung von E_{ET} wurde weder ein spektrales Übersprechen der Donor-Fluoreszenz in den Akzeptor-Kanal noch eine direkte Anregung des Akzeptors berücksichtigt [65].

Nun wurde die Häufigkeit der einzelnen Bursts in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit und Energietransfereffizienz, aufgetragen. Wie den Ausführungen im

3 Experimentelles

Kapitel „smFRET-Messungen in Lösung: Burst-Analyse und MFD“ entnommen werden kann, ermöglicht eine solche Auftragung die Identifikation vorhandener Subpopulationen. Auch kann mithilfe der 2D-Histogramme beurteilt werden, ob ein Ligand eine bestimmte Konformation des Enzyms stabilisiert. Weiterhin bietet der Vergleich der Lage einzelner Subpopulationen relativ zur statischen FRET-Linie, welche durch Gleichung (23) beschrieben wird, einen zweiten qualitativen Indikator für das Vorhandensein einer Konformationsdynamik [74].

FRET-Paar markierte dsDNA als Referenzsystem

Um zu prüfen, ob die vorstehend geschilderte Methodik zur Untersuchung der zu Beginn von Kapitel 3.4.2.1 skizzierten Fragestellungen geeignet ist, wurden entsprechende Kontrollmessungen an dem in Kapitel 3.1.5 vorgestellten statischen Referenzsystem angestellt. Hierzu wurden 150 μL einer Mischung der beiden DNA-Doppelstrang-Proben dsDNA-1 und dsDNA-2 in Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) in einer selbsthergestellten Probenzelle (siehe Kapitel 3.2) vorgelegt. Beide dsDNA-Proben lagen hierbei jeweils mit einer Konzentration von 50 pmol/L in der Mischung vor. Nun wurden mit einer modifizierten Form des in Abbildung 20 gezeigten konfokalen Fluoreszenzmikroskops (für Details siehe Tabelle 22) farb- und zeitaufgelöste Zeitspuren der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Die hierbei verwendeten Messparameter entsprachen weitestgehend jenen Einstellungen, welche in Tabelle 19 aufgeführt werden. Lediglich die Anregungswellenlänge λ_{Ex} wurde auf 488 nm eingestellt.

Tabelle 22: Spezifische Konfiguration des konfokalen Fluoreszenzmikroskops, die zur Durchführung der Messungen an der Mischung der beiden frei diffundierenden FRET-Paar markierten DNA-Doppelstrang-Proben Verwendung fand. Die Abkürzungen der einzelnen Bauteile werden in der Bildunterschrift von Abbildung 20 erläutert. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , gepulste Anregung p.

| Bauteil | Bezeichnung und Anmerkungen | | | |
|----------------|--|-------|----------------------|-----------------------|
| | λ_{Ex} / nm | Modus | Typ | Bezeichnung |
| Laser | 488 | p | Weißlicht-Faserlaser | SC-OEM, YSL Photonics |
| | 3rd 490 SP, Omega und FF01-510/84, Semrock und LL01-488, Semrock | | | |
| AF | ZT491rdcxrxt-UF1, Chroma | | | |
| Strahlteiler 1 | LP02-488RU, Semrock | | | |
| LP1 | H 643 LPXR superflat, Chroma | | | |
| Strahlteiler 2 | ET655lp, Chroma | | | |
| LP 2 | FF01-550/88, Semrock | | | |
| BP | AC254-300-A, Thorlabs GmbH, Brennweite $f = 300$ mm | | | |
| L_{D1} | AC254-075-A1, Thorlabs GmbH, Brennweite $f = 75$ mm | | | |
| L_{D2} | SPCM-AQRH-15, PerkinElmer | | | |
| APD1 | PDM 50ct, MPD | | | |
| APD2 | HydraHarp 400, PicoQuant | | | |
| TCSPC-Modul | | | | |

3.4 Versuchsdurchführung und Datenanalyse

Die erhaltenen Photonenströme wurden, analog zu den Messungen an den frei in Lösung diffundierenden DENV-2-PR-Molekülen, den beiden im vorstehenden Abschnitt beschriebenen Auswertungen unterzogen. Für den zur Berechnung der Energietransfereffizienz benötigten Korrekturfaktor wurde ein Wert von 0,82 ermittelt.

3.4.2.2 TCSPC-Messungen im Ensemble

In Ergänzung zu den vorstehend skizzierten konfokalen Fluoreszenzmessungen an den frei in Lösung diffundierenden PR-Molekülen, wurde jedes der in Tabelle 21 aufgelisteten Probensysteme zusätzlich mithilfe eines zeitaufgelösten Ensembleexperimentes charakterisiert. Hierdurch sollte eruiert werden, ob die im Einzelmolekülexperiment beobachteten Effekte, welche durch die Zugabe der unterschiedlichen Liganden induziert wurden, auch auf Ensemble-Ebene nachgewiesen werden konnten. Hierzu wurden jeweils 50 μL einer ca. 0,8 μM Lösung des entsprechenden FRET-Paar markierten Enzyms in Assay-Puffer, welcher zusätzlich 10 Vol.-% DMSO enthielt, in eine Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics) überführt. Die beiden FRET-Paar markierten Konstrukte S79C-S158C A und S79C-S158C B lagen hierbei in Assay-Puffer 2 vor, wohingegen die FRET-Paar markierte S79C-G14C-Doppelmutante in Assay-Puffer 1 gelöst war. Die exakten Konzentrationen der jeweiligen Enzymlösung werden in Tabelle 23 spezifiziert.

Tabelle 23: Zusammenfassung der im Rahmen der zeitaufgelösten Ensemblemessungen verwendeten Konzentrationen der drei FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR.

| Probe | Konzentration / μM |
|--------------|-------------------------------|
| S79C-G14C | 0,82 |
| S79C-S158C A | 0,86 |
| S79C-S158C B | 0,72 |

Von der jeweils vorgelegten Enzymlösung wurden sodann mithilfe der TCSPC-Methode drei Fluoreszenzabklingkurven unter dem magischen Polarisationswinkel aufgenommen. Hierbei fanden die in Tabelle 24 aufgeführten Messparameter Einsatz. Zunächst wurde der Donor angeregt und die resultierende Donor-Emission zeitaufgelöst detektiert. Weiterhin wurde die Emission des Akzeptors nach gepulster Anregung sowohl des Donors als auch des Akzeptors zeitaufgelöst registriert.

Tabelle 24: Auflistung der Messparameter, welche zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven verwendet wurden. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Emissionswellenlänge λ_{Em} , Repetitionsrate R.

| Anregung des Donors Detektion des Donors | | Anregung des Donors Detektion des Akzeptors | | Anregung des Akzeptors Detektion des Akzeptors | |
|---|-------------|--|-------------|---|-------------|
| Parameter | Einstellung | Parameter | Einstellung | Parameter | Einstellung |
| λ_{Ex} | 488 nm | λ_{Ex} | 488 nm | λ_{Ex} | 649 nm |
| λ_{Em} | 515 nm | λ_{Em} | 730 nm | λ_{Em} | 730 nm |
| R | 5 MHz | R | 5 MHz | R | 5 MHz |
| Integrationszeit | 200 s | Integrationszeit | 600 s | Integrationszeit | 200 s |

3 Experimentelles

Anschließend wurden 20 μL einer Lösung des entsprechenden Liganden in die Küvette zugegeben und die drei TCSPC-Messungen mit den in Tabelle 24 aufgelisteten Einstellungen wiederholt. Die Liganden lagen hierbei, ähnlich wie das vorgelegte Enzym, in Assay-Puffer 1 bzw. 2, welcher mit 10 Vol.-% DMSO versetzt wurde, vor. Tabelle 25 fasst die Konzentrationen der zugesetzten Ligandlösungen zusammen.

Tabelle 25: Zusammenfassung der im Rahmen der zeitaufgelösten Ensemblemessungen verwendeten Konzentrationen der zugesetzten Ligandlösungen.

| Ligand | Konzentration / mM |
|------------|--------------------|
| mb43 | 0,32 |
| BM214 | 0,42 |
| S1 bzw. S2 | 0,35 |

3.4.2.3 smFRET-Messungen an immobilisierten PRs

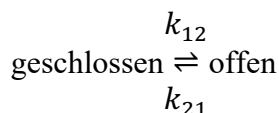
Um das Enzym über einen längeren Zeitraum untersuchen und somit Konformationsübergänge als Funktion der Zeit verfolgen zu können, wurden zusätzlich smFRET-Messungen an immobilisierten PR-Molekülen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 200 μL einer 114 pM Lösung von S79C-S158C A in Assay-Puffer 2 in einer selbsthergestellten Probenzelle, deren Boden aus einem mit PEG-Nickel-NTA beschichteten Glasträger (siehe Kapitel 3.2) bestand, vorgelegt. Nach Belegung des Objektträgers mit PR-Molekülen wurden konfokale Fluoreszenzbilder der Probe aufgenommen. Hierzu wurde die modifizierte Form des in Abbildung 20 gezeigten Aufbaus, welche auch zur Durchführung der smFRET-Messungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Enzymen Verwendung fand, eingesetzt (für Details siehe Tabelle 20). Nun wurden einzelne Fluoreszenzspots, welche auf einzelne farbstoffmarkierte PRs zurückzuführen sind, mit Hilfe des xy-Piezoscanners in das Zentrum des Anregungsfokus positioniert. Von diesen wurden schließlich farb- und zeitaufgelöste Intensitäts-Zeitspuren mit den in Tabelle 26 aufgelisteten Messeinstellungen aufgenommen. Es sei erwähnt, dass nur Fluoreszenzspots, die auch im Akzeptor-Kanal ein Signal zeigten, in den Fokus genommen wurden. So sollte sichergestellt werden, dass lediglich Moleküle, welche mit beiden Farbstoffen ausgestattet und somit in einem FRET-Experiment informativ sind, untersucht wurden. Mit einem HydraHarp 400 Modul (PicoQuant) wurden im T3-Modus sowohl die Mikro- als auch die Makrozeiten der einzelnen Photonen aufgezeichnet. Eine Messung wurde abgebrochen, sobald auf beiden Detektoren nur noch Hintergrundrauschen gemessen wurde.

Tabelle 26: Auflistung der Messparameter, welche zur Durchführung der smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C A der DENV-2-PR Verwendung fanden. Abkürzungen: Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Anregungsleistung P_{Ex} , Repetitionsrate R.

| Parameter | λ_{Ex} | P_{Ex} | Messdauer | R | TTTR-Modus TCSPC-Modul |
|-------------|----------------|--------------------|---------------------------------|--------|------------------------|
| Einstellung | 502 nm | 0,25 μW | bis zum Bleichen der Farbstoffe | 10 MHz | T3 |

Um Datensätze, welche im Rahmen einer Untersuchung der Konformationsdynamik interessant sind, herauszufiltern, wurden die aufgenommenen Daten zunächst auf Antikorrelationen zwischen den Signalen beider Detektionskanäle untersucht. Hierzu wurden die im Donor- und Akzeptor-Kanal detektierten Intensitäten eines jeden Datensatzes entsprechend Gleichung (30)

mithilfe einer Routine, welche von ██████ geschrieben wurde, kreuzkorreliert. Um Zugriff auf die Austauschraten zu erhalten, wurde anschließend für jene Datensätze, welche ein antikorreliertes Verhalten zeigten, bestimmt, wann sich das Enzym in welcher Konformation befand und für welche Dauer es in dieser verweilte [74, 278]. Hierzu wurden die entsprechenden Daten durch ██████ einer inkrementellen Stufenanalyse [315] unterzogen. Hierbei kamen unterschiedliche Binning-Zeiten zum Einsatz. Um Anfang und Ende des relevanten Signals zu eruieren, wurden zunächst aus den Makrozeiten der einzelnen Photonen Zeitspuren der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität mit einer Zeitauflösung von 20 ms kalkuliert und diese einer Stufenanalyse unterzogen. Im nächsten Schritt galt es, innerhalb des ermittelten Zeitfensters sämtliche Konformationsübergänge zu identifizieren. Hierzu wurde auf die im entsprechenden Zeitbereich lokalisierten Daten eine zweite, höher aufgelöste Stufenanalyse mit einer Binning-Zeit von 5 ms angewandt. Im Zuge der Auswertung wurde festgestellt, dass einige Datensätze Antikorrelationen zeigen, die im Vergleich zur gewählten Zeitauflösung von 5 ms auf einer signifikant kürzeren Zeitskala stattfinden. Um auch jene Konformationswechsel, welche diesen Antikorrelationen zugrunde liegen, erfassen zu können, war es daher in den entsprechenden Fällen notwendig, eine dritte Stufenanalyse mit einer nochmals größeren Zeitauflösung von 0,5 ms durchzuführen. Konformationsübergänge, welche trotz der höheren Zeitauflösung nicht mithilfe der Stufenanalyse erfasst werden konnten, wurden nachträglich per Hand ergänzt. Anschließend wurden den extrahierten Stufen mithilfe eines Schwellenwertverfahrens [74, 278, 280, 281] Konformationszustände zugeordnet. Hierbei wurden Stufen, welche FRET-Effizienzen größer 65 % aufweisen, dem geschlossenen Zustand zugeordnet, wohingegen Zustände, die sich durch Energietransfereffizienzen kleiner 65 % auszeichnen, der offenen Konformation des Enzyms zugewiesen wurden. Zustände, deren im Akzeptor-Kanal detektiertes Signal weniger als 10 % des maximalen Akzeptor-Signals betrug, wurden als Auszustand klassifiziert. Abschließend sollten die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} der Übergänge zwischen beiden Konformationen ermittelt werden:



Hierzu wurden zunächst die einzelnen Verweildauern im offenen (t_{offen}) und geschlossenen ($t_{\text{geschlossen}}$) Zustand des Enzyms bestimmt. Anschließend wurde jeweils die empirische kumulative Verteilungsfunktion (*empirical cumulative distribution function*, eCDF) über die Verweildauern in beiden Konformationen erstellt und diese mit einem bi-exponentiellen Zerfall angepasst. Im Zuge der Ermittlung der Verweildauern bestand stellenweise die Notwendigkeit zwischen folgenden Szenarien zu differenzieren:

- Weisen zwei oder mehrere unmittelbar aufeinanderfolgende Stufen gemäß der oben festgelegten Schwellenwertklassifikation die gleiche Enzym-Konformation auf, so wird die entsprechende Anzahl an Stufen als ein Zustand mit einer Verweildauer gewertet.
- Werden zwei identische Zustände durch einen Akzeptor-Auszustand separiert, so wird der Auszustand durch den ihn einklammernden Zustand ersetzt, sodass im Endergebnis eine Stufe mit einer Verweildauer in der jeweiligen Konformation resultiert.
- Tritt dahingegen ein Akzeptor-Auszustand zwischen zwei unterschiedlichen Konformationen auf, so wird der Auszustand verworfen. In die Verteilungsfunktionen fließen sodann lediglich die Verweildauern der beiden Zustände ein, welche den Auszustand umgeben.

4 Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen

Im vorliegenden Kapitel werden die Resultate der Untersuchungen, welche zur Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen zwischen der DENV-2-PR und deren Liganden angestellt wurden, vorgestellt und diskutiert. Wie bereits erläutert, wurden in diesem Zusammenhang im Wesentlichen zwei unterschiedliche Vorgehensweisen verfolgt. In einem ersten Ansatz, dessen Ergebnisse zu Beginn dieses Kapitels präsentiert werden, wurde das Enzym mit einer Farbstoffsonde ausgestattet. In der Folge wurde untersucht, ob die Bindung nicht-markierter Liganden an das einfach farbstoffmarkierte Protein Änderungen der photophysikalischen Parameter des an das Enzym gebundenen Fluorophors hervorruft. In Ergänzung hierzu wurden in einem weiteren Projekt die farbstoffmarkierten Liganden AG124 und HM076 im Rahmen von FCS-Bindestudien, deren Resultate in Kapitel 4.2 dargelegt werden, mit der nicht-markierten WT-PR umgesetzt.

4.1 Einfach markierte PRs und nicht-markierte Liganden

Mit dem originären Ziel, direkten Zugang zur Bindung und Freisetzung von Liganden der DENV-2-PR in Echtzeit zu erhalten und somit die zugrunde liegende Assoziations- und Dissoziationskinetik entschlüsseln zu können, wurden diverse fluoreszenzspektroskopische Ensemblemessungen an den in Tabelle 3 aufgelisteten einfach markierten DENV-2-PRs jeweils vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden durchgeführt. Die experimentelle Umsetzung wurde hierbei gemäß Kapitel 3.4.1.1 unter Anleitung des Verfassers dieser Arbeit von ■■■■■, ■■■■■ sowie ■■■■■ im Rahmen von Forschungsmodulen vorgenommen.

4.1.1 Spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkungen

Zur vollständigen fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung der jeweiligen Enzym-Ligand-Bindungswechselwirkungen wurden im ersten Schritt polarisationsaufgelöste Fluoreszenzabklingkurven sowie Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzanregungsspektren der entsprechenden farbstoffmarkierten PR vor und nach Zugabe des jeweiligen Liganden auf Ensemble-Ebene aufgenommen.

G14C-ATTO 647N: Wechselwirkungen mit HWu180 und BM1

Zunächst wurde die mit ATTO 647N markierte Cystein-Einzelmutante G14C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe der allosterischen Inhibitoren HWu180 bzw. BM1 ensemblespektroskopisch untersucht. Wie Abbildung 21 entnommen werden kann, reagieren sämtliche betrachteten Parameter der ATTO 647N-Sonde sensitiv auf die Zugabe beider Liganden. Insbesondere induziert das Hinzufügen der Inhibitoren deutliche bathochrome Verschiebungen der Fluoreszenzspektren. Während die spektrale Lage des Emissionsmaximums nach Zugabe von HWu180 um 5,6 nm in den energieärmeren Bereich wandert (siehe Abbildung 21 (a)), beträgt die entsprechende Rotverschiebung nach Zugabe von BM1 4,3 nm (siehe Abbildung 21 (b)).

4 Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen

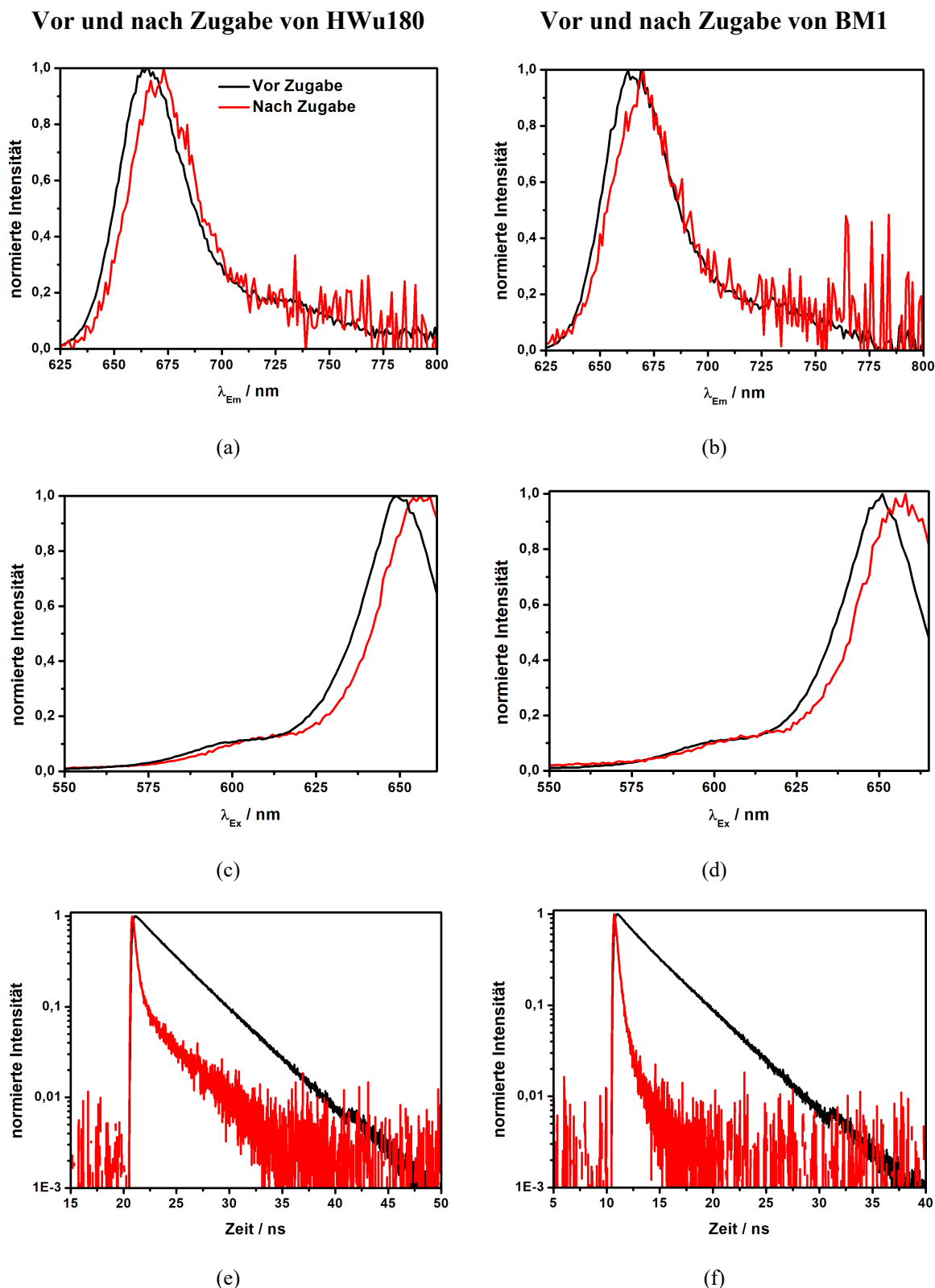


Abbildung 21: Ergebnisse der ensemblespektroskopischen Untersuchungen an der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C jeweils vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von HWu180 (links) bzw. BM1 (rechts). Dargestellt sind jeweils die normierten Emissions- (a, b) und Anregungsspektren (c, d) sowie die normierten Fluoreszenzzerfälle (e, f). Die zur Durchführung der Ensemblemessungen verwendeten Messparameter können Tabelle 10 entnommen werden. Entgegen den Angaben aus Tabelle 10 betrug die Akkumulationszeit zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven in An- und Abwesenheit von HWu180 300 s. Auch die Anregungswellenlänge wurde in diesem Fall auf 633 nm geändert.

4.1 Einfach markierte PRs und nicht-markierte Liganden

Die bathochrome Verschiebung der Anregungsspektren übertrifft gar jene der Emissionsspektren. So bedingt die Zugabe des Inhibitors HWu180 eine Rotverschiebung des Anregungsmaximums in Höhe von 6,2 nm (siehe Abbildung 21 (c)), wohingegen der Zusatz von BM1 eine entsprechende Verschiebung um 6,6 nm auslöst (siehe Abbildung 21 (d)).

Auch die Fluoreszenzzerfallskurven (siehe Abbildung 21 (e), (f)) ändern sich deutlich infolge der Zugabe beider Liganden. So ergibt eine Anpassung der Abklingkurven mit Gleichung (3) unter Berücksichtigung der Instrumentenfunktion, dass für eine gute Beschreibung der Zerfälle in Abwesenheit eines Liganden die Summe zweier Exponentialfunktionen notwendig ist. Dahingegen hat die Gegenwart beider Inhibitoren ein wesentlich schnelleres Abklingverhalten der Fluoreszenz zur Folge, sodass für eine korrekte Beschreibung der entsprechenden Zerfälle eine zusätzliche Komponente mit kürzerer Zerfallszeit berücksichtigt werden muss. Tabelle 27 fasst die aus den Anpassungen der Abklingkurven erhaltenen Fluoreszenzlebenszeiten der unterschiedlichen Komponenten $\tau_{fl}^{(i)}$ sowie deren relativen Häufigkeiten α_i zusammen.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Parameter, welche aus den Anpassungen der Fluoreszenzzerfallskurven der ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C sowohl in An- als auch in Abwesenheit der allosterischen Inhibitoren HWu180 bzw. BM1 mit Gleichung (3) erhalten wurden.

| Probensystem | $\tau_{fl}^{(1)} / \text{ns}$ | $\tau_{fl}^{(2)} / \text{ns}$ | $\tau_{fl}^{(3)} / \text{ns}$ | α_1 | α_2 | α_3 |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------|
| G14C-ATTO 647N + HWu180 | 3,87 | 0,80 | - 0,19 | 0,839 0,024 | 0,161 0,065 | - 0,911 |
| G14C-ATTO647N + BM1 | 3,87 | 0,80 | - 0,17 | 0,782 0,007 | 0,218 0,070 | - 0,923 |

Im Gegensatz hierzu kann das Fluoreszenzabklingverhalten des freien ATTO 647N-Farbstoffes (siehe Abbildung A. 1, Anhang) mit einem monoexponentiellen Zerfall ausreichend gut beschrieben werden. Folglich könnten die beiden Komponenten, welche in der Fluoreszenzabklingkurve des farbstoffmarkierten Proteins in Abwesenheit jeglicher Liganden identifiziert wurden, als Hinweis auf das Vorliegen zweier Enzym-Konformationen gedeutet werden [22, 59]. Diese Interpretation wird durch die Kenntnis gestützt, dass die Fluoreszenzlebensdauer von ATTO 647N in Abhängigkeit der Proteinumgebung variieren kann [316]. Für das Auftreten einer dritten, kurzlebigeren Zerfallskomponente als Resultat der Zugabe von HWu180 bzw. BM1 konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung gefunden werden.

Neben den bereits diskutierten Veränderungen in den Fluoreszenzspektren und den Abklingkurven wird auch die Fluoreszenzintensität eklatant durch die Gegenwart der beiden Liganden beeinflusst. So nimmt die Emissionsintensität nach Zugabe von HWu180 um einen Faktor von ca. 36 ab, während die Zugabe von BM1 eine Reduktion der Fluoreszenz um das fünfzigfache bedingt. Die signifikante Fluoreszenzlöschung bildet die Ursache dafür, dass sowohl die Spektren als auch die Fluoreszenzzerfälle nach Zugabe der beiden Liganden ein stärkeres Rauschen aufweisen (siehe Abbildung 21).

Um zu prüfen, ob die beobachteten Änderungen der spektroskopischen Parameter auf eine spezifische Bindungswechselwirkung zwischen den Liganden und dem farbstoffmarkierten Enzym zurückzuführen sind, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Insbesondere galt es, eine direkte Wechselwirkung des Fluoreszenzmarkers mit den Inhibitoren auszuschließen. Zu diesem Zwecke wurden die vorstehend beschriebenen fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen wiederholt. Allerdings wurde statt der ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C der freie ATTO 647N-Farbstoff jeweils in An- und Abwesenheit von HWu180 bzw.

4 Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen

BM1 untersucht. Als wesentliches Resultat dieser Messungen konnte festgestellt werden, dass sich weder die Lage der Spektren noch das Abklingverhalten der Fluoreszenz durch die Zugabe der Liganden signifikant verändern (siehe Abbildung A. 1, Anhang). Folglich kann geschlossen werden, dass die in Abbildung 21 sichtbaren Änderungen der spektroskopischen Parameter vermutlich das Resultat einer spezifischen Interaktion zwischen den Liganden und dem markierten Protein darstellen.

Einzig die Fluoreszenzintensität des freien ATTO 647N-Farbstoffes wird durch die Präsenz beider Liganden signifikant gemindert. So nimmt die Emissionsintensität nach Zugabe von HWu180 um einen Faktor von ca. 4,6 ab, wohingegen der Zusatz von BM1 eine Reduktion der Fluoreszenz um das 2,8-fache bedingt. Da gleichzeitig die Fluoreszenzabklingkurven des freien Fluorophors nahezu keine Änderung erfahren, ist davon auszugehen, dass die Fluoreszenzlöschung, welche durch die Zugabe der beiden Inhibitoren ausgelöst wird, zum überwiegenden Teil statischer Natur und damit auf die Ausbildung von nicht-fluoreszierenden Komplexen aus Farbstoff und Ligand zurückzuführen ist [155]. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass sowohl ATTO 647N [284] als auch die Liganden [29] eine geringe Hydrophilie aufweisen und überdies sämtliche Messungen in einem wässrigen Puffersystem durchgeführt wurden, erscheint die Möglichkeit der Komplexbildung äußerst plausibel [44, 317]. Eine solche direkte Interaktion zwischen Farbstoff und Ligand ist in höchstem Maße unerwünscht. Zum einen kann nicht differenziert werden, welcher Anteil der Fluoreszenzlöschung des am Protein befindlichen Fluorophors auf eine spezifische Bindung der Inhibitoren an das Enzym zurückzuführen ist und welchen Beitrag die Komplexbildung zwischen ATTO 647N und Ligand zur Intensitätsabnahme leistet. Wie in Kapitel 4.1.2 geschildert werden wird, verhindert u. a. dies eine zuverlässige Bestimmung der Dissoziationskonstanten der beiden Enzym-Inhibitor-Komplexe. Zum anderen wird die Anzahl informativer Fluoreszenzsonden durch die Ausbildung der nicht-fluoreszierenden Farbstoff-Ligand-Komplexe vermutlich erheblich reduziert, sodass sämtliche fluoreszenzspektroskopischen Messungen entsprechend beeinträchtigt werden. Es ist davon auszugehen, dass auch deshalb die in Abbildung 21 sichtbaren Änderungen der Fluoreszenzparameter nicht auf Einzelmolekülebene detektiert werden konnten und somit kein Zugriff auf die Assoziations- und Dissoziationskinetik der Enzym-Inhibitor-Komplexe herstellbar war.

G14C-Cy5 / S79C-Cy5: Wechselwirkungen mit HWu180

Aufgrund der obig geschilderten Problematiken wurde beschlossen, die Cystein-Einzelmutante G14C der DENV-2-PR mit dem Cyanin-Farbstoff Cy5 auszustatten, da dieser wesentlich hydrophiler als ATTO 647N ist [285] und folglich eine verminderte Tendenz zur Bildung nicht-fluoreszierender Farbstoff-Ligand-Komplexe aufweisen sollte. Tatsächlich ergaben Vorversuche, dass die Fluoreszenzintensität des freien Cy5-Fluorophors durch die Hinzugabe einer Lösung von HWu180 nicht signifikant gemindert wurde. Weiterhin scheinen Cyanine als Reporter-moleküle zur Untersuchung der Bindungswechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand prädestiniert zu sein, da bekannt ist, dass deren photophysikalischen Eigenschaften äußerst sensitiv auf Umgebungsänderungen reagieren können [43]. Allerdings ergaben die fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen an der mit Cy5 markierten G14C-Mutante, dass keiner der untersuchten photophysikalischen Parameter sensitiv auf die Zugabe von HWu180 reagierte (siehe Abbildung A. 2, Anhang). Folglich ist auch dieses System nicht zur Untersuchung der Assoziations- und Dissoziationskinetik der Enzym-Inhibitor-Komplexe geeignet. Da Veränderungen der photophysikalischen Charakteristika auch von der Lokalisierung des Farbstoffmarkers innerhalb des Proteins abhängig sein können, wurde in einem weiteren Ansatz die Position der Fluoreszenzsonde variiert. Hierzu wurde die Cystein-Einzelmutante S79C mit Cy5 markiert. Auch dieses Konstrukt wurde jeweils in An- und Abwesenheit von HWu180 ensemblespektroskopisch untersucht. Jedoch reagierte auch in diesem Falle keiner der untersuchten Fluoreszenzparameter sensitiv auf die Zugabe von HWu180 (siehe Abbildung A. 2, Anhang).

4.1.2 Spektroskopische Titration

Entsprechend der im vorhergehenden Kapitel präsentierten Ergebnisse, reagierten lediglich die photophysikalischen Parameter der mit ATTO 647N markierten G14C Mutante signifikant auf die Bindung der allosterischen Inhibitoren BM1 und HWu180. Um nun die Dissoziationskonstanten der entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexe zu bestimmen, wurde das G14C-ATTO 647N-Konstrukt jeweils mit diesen beiden Liganden titriert [37]. Die Beschreibung der experimentellen Realisierung beider spektroskopischer Titrationsen kann dem Unterkapitel „Spektroskopische Titration“ des Kapitels 3.4.1.1 entnommen werden.

Wie aus Abbildung 22 eindeutig hervorgeht, korreliert das Ausmaß der bathochromen Verschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima weitestgehend mit der Konzentration des jeweiligen Liganden. Auffällig ist jedoch, dass zunächst eine Blauverschiebung sowohl der Anregungs- als auch der Emissionsmaxima einsetzt, ehe dann die Bandenmaxima mit steigender Konzentration des jeweiligen Inhibitors sprunghaft in den energieärmeren Bereich wandern, bis schließlich ein Plateau mit maximaler spektraler Verschiebung erreicht wird.

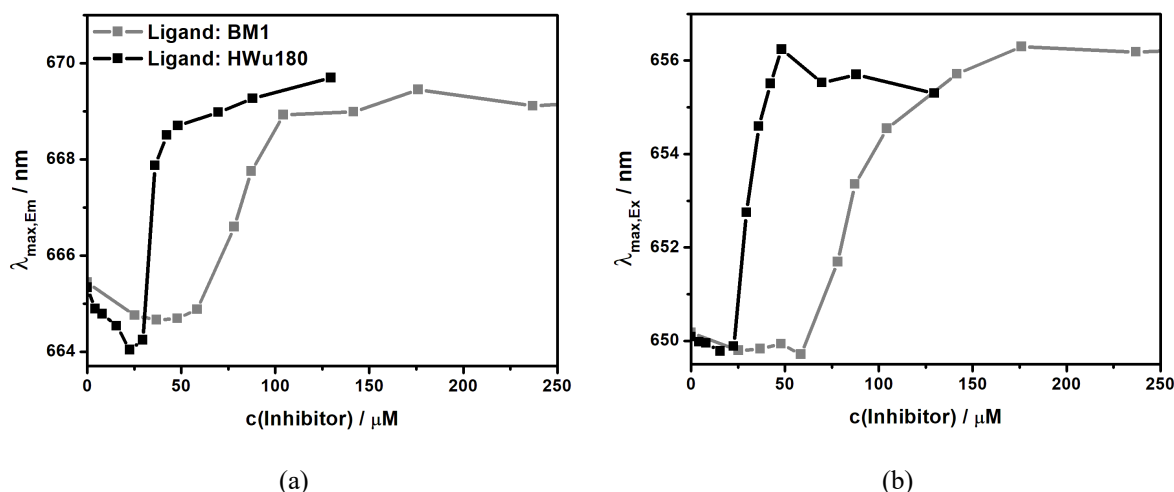


Abbildung 22: Ergebnisse der beiden spektroskopischen Titrationsen der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C mit BM1 (grau) und HWu180 (schwarz). Aufgetragen sind jeweils die spektralen Positionen der Emissionsmaxima $\lambda_{\max,Em}$ (a) sowie der Anregungsmaxima $\lambda_{\max,Ex}$ (b) als Funktion der Konzentration des jeweilig zugesetzten Inhibitors. Die spektrale Lage der Anregungs- und Emissionsmaxima wurde bestimmt, indem mit Origin ein Bereich von ca. 15 nm um das jeweilige Maximum mit einer Gaußfunktion angenähert wurde. Die zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren verwendeten Messparameter können Tabelle 12 entnommen werden.

Neben den beschriebenen spektralen Verschiebungen der Fluoreszenzspektren zeigt auch das Abklingverhalten der Fluoreszenz eine starke Abhängigkeit von der Konzentration beider Liganden (siehe Abbildung 23 und Abbildung A. 3, Anhang). So resultieren steigende Inhibitor-Konzentrationen in erster Näherung in einer zunehmenden Beschleunigung des Fluoreszenzzerfalls. Bemerkenswert ist jedoch, dass in völliger Analogie zum Verhalten der Fluoreszenzspektren, auch die Abklingkurven bei kleinen Inhibitor-Konzentrationen initial eine konträre Änderung erfahren. So setzt zunächst eine Verlangsamung des Fluoreszenzabklingverhaltens ein (siehe Abbildung 23 (a) und Abbildung A. 3 (a), Anhang), ehe mit steigender Konzentration des jeweiligen Inhibitors eine sukzessive Beschleunigung zu beobachten ist, bis schließlich auch hier ein Plateau erreicht wird (siehe Abbildung 23 (b) und Abbildung A. 3 (b), Anhang).

Dass sowohl die bathochrome Verschiebung der Fluoreszenzspektren als auch die Beschleunigung des Fluoreszenzzerfalls mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen gegen einen Grenzwert streben, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ab einer spezifischen Konzentration des jeweiligen Inhibitors sämtliche allosterischen Bindungsstellen des Enzyms mit dem entspre-

4 Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen

chenden Liganden gesättigt sind. Folglich kann eine weitere Zugabe von HWu180 bzw. BM1 keine weiteren Änderungen der photophysikalischen Parameter induzieren. Im Kontext dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, wieso im Falle kleiner Inhibitorkonzentrationen zunächst eine hypsochrome Verschiebung der Fluoreszenzspektren sowie eine Entschleunigung des Fluoreszenzabklingverhaltens beobachtet wird.

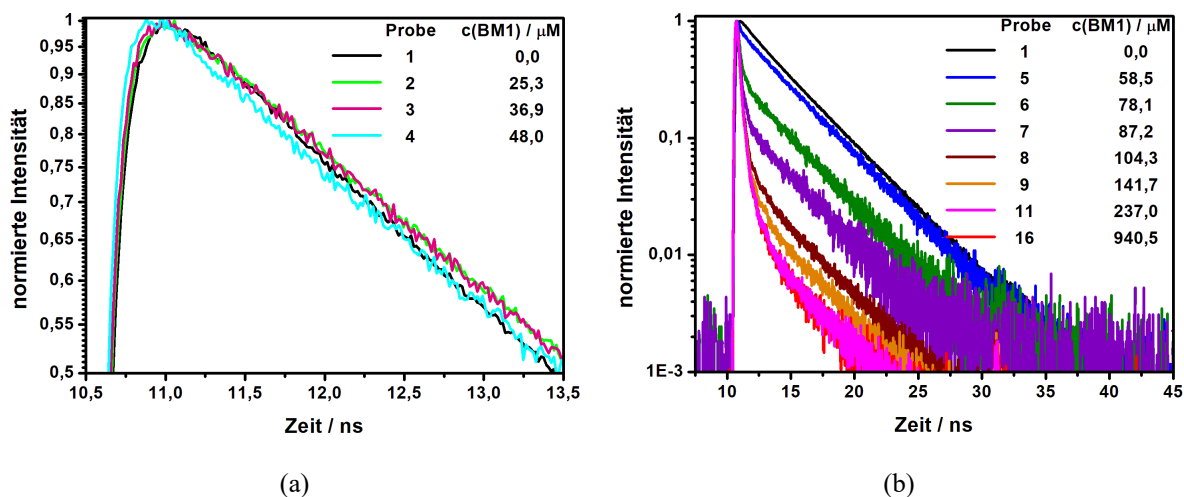


Abbildung 23: Fluoreszenzzerfälle der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C, welche im Rahmen der spektroskopischen Titrierung mit BM1 aufgenommen wurden. Teilabbildung (a) zeigt die zu Beginn der Titrierreihe (Proben 2 und 3) beobachtete Verlangsamung des Fluoreszenzabklingverhaltens, ehe mit Probe 4 eine leichte Beschleunigung einsetzt. Das Ausmaß der Beschleunigung korreliert sodann stark mit der Konzentration von BM1, bis schließlich ab Probe 11 eine weitere Erhöhung der Inhibitorkonzentration keine zusätzliche Beschleunigung des Fluoreszenzzerfalles induziert (b). Die zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven verwendeten Messparameter können Tabelle 12 entnommen werden. Tabelle 14 liefert einen Überblick über die Konzentrationen des Enzyms sowie des Liganden BM1, welche an den einzelnen Titrationen in der Präzisionsküvette vorlagen.

Um aus den spektroskopischen Titrierkurven aussagekräftige Interaktionsparameter, wie beispielsweise die Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor-Komplexe, extrahieren zu können, ist es zwingend notwendig, die Beziehung zwischen den beobachteten Änderungen der photophysikalischen Parameter und dem Grad der Bindung zu bestimmen [318]. Hierfür muss u. a. bekannt sein, wie viele Komponenten im untersuchten System vorliegen. So muss im Falle eines einfachen Zweikomponentensystems (freies Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex) zur Bestimmung des Bindungsgrades der relative Anteil des Enzym-Inhibitor-Komplexes an der gesamten Enzymmenge aus den aufgenommenen Daten bestimmt werden [37]. Dies kann durch Anpassung der aufgenommenen Spektren oder Zerfälle mit einem Zweikomponentenmodell erreicht werden [37]. Aus einer solchen Anpassung ergeben sich unmittelbar die Intensitätsanteile der beiden Spezies. Diese Intensitätsanteile wiederum können in die relativen Anteile der beiden Komponenten übersetzt werden, sofern die relativen Helligkeiten beider Spezies bekannt sind. Durch Auftragung des Bindungsgrades gegen die jeweilige Konzentration des Liganden und anschließende Anpassung der resultierenden Bindungskurve mit einem Eins-zu-Eins-Bindungsmodell kann schließlich die Dissoziationskonstante des entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes bestimmt werden [37, 314]. Im vorliegenden Fall konnten die Daten allerdings wider Erwarten nicht mit einem Zweikomponentenmodell angepasst werden, da aufgrund der zunächst beobachteten und nicht verstandenen Blauverschiebung der Spektren (siehe Abbildung 22) sowie der anfänglichen Verlangsamung des Fluoreszenzabklingverhaltens (siehe Abbildung 23 (a) und Abbildung A. 3 (a), Anhang) davon ausgegangen werden muss, dass mindestens drei Komponenten zu berücksichtigen sind. Ohne fundiertes Wissen über die

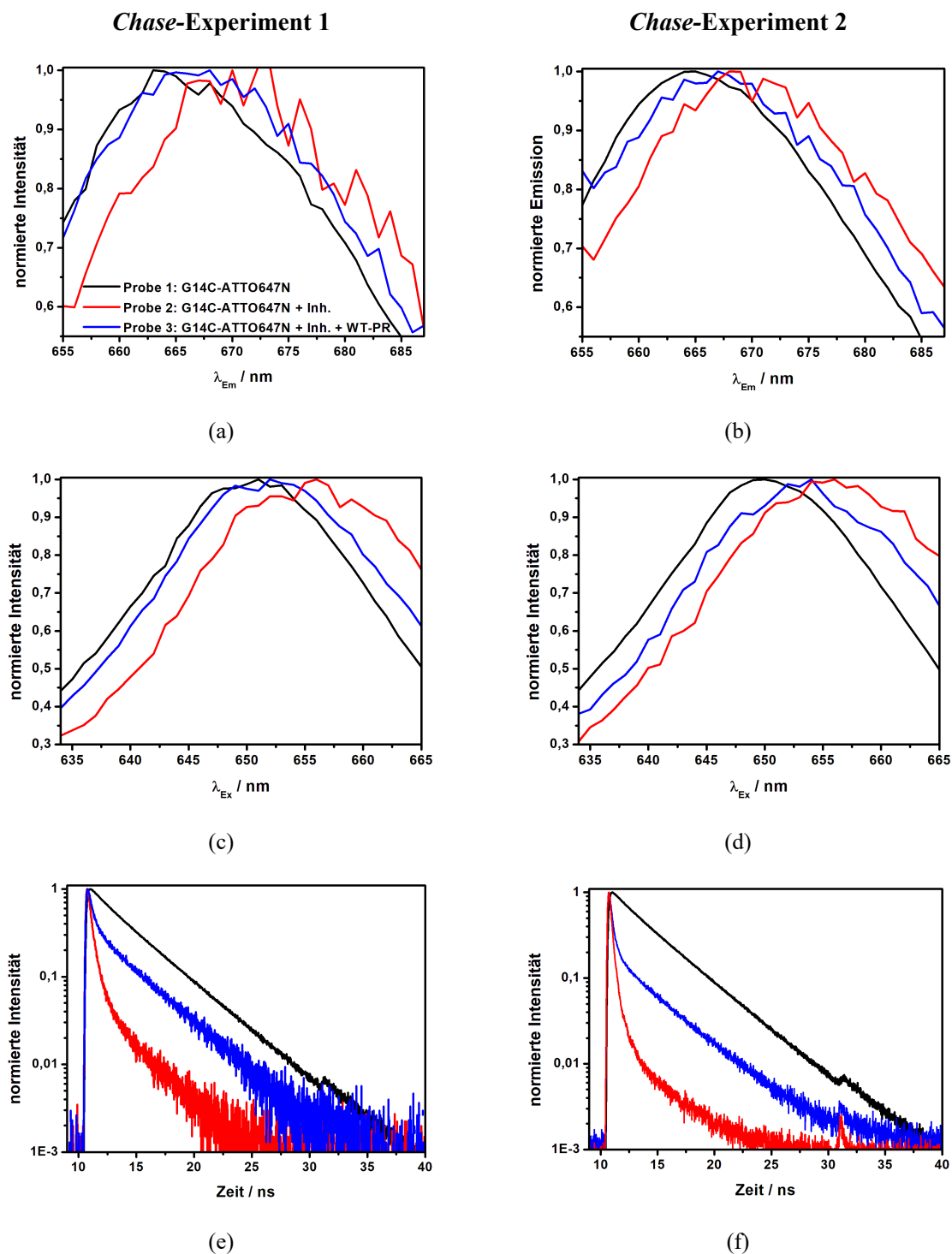


Abbildung 24: Ergebnisse der *Chase-Experimente* zur Untersuchung der Reversibilität der Interaktion zwischen der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C und den beiden Inhibitoren HWu180 (*Chase-Experiment 1*) bzw. BM1 (*Chase-Experiment 2*). Dargestellt sind die normierten Emissions- (a, b) und Anregungsspektren (c, d) sowie die normierten Fluoreszenzzerfälle (e, f) jeweils vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe des entsprechenden Inhibitors sowie nach Zusatz eines Überschusses der nicht-markierten WT-PR (blau). Die zur Durchführung der Ensemblemessungen verwendeten Messparameter können Tabelle 10 (*Chase-Experiment 1*) bzw. Tabelle 12 (*Chase-Experiment 2*) entnommen werden. Tabelle 15 liefert einen Überblick über die Konzentrationen der unterschiedlichen Komponenten, welche während beider *Chase-Experimente* in der Präzisionsküvette vorlagen.

tatsächliche Anzahl der vorliegenden Spezies und in Ermangelung eines grundlegenden Verständnisses für das initiale Auftreten der hypsochromen Verschiebung sowie der verlangsamten

4 Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungswechselwirkungen

Fluoreszenzzerfälle, wurde darauf verzichtet, die Daten mit einem zweifelhaften Dreikomponentenmodell anzupassen. Ferner kam erschwerend hinzu, dass die relativen Helligkeiten von Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex nicht abgeschätzt werden konnten, sodass selbst nach Anpassung mit einem hypothetischen Mehrkomponentenmodell, die hieraus erhaltenen Intensitätsanteile der unterschiedlichen Spezies nicht in die entsprechenden, relativen Anteile der jeweiligen Komponenten überführt werden könnten. Ursache hierfür ist, dass nicht differenzierbar war, welcher Anteil der Fluoreszenzlöschung des am Protein befindlichen Fluorophors auf eine spezifische Bindung der Inhibitoren an das Enzym zurückzuführen ist und welchen Beitrag die Komplexbildung zwischen ATTO 647N und Ligand zur Intensitätsabnahme leistet (siehe Kapitel 4.1.1).

4.1.3 Chase-Experiment

Zum Abschluss der Untersuchungen an den einfach farbstoffmarkierten DENV-2-PRs wurde die Reversibilität der Bindungswechselwirkungen zwischen der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C und den beiden allosterischen Inhibitoren BM1 und HWu180 mithilfe zweier Chase-Experimente überprüft [37]. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung dieser Untersuchungen kann dem Unterabschnitt „Chase-Experiment“ des Kapitels 3.4.1.1 entnommen werden.

Abbildung 24 stellt die Resultate der Ensemblesmessungen, welche im Rahmen beider Chase-Experimente durchgeführt wurden, zusammenfassend dar. Es ist unmittelbar ersichtlich, dass die Zugabe der nicht-markierten WT-PR zu den bereits vorgebildeten Enzym-Inhibitor-Komplexen ein deutliches „Zurückschieben“ der infolge der Ligandenzugabe beobachteten Änderungen der photophysikalischen Charakteristika auslöst. Diese Beobachtungen sind kompatibel mit der Interpretation, dass ein Teil des farbstoffmarkierten Enzyms durch die Zugabe des nicht-markierten Konkurrenten aus den präformierten Komplexen verdrängt wird [37]. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung zwischen Enzym und beiden Inhibitoren reversibler Natur ist. Dies ist kompatibel mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, dass es sich sowohl bei BM1 [305] als auch im Falle von HWu180 [303] um reversible, allosterische Inhibitoren der DENV-2-PR handelt.

4.2 WT-PR und markierte Liganden: FCS-Bindestudien

Als alternative Herangehensweise zur Untersuchung der Bindungswechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand wurden die in Kapitel 3.4.1.2 beschriebenen FCS-Bindestudien an den frei in Lösung diffundierenden, farbstoffmarkierten allosterischen Inhibitoren AG124 (FCS-Bindestudie 1) und HM076 (FCS-Bindestudie 2) durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurden sowohl AG124 als auch HM076 jeweils gegen den nicht-markierten Wildtypen der DENV-2-PR titriert. Jeder Titrationspunkt wurde durch eine FCS-Messung mit anschließender Berechnung einer Autokorrelationsfunktion charakterisiert.

Wie der linken Hälfte von Abbildung 25 entnommen werden kann, beginnt die Autokorrelationsfunktion von AG124 im Enzymkonzentrationsbereich zwischen 1,0 μM (Probe 2) und 7,8 μM (Probe 3) im Vergleich zur entsprechenden Autokorrelationsfunktion, welche in Abwesenheit der nicht-markierten WT-PR (Probe 1) aufgenommen wurde, signifikant langsamer auf null abzufallen. Durch eine weitere Erhöhung der WT-PR-Konzentration auf 77,9 μM (Probe 4) wird eine zunehmende Entschleunigung des Zerfalls der Autokorrelation induziert. Da die beobachtete Verschiebung der Autokorrelationsfunktion von AG124 mit der Konzentration der zugesetzten WT-PR korreliert, erscheint es plausibel, dass diese durch eine Interaktion des farbstoffmarkierten Inhibitors mit der WT-PR hervorgerufen wird. Dahingegen kann im Falle des farbstoffmarkierten Liganden HM076 erst mit Probe 4 ($c(\text{WT-PR}) = 89,3 \mu\text{M}$)

4.2 WT-PR und markierte Liganden: FCS-Bindestudien

eine signifikante Wechselwirkung zwischen Enzym und Ligand in der Korrelationsfunktion detektiert werden (siehe rechte Hälfte von Abbildung 25).

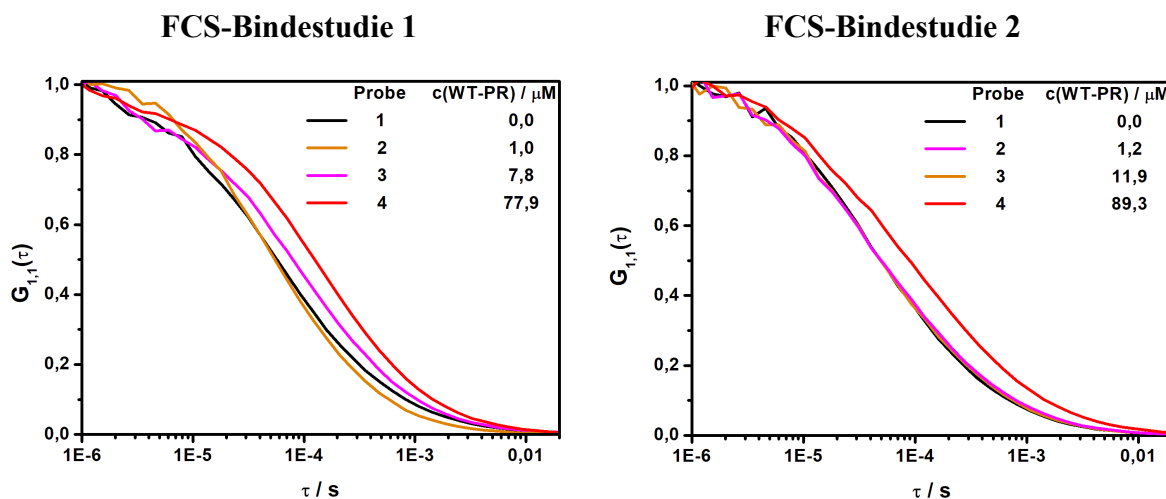


Abbildung 25: Normierte Autokorrelationsfunktionen $G_{1,1}(\tau)$ der farbstoffmarkierten Liganden AG124 (FCS-Bindestudie 1) und HM076 (FCS-Bindestudie 2) in Abwesenheit (Probe 1) sowie in Anwesenheit steigender Konzentrationen der nicht-markierten WT-PR (Proben 2 bis 4). Die Messparameter, welche zur Durchführung der FCS-Experimente Verwendung fanden, können Tabelle 17 entnommen werden. Tabelle 18 liefert einen Überblick über die Konzentrationen der farbstoffmarkierten Liganden und der nicht-markierten WT-PR, welche während der beiden FCS-Bindestudien an den einzelnen Titrationspunkten in den Probenzellen vorlagen.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Verschiebungen der Autokorrelationsfunktionen beider farbstoffmarkierter Inhibitoren tatsächlich auf eine spezifische Bindung der Liganden an die WT-PR zurückzuführen sind, wurden zusätzlich Kontrollexperimente durchgeführt. Mit diesen sollte insbesondere eine direkte Wechselwirkung des jeweilig am Liganden befindlichen Fluoreszenzmarkers mit der WT-PR ausgeschlossen werden. Daher wurden FCS-Bindestudien an den frei in Lösung diffundierenden Farbstoffen ATTO 488 und Cy5 jeweils vor und nach Zugabe der nicht-markierten WT-PR durchgeführt. Als wesentliches Resultat dieser Kontrollmessungen konnte festgestellt werden, dass auch die beiden freien Farbstoffe am Enzym haften (siehe Abbildung A. 4, Anhang). Insbesondere setzt die Interaktion zwischen dem jeweiligen Fluorophor und dem WT der DENV-2-PR bei ähnlichen Enzymkonzentrationen, bei welchen zuvor die Wechselwirkung zwischen dem jeweils korrespondierenden farbstoffmarkierten Liganden und der WT-PR einsetzte, ein. Folglich ist nicht differenzierbar, welcher Anteil der Verschiebung der Autokorrelationsfunktion der farbstoffmarkierten Liganden durch eine spezifische Bindung der Inhibitoren an das Protein induziert wird und welchen Beitrag unspezifische Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Enzym zur Korrelationsverschiebung leisten. Daher ist eine tiefere Auswertung der in Abbildung 25 gezeigten Daten nicht möglich, sodass weder AG124 noch HM076 zur Durchführung aussagekräftiger FCS-Bindestudien geeignet sind.

5 Untersuchung der Proteindynamik

Mit der Absicht zu einem besseren Verständnis der Proteindynamik beizutragen, wurde in der vorliegenden Arbeit u. a. untersucht, ob und wie sich in Lösung unterschiedliche Konformationen des Enzyms im Gleichgewicht befinden. Weiterhin wurde der Einfluss eines kompetitiven und eines allosterischen Inhibitors sowie zweier Substrate auf das konformationelle Gleichgewicht analysiert. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden verschiedene konfokale Fluoreszenzmessungen sowohl an frei diffundierenden als auch an immobilisierten FRET-Paar markierten DENV-2-PRs durchgeführt. In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die Resultate dieser Untersuchungen präsentiert und diskutiert.

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

Zunächst sollte geklärt werden, ob in Lösung ein Gleichgewicht zwischen mehreren Konformationen der DENV-2-PR vorliegt und inwiefern ein solches Konformationsgleichgewicht durch die Anwesenheit unterschiedlicher Liganden beeinflusst wird. Hierzu wurden konfokale Fluoreszenzmessungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Doppelmutanten des Enzyms aus Tabelle 5, jeweils vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden, durchgeführt. Aus den erhaltenen Datensätze wurden sowohl FCS-FRET- als auch smFRET-Informationen extrahiert. Um zu eruieren, ob die im Einzelmolekülexperiment beobachteten Effekte, welche durch die Zugabe der unterschiedlichen Liganden induziert wurden, auch auf Ensemble-Ebene nachgewiesen werden können, wurde ergänzend zu den vorstehend genannten Messungen, jedes der betrachteten Probensysteme mittels eines zeitaufgelösten Ensembleexperimentes untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen werden im Anhang A.2.3 dargestellt und mit den Resultaten der smFRET-Messungen verglichen. Auch wurden die jeweiligen Proteinkonstrukte im Vorfeld der Einzelmolekülexperimente durch die Aufnahme von Ensemblepektren spektroskopisch charakterisiert (siehe A.2.2, Anhang).

In einem ersten Schritt sollte zunächst evaluiert werden, ob die gewählte Mess- und Auswertemethodik, welche in Kapitel 3.4.2.1 ausführlich vorgestellt wurde, prinzipiell geeignet ist, um die zu Beginn dieses Abschnittes skizzierten Fragestellungen zu adressieren. Hierzu wurden entsprechende Referenzmessungen an einer Mischung aus den beiden in Kapitel 3.1.5 vorgestellten statischen DNA-Doppelstrang-Proben dsDNA-1 und dsDNA-2 angestellt. Im ersten Abschnitt des vorliegenden Unterkapitels werden zunächst die Ergebnisse dieser Referenzmessungen vorgestellt, ehe im zweiten Teil dieses Unterkapitels die Resultate der Messungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten DENV-2-PRs dargelegt werden. Die experimentelle Realisierung der einzelnen Versuche wurde in den entsprechenden Abschnitten des Kapitels 3.4.2.1 skizziert.

5.1.1 FRET-Paar markierte dsDNA als Referenzsystem

Nach Aufnahme der farb- und zeitaufgelösten Fluoreszenzintensitätszeitspuren der dsDNA-Doppelstrang-Probenmischung wurden die im Donor- und Akzeptor-Kanal aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäten auto- und kreuzkorreliert (FCS-FRET). Abbildung 26 (a) zeigt die entsprechenden Korrelationsfunktionen. Es fällt auf, dass die Kreuzkorrelationsfunktion $G_{A,D}(\tau)$ das gleiche Abklingverhalten wie die Akzeptor-Autokorrelationsfunktion $G_{A,A}(\tau)$ zeigt. Im Vergleich hierzu fällt die Donor-Autokorrelation $G_{D,D}(\tau)$ schneller auf null ab. Wie im Theorieteil skizziert, sollte die Kreuzkorrelationsfunktion bei Vorliegen eines Konformationsaustausches langsamer auf null abfallen als beide Autokorrelationen [73]. Dahingegen wird erwartet, dass $G_{A,D}(\tau)$ in Abwesenheit eines solchen Austausches zwischen $G_{A,A}(\tau)$ und $G_{D,D}(\tau)$ zu liegen kommt, sofern die Beobachtungsvolumina beider Detektionskanäle verschieden sind [234]. Andernfalls – also im Falle identischer Detektionsvolumina und in Abwesenheit einer Konformationsdynamik – sollten sämtliche Korrelationsfunktionen bei vernachlässigbarer Triplett-Kinetik ununterscheidbar sein [73]. Demnach erlaubt der Vergleich der Korrelationsfunktionen hier keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich des Vorliegens oder der Abwesenheit einer intramolekularen Dynamik. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass das gemessene Donor-Signal im Wesentlichen eine Überlagerung von mindestens zwei Signalen darstellt. Neben der gewünschten Donor-Fluoreszenz der FRET-Paar-markierten DNA-Doppelstränge, tragen kleine, vergleichsweise schnell diffundierende, fluoreszierende Verunreinigungen im verwendeten Tris-EDTA-Puffer zu dem im Donor-Kanal gemessenen Signal bei (siehe hierzu folgenden Abschnitt) und bedingen ein beschleunigtes Abklingverhalten der Donor-Autokorrelationsfunktion. Da sich die untersuchte Probe aus einer Mischung zweier statischer DNA-Proben, welche keiner intramolekularen Dynamik unterliegen, zusammensetzt, wurde unter der Voraussetzung idealer Bedingungen erwartet, dass die Kreuzkorrelationsfunktion zwischen beiden Autokorrelationen bzw. deckungsgleich mit diesen verläuft.

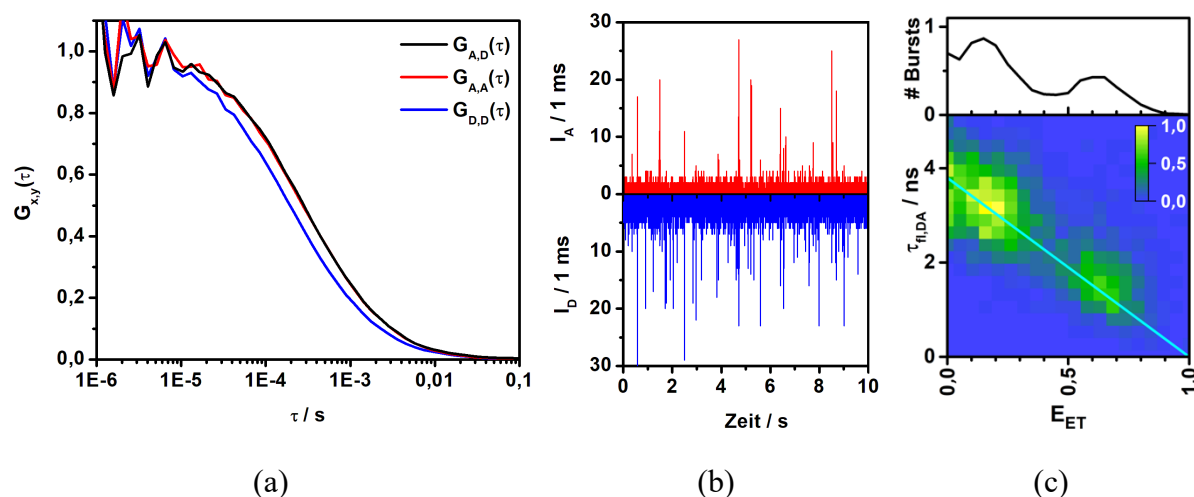


Abbildung 26: Ergebnisse der Messungen an der dsDNA-Probenmischung. (a) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve) der Probenmischung. (b) Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren der DNA-Doppelstrang-Probenmischung. Dargestellt sind die Zeitspur der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A (oberer Graph) sowie der Donor-Fluoreszenzintensität I_D (unterer Graph). Die Zeitauflösung beträgt jeweils 1 ms. (c) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts (einzelne Moleküle), welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der dsDNA-Probenmischung aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fi,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Die cyan-blaue Gerade repräsentiert die statische FRET-Linie. Das normierte 1D-Histogramm über die vorkommenden FRET-Effizienzen wird als Projektion oberhalb des 2D-Histogramms dargestellt.

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

Nun wurden die aufgenommenen Photonenströme auf Einzelmolekülebene (smFRET) betrachtet. Hierzu wurden zunächst aus den Makroankunftszeiten der einzelnen Photonen die Zeitspuren der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität mit einer Zeitauflösung von 1 ms berechnet. In Abbildung 26 (b) ist ein Ausschnitt beider Intensitäts-Zeitspuren dargestellt. Hierbei ist deutlich ersichtlich, dass im Donor-Kanal wesentlich mehr Bursts als im Akzeptor-Kanal auftreten. Um die Ursache dieser Diskrepanz zu beleuchten, wurde in Ergänzung zu den in diesem Abschnitt beschriebenen Messungen ein Absorptionsspektrum einer 1:1-Mischung der beiden FRET-Paar markierten DNA-Doppelstrang-Proben aufgenommen (siehe Abbildung A. 5, Anhang). Als wesentliches Resultat dieser Kontrollmessung konnte festgestellt werden, dass tendenziell der Akzeptor-Farbstoff ATTO 647N in einem leichten Überschuss vorliegt. Folglich liegt der Verdacht nahe, dass das im Donor-Kanal detektierte Signal zu einem signifikanten Anteil auf kleine, fluoreszierende Verunreinigungen zurückzuführen ist. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Akzeptor-Only-Spezies bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm nicht beobachtbar ist.

Nun wurden die erhaltenen Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren entsprechend der Ausführungen in Kapitel 3.4.2.1 einer Burst-Analyse unterzogen. Um die im vorstehenden Abschnitt erwähnten fluoreszierenden Verunreinigungen hierbei weitestgehend auszublenden, wurden lediglich Fluoreszenzbursts, welche in Summe auf beiden APDs mindestens 30 Zählereignisse zeigten, berücksichtigt. Der untere Teil von Abbildung 26 (c) zeigt das 2D-Histogramm, welches aus der Burst-Analyse erhalten wurde. Zunächst ist anzumerken, dass jene Population, welche eine Energietransfereffizienz von null aufweist, vermutlich auf Probenmoleküle zurückzuführen ist, die lediglich mit dem Donor-Farbstoff ATTO 488 ausgestattet sind, sodass ein Energieübertrag nicht stattfinden kann. Folgerichtig weist diese Population im Vergleich mit sämtlichen weiteren Populationen eine signifikant längere Donor-Lebensdauer auf. Auch ist denkbar, dass die diskutierten fluoreszierenden Verunreinigungen, sofern sie mindestens 30 Zählereignisse aufweisen, anteilig zu dieser Population beitragen. Neben der diskutierten Donor-Only-Spezies können erwartungsgemäß zwei deutlich distinkte Subpopulationen aufgelöst werden. Diese sind den beiden in der Mischung vorliegenden statischen DNA-Doppelstrang-Proben dsDNA-1 und dsDNA-2, die sich merklich in ihrer Energietransfereffizienz unterscheiden (siehe Kapitel 3.1.5), zuzuordnen. Theoretisch wird jedoch erwartet, dass die FRET-Effizienzen der beiden Referenzproben 44 % (dsDNA-1) respektive 94 % (dsDNA-2) betragen sollten. Tatsächlich werden allerdings Maxima bei Energietransfereffizienzen von ca. 15 % sowie 62 % beobachtet (siehe 1D-Histogramm im oberen Teil von Abbildung 26 (c)). Es ist davon auszugehen, dass diese beträchtliche Divergenz zwischen Theorie und experimentellem Resultat maßgeblich durch zwei Faktoren, welche eine quantitative Interpretation der Daten erschweren, hervorgerufen wird. Zum einen muss zur Berechnung der Energietransfereffizienz mithilfe von Gleichung (43) der Korrekturfaktor γ bekannt sein. Dieser berücksichtigt gemäß Gleichung (21) Diskrepanzen in den Fluoreszenzquantenausbeuten von Donor- und Akzeptor-Farbstoff sowie die unterschiedlichen Detektionseffizienzen des verwendeten Mikroskops gegenüber Donor- und Akzeptor-Emission. Die beiden Detektionseffizienzen wurden hierbei mithilfe der Kenndaten der optischen Komponenten des Mikroskops, welche seitens des jeweiligen Herstellers bekannt gegeben wurden, abgeschätzt. Auch die Quantenausbeuten von Donor und Akzeptor wurden mit den jeweiligen Herstellerangaben, welche in Tabelle 1 aufgeführt werden, approximiert. Der derart bestimmte Korrekturfaktor wurde jedoch nicht experimentell validiert und birgt daher eine potentielle Fehlerquelle. Weitere Unsicherheiten ergeben sich zum anderen aus der Berechnung der theoretischen FRET-Effizienzen der beiden DNA-Proben. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass der interchromophore Abstand R_{DA} , welcher zur Kalkulation der Energietransfereffizienz gemäß Gleichung (19) erforderlich ist, mit dem Abstand r zwischen den jeweils farbstoffmarkierten Nukleotiden approximiert wurde. Der tatsächliche Abstand R_{DA} zwischen Donor- und Akzeptor-Farbstoff kann hiervon jedoch, aufgrund der räumlichen Abmessungen der Farbstoffe sowie aufgrund der Linker-Gruppen, über welche die Fluorophore

5 Untersuchung der Proteindynamik

an die entsprechenden Nukleotide gebunden sind, abweichen. Diese beiden vorstehend beschriebenen, nur abgeschätzten Faktoren sind auch im Falle sämtlicher nachfolgend diskutierten Systeme zu berücksichtigen.

Während der Vergleich der Korrelationsfunktionen kein eindeutiges Bild hinsichtlich der An- oder Abwesenheit einer Konformationsdynamik ergab, lässt die Burst-Analyse diesbezüglich wenig Interpretationsspielraum zu. So kommen sämtliche FRET-Populationen, welche im 2D-Histogramm beobachtet werden, auf der statischen FRET-Linie zu liegen (siehe unterer Teil von Abbildung 26 (c)). Hieraus kann unmittelbar geschlussfolgert werden, dass beide dsDNA-Proben keiner intramolekularen Dynamik unterliegen [74, 75]. Dies wiederum entspricht den theoretischen Erwartungen, da beide DNA-Doppelstrang-Proben statische Systeme darstellen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der y-Achsenabschnitt der statischen FRET-Linie, sowohl im vorliegend diskutierten Falle als auch im Falle aller nachfolgend beschriebenen Systeme, durch die mittlere Lebenszeit der Donor-Only-Spezies gegeben ist.

5.1.2 FRET-Paar markierte PRs vor und nach Zugabe diverser Liganden

Nachdem mithilfe der im vorstehenden Unterkapitel präsentierten Referenzmessungen verifiziert werden konnte, dass die gewählte Mess- und Auswertemethodik prinzipiell geeignet ist, um unterschiedliche FRET-Subpopulationen aufzulösen, wurden entsprechende Messungen an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR (siehe Tabelle 5) durchgeführt.

5.1.2.1 S79C-G14C

Hierbei wurde zunächst die mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierte Doppelmutante S79C-G14C vor und nach Zugabe unterschiedlicher Liganden vermessen.

Vor und nach Zugabe von mb43

Abbildung 27 (a) zeigt die normierten Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen von S79C-G14C jeweils vor und nach Zugabe eines ca. 250 000-fachen Überschusses des kompetitiven Inhibitors mb43. In beiden Fällen fällt die Kreuzkorrelationsfunktion $G_{A,D}(\tau)$ auf der gleichen Zeitskala wie die Akzeptor-Autokorrelationsfunktion $G_{A,A}(\tau)$ auf null ab. Dahingegen zeigt die Donor-Autokorrelation $G_{D,D}(\tau)$ jeweils ein signifikant schnelleres Abklingverhalten. Folglich kann aus den Korrelationsdaten erneut keine eindeutige Schlussfolgerung hinsichtlich des Vorliegens oder der Abwesenheit einer Proteindynamik gezogen werden. Ursache hierfür könnte sein, dass die G14C-Punktmutante in einem flexiblen Teilbereich des Enzyms lokalisiert ist [52], sodass ein potentieller Konformationsaustausch durch die resultierende Flexibilität des G14-Restes überlagert wird. In diesem Kontext sei darauf hingewiesen, dass der Donor-Autokorrelationsfunktion grundsätzlich keine übermäßige Bedeutung beigemessen werden sollte. Hintergrund hierfür ist, dass ein wesentlicher Anteil des im Donor-Kanal detektierten Signals auf kleine, vergleichsweise schnell diffundierende, fluoreszierende Kontaminationen im jeweils verwendeten Assay-Puffer sowie auf eine stark ausgeprägte Donor-Only-Spezies (siehe hierzu folgenden Abschnitt) zurückzuführen ist.

Im nächsten Schritt und in Vorbereitung auf die Burst-Analyse wurden aus den Makroankunftszeiten der einzelnen Photonen die Zeitspuren der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität, jeweils mit einer Zeitauflösung von 1 ms, berechnet. In Abbildung 27 (b) ist ein Ausschnitt beider Intensitäts-Zeitspuren vor Zugabe von mb43 dargestellt. Augenscheinlich treten im Donor-Kanal wesentlich mehr Bursts als im Akzeptor-Kanal auf. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ensemblespektren der FRET-Paar markierten S79C-G14C-Doppelmutante (siehe Abbildung A. 6 (a) und (b), Anhang) und kann neben den zuvor erwähnten fluoreszierenden

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

Verunreinigungen zu einem signifikanten Anteil auf das Vorliegen einer ausgeprägten Donor-Only-Population zurückgeführt werden. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Akzeptor-Only-Spezies bei der gewählten Anregungswellenlänge von 502 nm nicht beobachtbar ist.

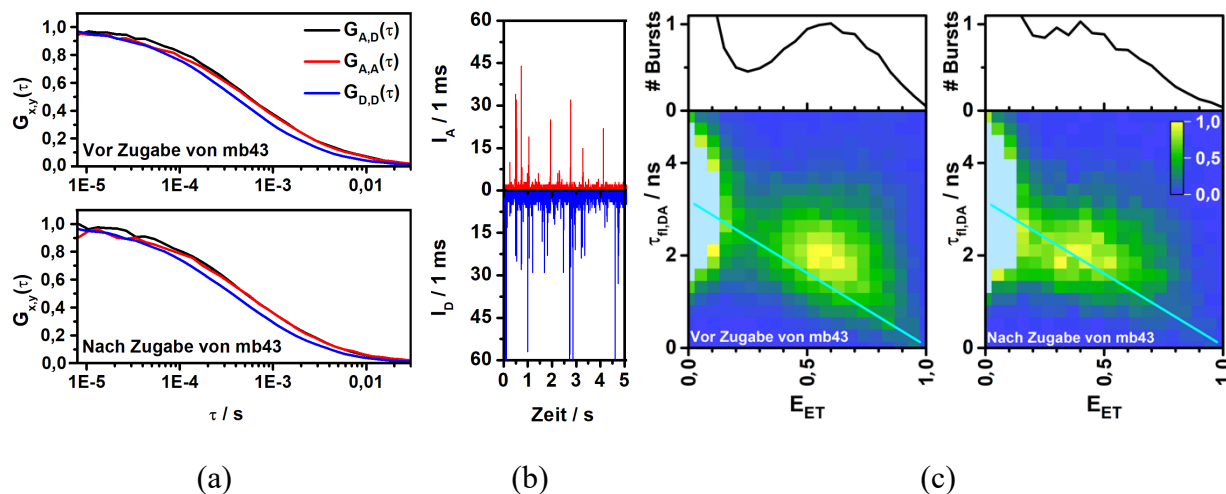


Abbildung 27: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-G14C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 250 000-fachen Überschusses von mb43. (a) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43. (b) Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren vor Zugabe von mb43. Dargestellt sind die Zeitspur der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A (oberer Graph) sowie der Donor-Fluoreszenzintensität I_D (unterer Graph). Die Zeitauflösung beträgt jeweils 1 ms. (c) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von mb43 aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe des kompetitiven Inhibitors leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Wenngleich die Korrelationsanalyse der aufgenommenen Daten keine Rückschlüsse bezüglich der An- oder Abwesenheit einer intramolekularen Proteindynamik zuließ, so liefert die Burst-Analyse ebendieser Daten einige Hinweise auf die Präsenz einer konformationellen Dynamik, welche durch die Anwesenheit von mb43 beeinflusst wird. Der untere Teil von Abbildung 27 (c) zeigt die 2D-Histogramme, welche aus der Burst-Analyse der Intensitätszeitspuren vor und nach Zugabe von mb43 erhalten wurden. In beiden Fällen wird neben einer stark ausgeprägten Donor-Only-Spezies lediglich eine breite, nahezu symmetrische Punktwolke beobachtet. Demnach können weder vor noch nach Zugabe des Liganden distinkte FRET-Subpopulationen aufgelöst werden. Diese Beobachtung kann auf vielfältige Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen ist denkbar, dass das Enzym keine signifikant verschiedenen Konformationen aufweist. Zum anderen erscheint es möglich, dass die Flexibilität der G14C-Punktmutante eine „Verschmierung“ möglicher konformationeller Subpopulationen zur Folge haben könnte [52]. Auch ist vorstellbar, dass sich eventuell vorhandene Unterpopulationen des Enzyms im Vergleich zur zeitlichen Auflösung des Versuchs (Transitzeit durch den Fokus $\sim 0,2$ ms) schnell ineinander umwandeln, sodass lediglich eine Mittelung über verschiedene Konformationen beobachtet werden kann. Auffällig ist jedoch, dass die beobachtete Punktwolke vor Zugabe des Inhibitors im Vergleich zur statischen FRET-Linie deutlich in Richtung größerer Donor-Fluoreszenzlebensdauern verschoben ist. Dieser Befund deutet auf Konformationsübergänge, wel-

che auf der Zeitskala der Transitzeit des Enzyms durch das Fokusvolumen stattfinden, hin [74, 75]. Infolge der Zugabe von mb43 verschiebt sich die Punktwolke vertikal nach unten und somit in Richtung der statischen FRET-Linie. Diese Beobachtung ist mit dem Bild einer reduzierten konformationellen Dynamik kompatibel [74, 75]. Zugleich wandert die Punktwolke in horizontaler Richtung zu kleineren Energietransfereffizienzen (siehe 1D-Histogramme im oberen Teil von Abbildung 27 (c)), was gemäß Tabelle 5 auf eine zunehmende Population der geschlossenen Konformation der PR schließen lässt. So kommt der Schwerpunkt der Punktwolke vor Zugabe des Inhibitors bei einer Energietransfereffizienz von ca. 60 % zu liegen, wohingegen der Zusatz von mb43 eine Verschiebung des Schwerpunkts der FRET-Effizienz-Verteilung in den Bereich zwischen 25 % und 45 % auslöst.

Auch wenn im konkreten Fall keine unterschiedlichen FRET-Subpopulationen aufgelöst werden konnten, so stützen die Resultate der Burst-Analyse dennoch die Annahme, dass in Abwesenheit eines jeglichen Liganden ein dynamischer Austausch zwischen unterschiedlichen Konformationen der PR stattfindet. Ferner scheint die Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43, gemäß den theoretischen Erwartungen [27, 59, 62, 145], den geschlossenen Zustand des Enzyms zu stabilisieren und damit eine signifikante Reduktion der Proteindynamik auszulösen. Abschließend sei zur Vollständigkeit erwähnt, dass die im smFRET-Experiment beobachtete Stabilisierung der geschlossenen Konformation in den ergänzend durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimenten nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A. 7 (a), Anhang). Allerdings sollte den Ergebnissen der Ensembleuntersuchungen keine übermäßige Bedeutung beigemessen werden, da sowohl im Falle des hier sowie aller nachfolgend diskutierten Probensysteme unterschiedlichste Störsignale (bspw. Akzeptor- sowie Donor-Only-Spezies, Raman-Streuung, fluoreszierende Verunreinigungen des Puffers und des zugesetzten Liganden) die Messungen im Ensemble beeinträchtigen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die zur Durchführung der Ensembleexperimente eingesetzte Konzentration des kompetitiven Inhibitors im Vergleich zur Inhibitor-Konzentration, welche im Einzelmolekülexperiment Verwendung fand, um einen Faktor von ca. 9 größer gewählt wurde. Folglich leisten potentiell vorhandene lumineszierende Kontaminationen des Inhibitors einen größeren Beitrag zum Fluoreszenzsignal.

Vor und nach Zugabe von Substrat 1 bzw. Substrat 2

Wie in der Einleitung zu Kapitel 5 skizziert, sollte auch der Einfluss der beiden Substrate S1 und S2 auf das Konformationsgleichgewicht des Enzyms untersucht werden. Hierzu wurde die FRET-Paar markierte Doppelmutante S79C-G14C jeweils vor und nach Zugabe eines ca. 2,5-millionenfachen Überschusses von S1 bzw. S2 vermessen und zunächst die im Donor- sowie Akzeptor-Kanal aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäten auto- und kreuzkorreliert. Abbildung 28 zeigt die entsprechenden Korrelationsfunktionen. Erwartungsgemäß fällt erneut auf, dass die Korrelationsdaten vor Zugabe des jeweiligen Liganden keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich des Vorliegens oder der Abwesenheit einer intramolekularen Dynamik zulassen. Nach Zugabe von S1 wird jedoch beobachtet, dass die Kreuzkorrelation im Vergleich zur Akzeptor-Autokorrelation etwas schneller auf null abfällt. Wesentlich signifikanter wird dies durch Zugabe von S2, sodass $G_{A,D}(\tau)$ letztlich zwischen beiden Autokorrelationen zu liegen kommt. Diese Beobachtung ist mit dem Bild einer reduzierten konformationellen Dynamik kompatibel [52, 234] und könnte damit als Hinweis auf eine eventuell stattfindende Stabilisierung einer Konformation verstanden werden.

Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurden die Intensitätszeitspuren von S79C-G14C jeweils vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 einer Burst-Analyse unterzogen. Die hieraus erhaltenen 2D-Histogramme können dem jeweils unteren Teil von Abbildung 28 (c) bzw. (d) entnommen werden.

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

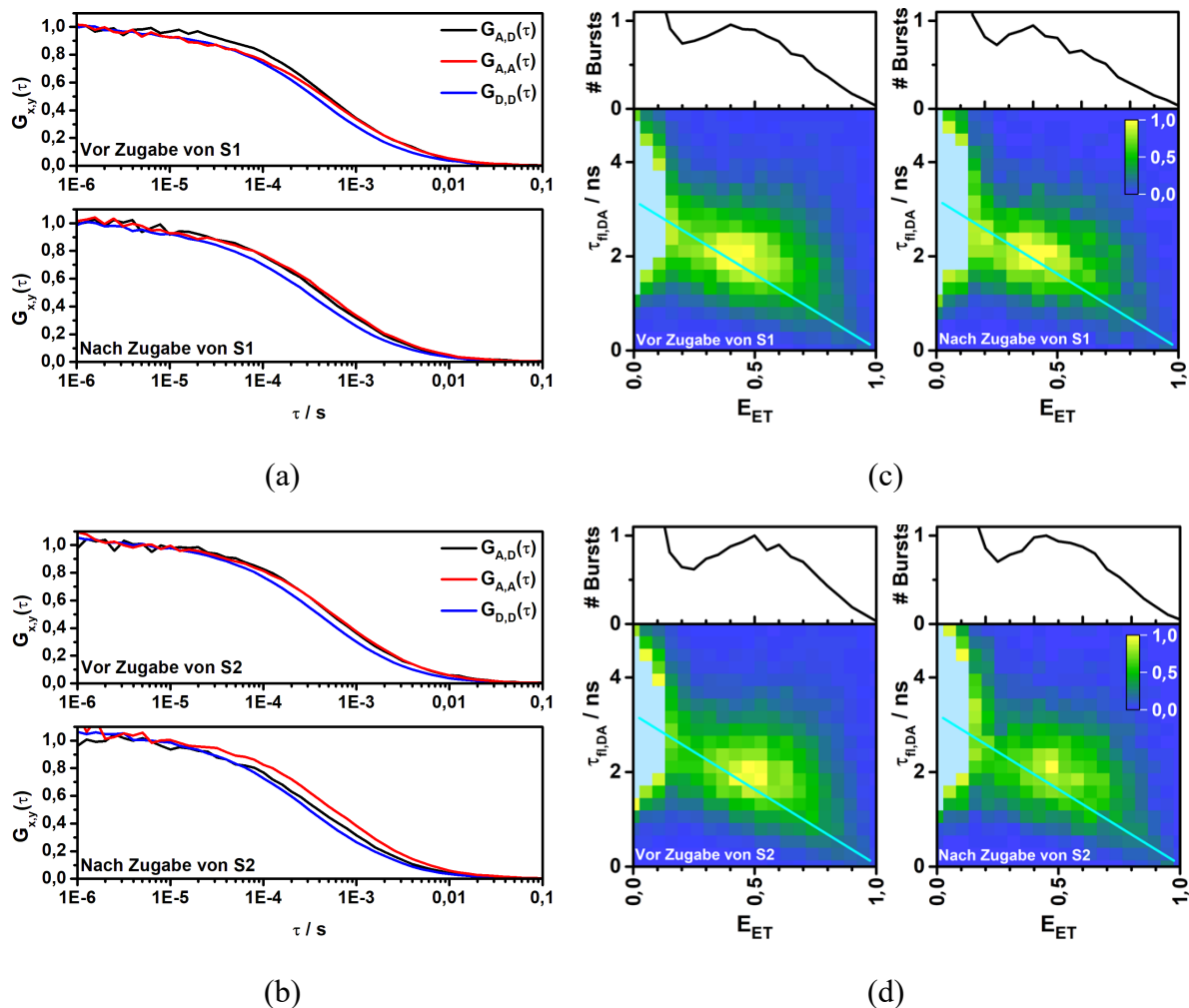


Abbildung 28: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-G14C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 2,5-millionenfachen Überschusses von S1 bzw. S2. (a, b) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe von S1 (a) bzw. S2 (b). (c, d) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von S1 (c) bzw. S2 (d) aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fL,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Erneut wird in allen Fällen neben einer deutlich ausgeprägten Donor-Only-Spezies lediglich eine breite, nahezu symmetrische Punktvolke beobachtet. Mögliche Ursachen hierfür wurden bereits im vorherigen Unterkapitel diskutiert. Die Zugabe beider Substrate induziert eine schwache Verschiebung des Schwerpunktes der jeweiligen Punktvolke um ca. 4 % in Richtung kleinerer Energietransfereffizienzen. Folglich ist anzunehmen, dass der jeweilige Ligand, gemäß den theoretischen Erwartungen [27, 29], den geschlossenen Zustand des Enzyms stabilisiert (siehe Tabelle 5). Allerdings ist die Stabilisierung der aktiven Konformation deutlich schwächer ausgeprägt als nach Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43 beobachtet. Ursächlich hierfür könnte sein, dass beide Substrate im aktiven Zentrum umgesetzt werden, demnach deutlich kürzer an das Enzym gebunden sind und dieses folglich weniger effizient in der aktiven

5 Untersuchung der Proteindynamik

Konformation fixieren können. Demnach würde auch die Proteindynamik weniger effizient reduziert werden. Damit wiederum wäre nachvollziehbar, wieso die aufgenommenen Daten auch nach Zugabe der beiden Substrate in Relation zur statischen FRET-Linie signifikant in Richtung größerer Donor-Fluoreszenzlebenszeiten versetzt sind [74, 75].

Zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass die infolge der Ligandenzugabe beobachtete Stabilisierung der geschlossenen Konformation mithilfe der zusätzlich durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimente bestätigt werden konnte (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A. 7 (b) und (c), Anhang).

5.1.2.2 S79C-S158C A

Um zu überprüfen, ob tatsächlich die Flexibilität der G14C-Punktmutation eine eindeutige Visualisierung unterschiedlicher Enzymkonformationen verhindert, wurde die vorstehend genannte Punktmutante durch die Punktmutation S158C, welche sich ebenfalls in der NS3-Domäne befindet, ersetzt. Die Aminosäure S158 ist innerhalb einer β -Schleife lokalisiert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass dieser Rest weniger flexibel sein sollte als die G14-Position [52]. Im Vergleich zur S79C-G14C-Doppelmutante bedingen Konformationsübergänge im Falle des S79C-S158C-Konstrukts invertierte Abstandsänderungen zwischen den Markierungspositionen, sodass nun gemäß Tabelle 5 der Wechsel in den geschlossenen Zustand mit einer Steigerung der Energietransfereffizienz einhergeht. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen an der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C A der DENV-2-PR präsentiert.

Vor und nach Zugabe von mb43

Abbildung 29 (a) zeigt die normierten Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen von S79C-S158C A jeweils vor und nach Zugabe eines ca. 200 000-fachen Überschusses des kompetitiven Inhibitors mb43. Auffällig ist, dass die Kreuzkorrelation in Abwesenheit von mb43 deutlich langsamer auf null abfällt als die beiden Autokorrelationsfunktionen. Diese Beobachtung kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass ein signifikanter Austausch zwischen verschiedenen Enzymkonformationen, welche sich in ihrer FRET-Effizienz unterscheiden, stattfindet [73, 218]. Bemerkenswerterweise liegt die Kreuzkorrelationsfunktion nach Zugabe des Liganden zwischen beiden Autokorrelationen. Daher ist davon auszugehen, dass der zugesetzte Inhibitor einen Zustand des Enzyms stabilisiert und somit die Konformationsdynamik blockiert bzw. effektiv reduziert [52, 234].

Der linke Teil von Abbildung 29 (b) zeigt das 2D-Histogramm, welches aus der Burst-Analyse der Intensitätszeitspuren vor Zugabe von mb43 erhalten wurde. Durch Vergleich mit den 2D-Histogrammen der S79C-G14C-Doppelmutante (siehe Kapitel 5.1.2.1) wird deutlich, dass sich die Form der Punktwolke in erheblichem Maße verändert hat. Die Punktwolke ist nun entlang der Abszisse signifikant elongiert, sodass eine wesentlich größere Bandbreite an Energietransfereffizienzen beobachtet wird. In Relation zur statischen FRET-Linie sind die Daten vertikal in Richtung größerer Donor-Fluoreszenzlebensdauern verschoben, was darauf hindeutet, dass das Protein während seines Transits durch das Beobachtungsvolumen zwischen unterschiedlichen Zuständen, die sich in ihren FRET-Effizienzen unterscheiden, schaltet [74, 75]. Wie dem rechten Teil von Abbildung 29 (b) entnommen werden kann, resultiert der Zusatz des kompetitiven Inhibitors schließlich in einer deutlichen Abnahme jener FRET-Populationen, welche im Bereich mittlerer Energietransfereffizienzen lokalisiert sind und entsprechend Tabelle 5 der offenen Konformation des Enzyms zugeordnet werden können. Gleichzeitig nimmt die relative Gewichtung der Bursts, die sich durch FRET-Effizienzen größer 90 % auszeichnen, und damit gemäß Tabelle 5 auf den geschlossenen Zustand der PR zurückzuführen sind, erheblich zu. Da die persistierende Population zudem in guter Näherung auf der statischen FRET-Linie lokalisiert ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Zugabe von mb43, gemäß den theoretischen

Erwartungen [27, 59, 62, 145], eine Stabilisierung des geschlossenen Zustands der PR und somit eine Reduktion der Proteindynamik hervorruft [74, 75].

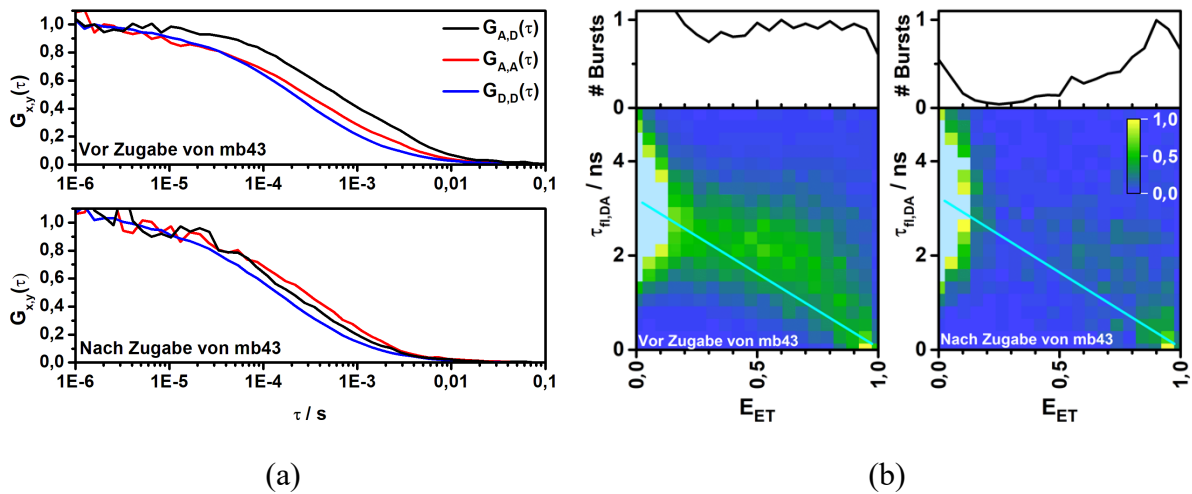


Abbildung 29: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 200 000-fachen Überschusses von mb43. (a) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43. (b) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von mb43 aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe des kompetitiven Inhibitors leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass sowohl die Burst- als auch die Korrelationsanalyse im Hinblick auf die Proteindynamik dieselben Schlussfolgerungen zulassen. Demnach herrscht in Lösung ein dynamisches Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Konformationen des Enzyms vor. Durch die Zugabe des kompetitiven Inhibitors wird der Konformationsaustausch signifikant reduziert. Aus der Burst-Analyse wiederum folgt, dass diese Reduktion der konformationellen Dynamik auf eine Stabilisierung des geschlossenen Zustandes des Enzyms zurückzuführen ist. Letztgenanntes Resultat konnte ferner mithilfe der ergänzend durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimente bestätigt werden (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A. 8 (a), Anhang).

Um die Zeitskala, auf welcher sich die Proteindynamik bewegt, grob abschätzen zu können, wurden zum Abschluss die in Abbildung 29 (a) vorgestellten Korrelationsdaten gemäß der von Torres und Levitus vorgeschlagenen [218] und im Kapitel 2.2.3.3 vorgestellten Vorgehensweise einer „semiquantitativen“ Analyse unterzogen. Hierzu wurde zunächst das Verhältnis der Autokorrelationsfunktion des Akzeptors $G_{A,A}(\tau)$ und der Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelationsfunktion $G_{D,A}(\tau)$ jeweils vor und nach Zugabe von mb43 kalkuliert und in Abbildung 30 aufgetragen. Wie den Gleichungen (40) und (41) zu entnehmen ist, setzten sich beide Korrelationsfunktionen im Falle eines Zweizustandssystems aus einem Diffusionsterm $G_{diff}(\tau)$ sowie einem kinetischen Reaktionsterm $X_{xy}(\tau)$, welcher die Konformationsdynamik des Biomoleküls berücksichtigt, zusammen. Wird davon ausgegangen, dass die Diffusionsbeiträge sämtlicher Korrelationsfunktionen identisch sind, so wird das Verhältnis aus zwei unterschiedlichen Korrelationsfunktionen ausschließlich durch den konformationellen Austausch bestimmt. Im

5 Untersuchung der Proteindynamik

konkreten Fall ergibt sich für den Quotienten $G_{A,A}(\tau)/G_{D,A}(\tau)$ gemäß Gleichungen (40) und (41):

$$\frac{G_{A,A}(\tau)}{G_{D,A}(\tau)} = \frac{1 + \alpha_{A,A} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{ex}}}}{1 - \alpha_{D,A} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{ex}}}} \quad (44)$$

Hierbei sind:

$$\alpha_{A,A} = \frac{k_{12} \cdot k_{21} \cdot (E_{ET,1} - E_{ET,2})^2}{(k_{21} \cdot E_{ET,1} + k_{12} \cdot E_{ET,2})^2} \quad (45)$$

und

$$\alpha_{D,A} = \frac{k_{12} \cdot k_{21} \cdot (E_{ET,1} - E_{ET,2})^2}{(k_{21} \cdot (1 - E_{ET,1}) + k_{12} \cdot (1 - E_{ET,2})) (k_{21} \cdot E_{ET,1} + k_{12} \cdot E_{ET,2})} \quad (46)$$

Um nun die Zeitskala des Konformationsaustausches zu bestimmen, wurde das Verhältnis beider Korrelationsfunktionen – jeweils aufgenommen vor Zugabe von mb43 – mit dem Ausdruck aus Gleichung (44) angepasst (blaue Kurve in Abbildung 30).

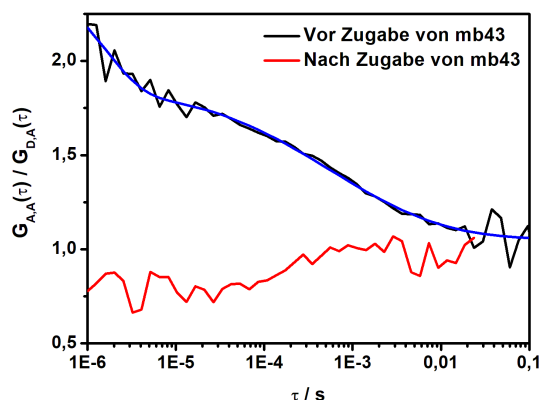


Abbildung 30: Verhältnis aus Akzeptor-Autokorrelations- und Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelationsfunktion der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR jeweils vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) Zugabe eines ca. 200 000-fachen Überschusses des kompetitiven Inhibitors mb43. Die blaue Kurve stellt eine Anpassung gemäß Gleichung (44) an die Daten, welche in Abwesenheit von mb43 aufgenommen wurden, dar. Hierbei wurde, abweichend von Gleichung (44), ein zusätzlicher Zerfall in der Akzeptor-Autokorrelation berücksichtigt, welcher auf die Triplett-Kinetik des Akzeptor-Farbstoffs zurückzuführen und im Falle der Kreuzkorrelationsfunktion nicht sichtbar ist [73].

Hierbei wurden gemäß den theoretischen Erwartungen (siehe Tabelle 5) die Energietransfereffizienzen der beiden Zustände mit $E_{ET,1} = 0,5$ und $E_{ET,2} = 1,0$ approximiert. Weiterhin wurde angenommen, dass die Übergangsraten k_{12} und k_{21} , deren Summe gemäß Gleichung (42) den Kehrwert der Austauschzeit τ_{ex} liefert, durch eine logarithmische Normalverteilung beschrieben werden können. Ferner wurde der Ausdruck der Akzeptor-Autokorrelationsfunktion um einen Term, welcher die Triplett-Kinetik des Akzeptor-Fluorophors berücksichtigt, ergänzt [73]. Entsprechend der Anpassung sind die Korrelationsdaten, welche vor Zugabe des kompetitiven Inhibitors aufgenommen wurden, mit Übergängen zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand, welche im Mittel auf einer Zeitskala von $\langle \tau_{ex} \rangle \approx 10$ ms stattfinden, kompatibel. Im Rahmen einer NMR-Studie wurde einige Jahre zuvor bereits eine ähnliche

Zeitskala für die Konformationsdynamik der DENV-2-PR vorgeschlagen [62]. Dahingegen folgt aus Abbildung 30 unmittelbar, dass die Amplitude des Quotienten $G_{A,A}(\tau)/G_{D,A}(\tau)$ nach Zusatz von mb43 nahezu dem Rauschpegel der Daten entspricht. Folglich scheint der Konformationsaustausch in Anwesenheit des Inhibitors vernachlässigbar zu werden.

Zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass das vorstehend beschriebene Prozedere zur quantitativen Bestimmung der Proteindynamik grundsätzlich auch unter Zuhilfenahme der Donor-Autokorrelationsfunktion durchführbar ist. Hiervon wurde jedoch abgesehen, da das Donor-Signal zu einem erheblichen Anteil von fluoreszierenden Verunreinigungen sowie der stark ausgeprägten Donor-Only-Population überlagert wird, sodass der Donor-Autokorrelationsfunktion hier keine übermäßige Bedeutung beigemessen werden sollte.

Vor und nach Zugabe von Substrat 1 bzw. Substrat 2

In Abbildung 31 (a) und (b) werden die Korrelationsfunktionen von S79C-S158C A jeweils vor und nach Zugabe eines ca. zweimillionenfachen Überschusses von S1 bzw. S2 dargestellt. Wie aufgrund der im vorstehenden Abschnitt präsentierten Resultate zu erwarten ist, findet in Abwesenheit des jeweiligen Substrates ein signifikanter Konformationsaustausch statt, sodass die Kreuzkorrelationsfunktion ein erheblich langsames Abklingverhalten als die beiden Autokorrelationsfunktionen aufweist [73, 218]. Offensichtlich induziert die Zugabe von S1 bzw. S2 eine signifikante Verschiebung der Kreuzkorrelationsfunktion, sodass diese in der Folge zwischen beiden Autokorrelationen verläuft. Demnach ist in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen, welche an der S79C-G14C-Doppelmutante erzielt wurden, davon auszugehen, dass beide Substrate eine Konformation der DENV-2-PR stabilisieren, wodurch die Proteindynamik messbar vermindert wird [52, 234].

Um zu eruieren, welcher Zustand des Enzyms durch den jeweiligen Liganden stabilisiert wird, wurden die Intensitätszeitspuren von S79C-S158C A, welche jeweils in An- und Abwesenheit von S1 bzw. S2 aufgenommen wurden, einer Burst-Analyse unterzogen. Die hieraus erhaltenen 2D-Histogramme können den Teilabbildungen (c) und (d) der Abbildung 31 entnommen werden. Hierbei wird die Tendenz ersichtlich, dass die relative Häufigkeit jener Bursts, welche FRET-Effizienzen größer 90 % aufweisen und damit gemäß Tabelle 5 der geschlossenen Konformation des Enzyms zuzuordnen sind, infolge der Anwesenheit des jeweiligen Substrates leicht, aber signifikant zunimmt. Demnach scheint die Zugabe beider Liganden, wie theoretisch erwartet [27, 29], die aktive, geschlossene Konformation der PR zu begünstigen. Die Stabilisierung dieses Zustandes ist allerdings, ähnlich wie im Falle der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-G14C, deutlich schwächer ausgeprägt, als dies nach Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43 beobachtet wurde. Mit der schwächeren Stabilisierung des geschlossenen Zustandes ist wiederum eine weniger effiziente Minderung der Proteindynamik verbunden, sodass die aufgenommenen Daten auch nach Zugabe von S1 bzw. S2 im Vergleich zur statischen FRET-Linie nach wie vor signifikant in Richtung längerer Donor-Fluoreszenzlebensdauern versetzt sind [74, 75]. Die Ursache hierfür wurde bereits an entsprechender Stelle im Kapitel 5.1.2.1 diskutiert und liegt vermutlich darin begründet, dass die Substrate aufgrund ihres Umsatzes im aktiven Zentrum der PR deutlich kürzer an das Enzym gebunden sind und dieses somit weniger effektiv im aktiven Zustand fixieren können.

Zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass die im smFRET-Experiment als Resultat der Ligandenzugabe beobachtete Stabilisierung der geschlossenen Konformation in den ergänzend durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimenten nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A. 8 (b) und (c), Anhang).

Zum Abschluss dieses Unterkapitels kann festgehalten werden, dass die bisher durchgeführten Messungen an den beiden FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten S79C-G14C und S79C-S158C A jeweils vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 identische Ergebnisse liefern. So

5 Untersuchung der Proteindynamik

konnte in beiden Fällen gezeigt werden, dass die Zugabe des entsprechenden Substrats jeweils den geschlossenen Zustand der PR begünstigt.

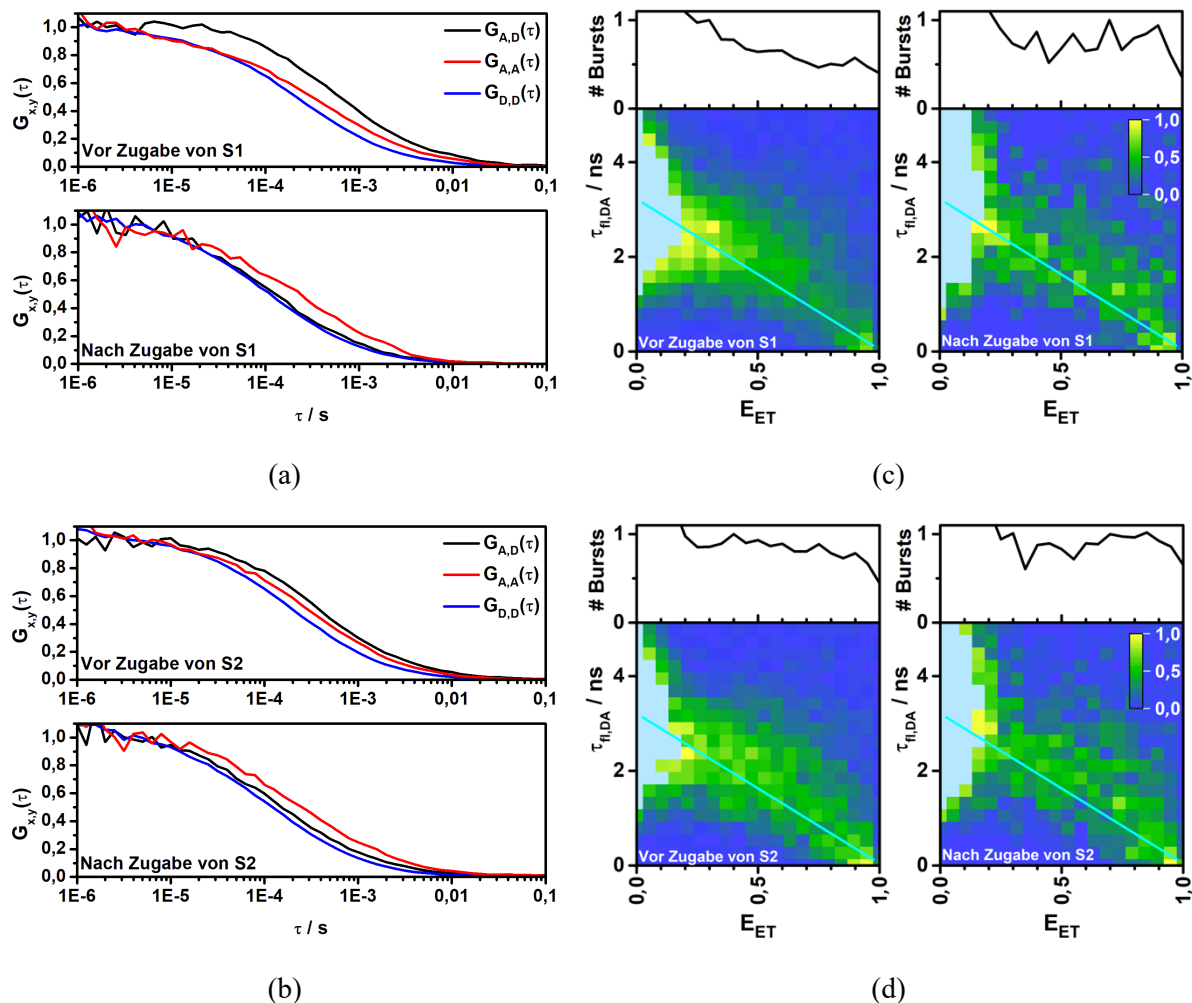


Abbildung 31: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. zweimillionenfachen Überschusses von S1 bzw. S2. (a, b) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe von S1 (a) bzw. S2 (b). (c, d) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von S1 (c) bzw. S2 (d) aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fI,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Vor und nach Zugabe von BM214

Um den Einfluss des allosterischen Inhibitors BM214 auf das Konformationsgleichgewicht der DENV-2-PR zu untersuchen, wurde die FRET-Paar markierte Doppelmutante S79C-S158C A jeweils vor und nach Zugabe eines ca. 970 000-fachen Überschusses von BM214 vermessen. Wie Abbildung 32 (a) zu entnehmen ist, wurde im Rahmen dieser Messungen jedoch festgestellt, dass die Zugabe des allosterischen Inhibitors mit einer vollständigen Löschung der Akzeptor-Fluoreszenz einhergeht. Diese Beobachtung kann auf unterschiedliche Ursachen

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

zurückzuführen sein. Beispielsweise ist denkbar, dass der allosterische Inhibitor eine Konformation des Proteins stabilisiert, in welcher kein Energietransfer möglich ist. Theoretisch wird erwartet, dass Liganden, welche in die allosterische Tasche binden, den inaktiven, offenen Zustand der PR begünstigen [27, 28, 151]. Gemäß Tabelle 5 würde im Falle des untersuchten S79C-S158C-Konstrukts ein Übergang in die inaktive Konformation tatsächlich mit einem vergrößerten Abstand zwischen beiden FRET-Markern und damit einer verminderten FRET-Effizienz einhergehen. Allerdings wird im offenen Zustand des Enzyms weiterhin eine signifikante Energietransfereffizienz, welche theoretisch 47 % betragen sollte, erwartet. Demnach sollten auch in diesem Zustand Fluoreszenzbursts im Akzeptor-Kanal beobachtbar sein. Es kann jedoch nicht kategorisch ausgeschlossen werden, dass BM214 eine bisher unbekannte Konformation, innerhalb deren ein signifikanter Energietransfer nicht möglich ist, begünstigt. Neben der zuvor diskutierten Hypothese scheint es weiterhin möglich zu sein, dass der schlecht wasserlösliche Inhibitor BM214 [319] mit dem nur mäßig hydrophilen Akzeptor-Fluorophor ATTO 647N [284] im wässrigen Puffersystem, in welchem die Messungen durchgeführt wurden, π - π -Wechselwirkungen eingeht und die Fluoreszenz des Akzeptors infolge dieser Komplexbildung gelöscht wird [155, 317].

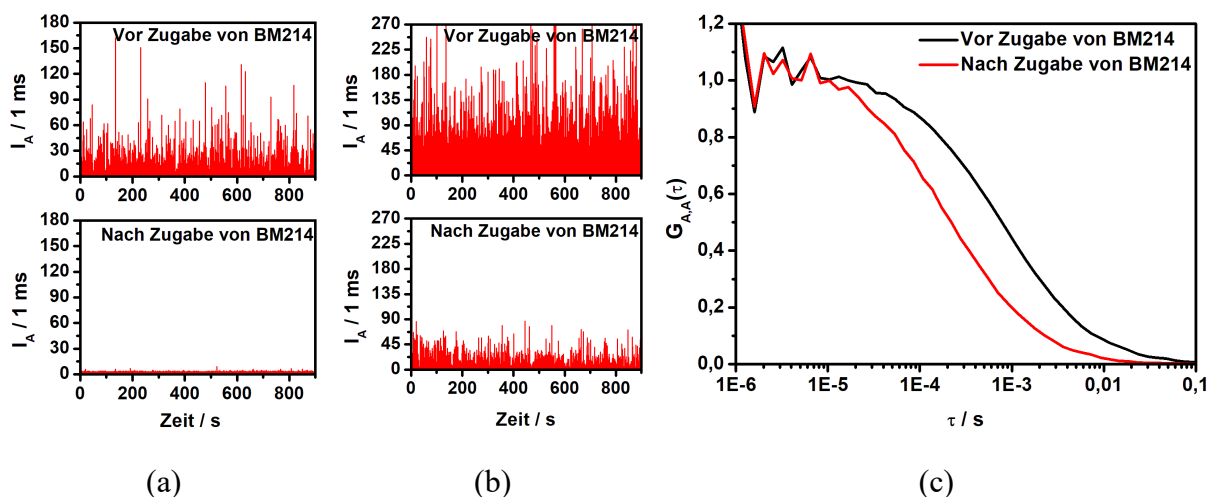


Abbildung 32: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 970 000-fachen Überschusses von BM214. (a, b) Zeitspuren der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe von BM214. Die Zeitauflösung beträgt jeweils 1 ms. Die Anregungswellenlänge λ_{Ex} , welche zur Aufnahme der dargestellten Zeitspuren verwendet wurde, betrug 502 nm (a) bzw. 633 nm (b). (c) Vergleich der normierten Akzeptor-Autokorrelationsfunktion vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) Zugabe von BM214. Die Anregungswellenlänge λ_{Ex} , welche zur Aufnahme der Korrelationsfunktionen verwendet wurde, betrug jeweils 633 nm.

Um die Ursache der beobachteten Fluoreszenzlöschung zu eruieren, wurden die Messungen an S79C-S158C A in An- und Abwesenheit von BM214 wiederholt. Allerdings wurden die Intensitätszeitspuren nun mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm aufgenommen. Hintergrund hierfür ist, dass mit der energieärmeren Anregung der Akzeptor direkt abgefragt und somit untersucht werden kann, ob nach Zugabe des allosterischen Inhibitors prinzipiell noch intakter ATTO 647N-Farbstoff in der Lösung vorhanden ist. Abbildung 32 (b) illustriert die entsprechenden Fluoreszenzintensitätszeitspuren. Aus diesen ist deutlich ersichtlich, dass auch nach Zugabe von BM214 weiterhin ein erhebliches Maß an Fluoreszenzintensität im Akzeptor-Kanal detektiert werden kann. Um zu evaluieren, ob die beobachtete Fluoreszenz größtenteils auf farbstoffmarkierte PR-Moleküle oder aber überwiegend auf ungebundene Akzeptor-Fluorophore zurückzuführen ist, wurde schließlich die Akzeptor-Autokorrelationsfunktion jeweils vor und nach Zugabe des Liganden kalkuliert (siehe Abbildung 32 (c)). Nach Zugabe von BM214 fällt die Akzeptor-Autokorrelation mit einem Faktor von ca. 3,7 schneller auf null ab als dies

5 Untersuchung der Proteindynamik

vor Zugabe des Inhibitors der Fall ist. Wird für den freien Farbstoff ein hydrodynamischer Radius R_H von 0,7 nm und für die Protease ein R_H von 2,8 nm angenommen, so ergibt sich durch Kombination der Gleichungen (34) und (35), dass der ungebundene Fluorophor theoretisch mit einem Faktor von ca. 4 schneller diffundieren sollte als das farbstoffmarkierte Enzym. Demnach scheint die Fluoreszenz des an die Protease gebundenen ATTO 647N-Farbstoffs in erheblichem Maße durch BM214 gelöscht zu werden, sodass in Anwesenheit des allosterischen Inhibitors vermutlich überwiegend ungebundener Akzeptor-Farbstoff detektiert wird.

5.1.2.3 S79C-S158C B

Um dennoch den Einfluss des allosterischen Inhibitors BM214 auf das Konformationsgleichgewicht der DENV-2-PR untersuchen zu können, galt es demnach einen Akzeptor-Farbstoff zu finden, dessen Fluoreszenz in seiner an das Enzym gebundenen Form bestenfalls nicht oder aber in deutlich geringerem Ausmaß durch BM214 gelöscht wird. Da gemäß der oben skizzierten Ergebnisse zu vermuten ist, dass eine Komplexbildung zwischen dem mäßig hydrophilen Akzeptor ATTO 647N [284] und dem ebenfalls schlecht wasserlöslichen allosterischen Inhibitor BM214 [319] ursächlich für die Fluoreszenzlöschung ist [155, 317], wurde beschlossen ATTO 647N durch Cy5, welches sich durch eine gute Wasserlöslichkeit auszeichnet [285, 286], zu ersetzen. Nachfolgend werden die Resultate der Untersuchungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Doppelmutante S79C-S158C (Probenbezeichnung: S79C-S158C B) vorgestellt und diskutiert. Um zu verifizieren, dass die bisher mithilfe der FRET-Paar markierten Konstrukte S79C-G14C und S79C-S158C A erzielten Ergebnisse unabhängig vom gewählten FRET-Paar sind, wurde S79C-S158C B neben BM214 auch nochmals mit mb43 sowie S1 und S2 umgesetzt.

Vor und nach Zugabe von mb43

Wie Abbildung 33 (a) entnommen werden kann, zeigen die Korrelationsdaten von S79C-S158C B ein ähnliches Verhalten, wie es zuvor bereits für S79C-S158C A beobachtet wurde. So fällt die Kreuzkorrelationsfunktion in Abwesenheit eines jeglichen Liganden deutlich langsamer auf null ab als die beiden Autokorrelationsfunktionen, sodass ein Austausch zwischen verschiedenen Konformationen vorzuliegen scheint [73, 218]. Des Weiteren induziert die Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43 auch im Falle von S79C-S158C B einen erheblich beschleunigten Abfall der Kreuzkorrelationsfunktion, sodass diese in der Folge ein ähnliches Abklingverhalten wie die Akzeptor-Autokorrelation zeigt. Dementsprechend ist, in Übereinstimmung mit den Resultaten, welche an S79C-S158C A erzielt wurden, zu vermuten, dass mb43 eine Konformation der PR stabilisiert [52, 234].

Der untere Teil von Abbildung 33 (b) zeigt die 2D-Histogramme, welche aus der Burst-Analyse der Intensitätszeitspuren vor und nach Zugabe eines ca. 150 000-fachen Überschusses des kompetitiven Inhibitors mb43 erhalten wurden. In beiden Fällen wird eine stark ausgeprägte Donor-Only-Spezies beobachtet. In Analogie zu den Ergebnissen, welche an S79C-S158C A erzielt wurden, ist die Punktwolke der FRET-Populationen vor Zugabe des kompetitiven Inhibitors deutlich entlang der Abszisse elongiert. Auch weichen die aufgenommenen Daten, ähnlich wie im Falle der beiden bisher untersuchten FRET-Paar markierten Doppelmutanten, charakteristisch von der statischen FRET-Linie ab, indem sie in Richtung größerer Donor-Fluoreszenzlebensdauern verschoben sind. Dies deutet abermals darauf hin, dass das Enzym während seiner Transitzeit durch das Beobachtungsvolumen zwischen verschiedenen Zuständen wechselt [74, 75]. Infolge der Zugabe des kompetitiven Inhibitors verschwinden die FRET-Populationen im Bereich mittlerer Energietransfereffizienzen nahezu vollständig, sodass fast ausschließlich Bursts, welche sich durch FRET-Effizienzen von annähernd 100 % auszeichnen, beobachtet werden können. Durch Vergleich mit Tabelle 5 folgt hieraus, dass mb43, gemäß den theoretischen Erwartungen [27, 59, 62, 145], die geschlossene Konformation der PR stabilisiert. Durch

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

diese Stabilisierung wiederum erfährt die Proteindynamik eine signifikante Reduktion, sodass die persistierende Population in guter Näherung auf der statischen FRET-Linie zu liegen kommt [74, 75]. Auch diese Ergebnisse sind völlig kompatibel mit jenen Resultaten, welche im Rahmen der entsprechenden Messungen an S79C-S158C A und S79C-G14C erlangt wurden. Zur Vollständigkeit sei des Weiteren angemerkt, dass die infolge der Ligandenzugabe beobachtete Stabilisierung des geschlossenen Zustands auch im Rahmen der ergänzend durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimente nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A. 9 (a), Anhang).

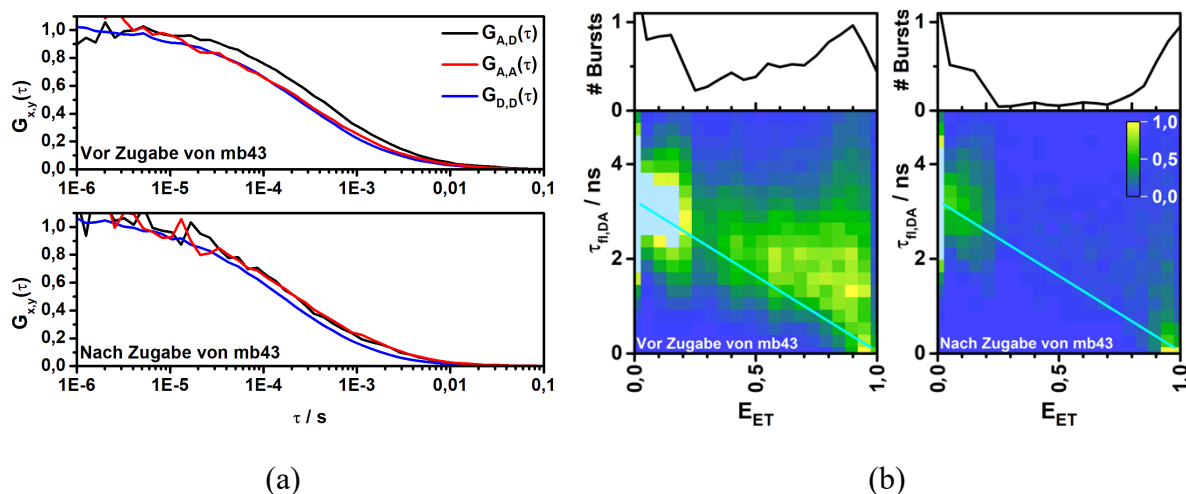


Abbildung 33: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 150 000-fachen Überschusses von mb43. (a) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43. (b) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von mb43 aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe des kompetitiven Inhibitors leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass die bisher vorgestellten Messungen, welche an den drei FRET-Paar markierten Konstrukten S79C-G14C, S79C-S158C A und S79C-S158C B in An- und Abwesenheit von mb43 durchgeführt wurden, weitestgehend reproduzierbare Ergebnisse liefern. Folglich sind die erzielten Resultate unabhängig sowohl vom gewählten Farbstoffpaar (ATTO 488 / ATTO 647N vs. ATTO 488 / Cy5) als auch von der jeweils verwendeten Cystein-Doppelmutante (S79C-G14C vs. S79C-S158C). Kurzum, in Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors findet ein Austausch zwischen unterschiedlichen Konformationen statt, während infolge der Zugabe von mb43 der geschlossene Zustand des Enzyms stabilisiert wird.

Vor und nach Zugabe von Substrat 1 bzw. Substrat 2

In den Teilabbildungen (a) und (b) der Abbildung 34 werden die normierten Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Doppelmutante S79C-S158C jeweils vor und nach Zugabe eines ca. 1,5-millionenfachen Überschusses der Substrate S1 bzw. S2 dargestellt. Erwartungsgemäß sind die Korrelationsdaten, welche in Abwesenheit eines jeglichen Liganden aufgenommen wurden, mit dem Vorliegen einer

5 Untersuchung der Proteindynamik

ausgeprägten konformationellen Dynamik kompatibel [73, 218]. Die Zugabe von S1 bzw. S2 induziert eine signifikante Beschleunigung des Zerfalls der Kreuzkorrelationsfunktion, sodass diese schließlich ein Abklingverhalten, welches jenem der Akzeptor-Autokorrelation ähnelt, aufweist. Folglich ist, in Analogie zu den Erkenntnissen, welche mithilfe der beiden zuvor vorgestellten Konstrukte erlangt wurden, davon auszugehen, dass beide Substrate einen Zustand des Enzyms stabilisieren und somit den Konformationsaustausch messbar reduzieren [52, 234].

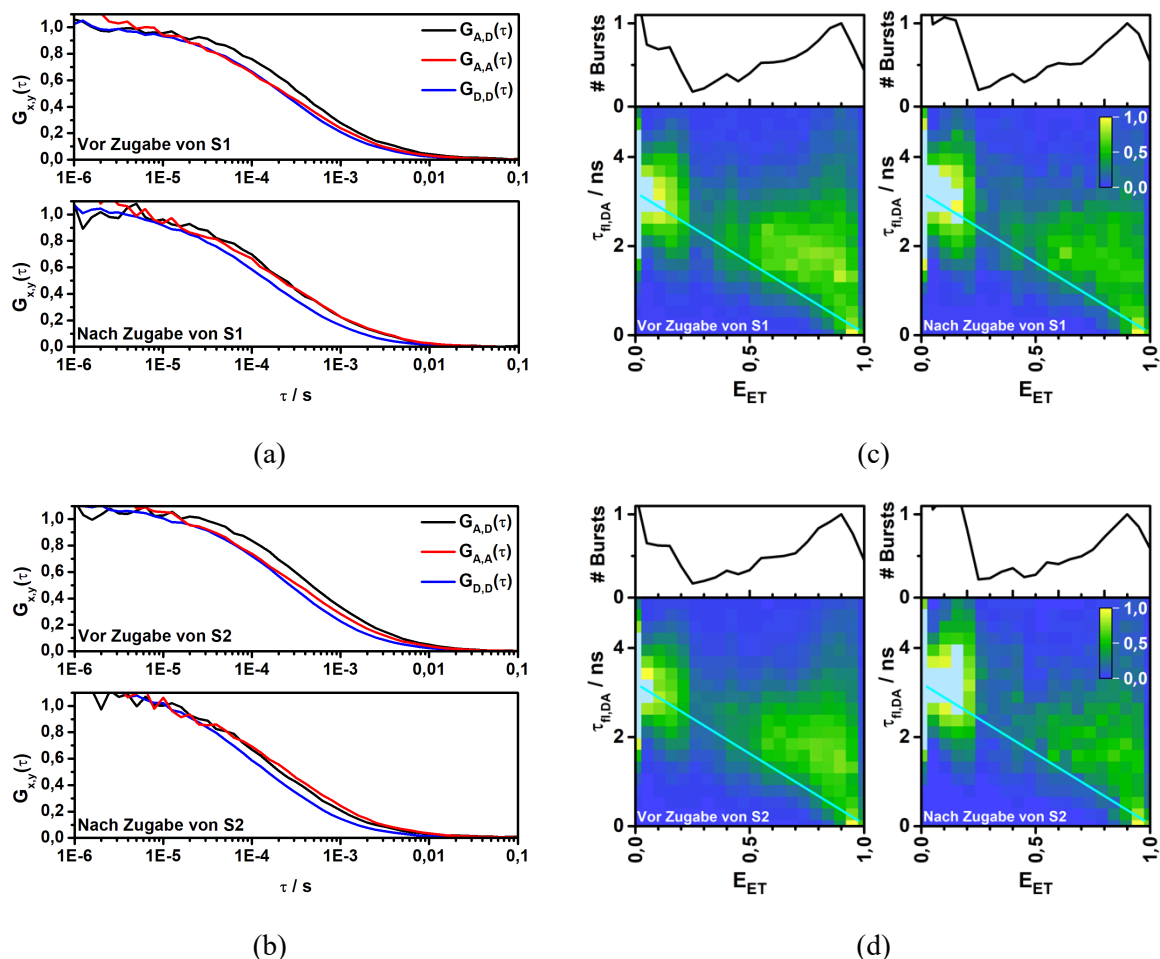


Abbildung 34: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 1,5-millionenfachen Überschusses von S1 bzw. S2. (a, b) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe von S1 (a) bzw. S2 (b). (c, d) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von S1 (c) bzw. S2 (d) aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Die unteren Teilabbildungen von Abbildung 34 (c) und (d) illustrieren die 2D-Histogramme, welche mithilfe der Burst-Analyse aus den jeweils vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 aufgenommenen Intensitätszeitspuren, extrahiert wurden. Demnach scheint die Zugabe des jeweiligen Substrats keine merkliche Verschiebung der FRET-Populationen auszulösen. Allerdings sind kleinere Effekte in dieser Art der Auftragung schwerlich zu erkennen. Daher bietet es sich

5.1 Kombinierte FCS-FRET- und smFRET-Messungen in Lösung

an, die in den oberen Teilen von Abbildung 34 (c) und (d) dargestellten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen zur Analyse heranzuziehen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die normierten 1D-Histogramme vor und nach Zugabe von S1 bzw. S2 in je einem gemeinsamen Graphen dargestellt:

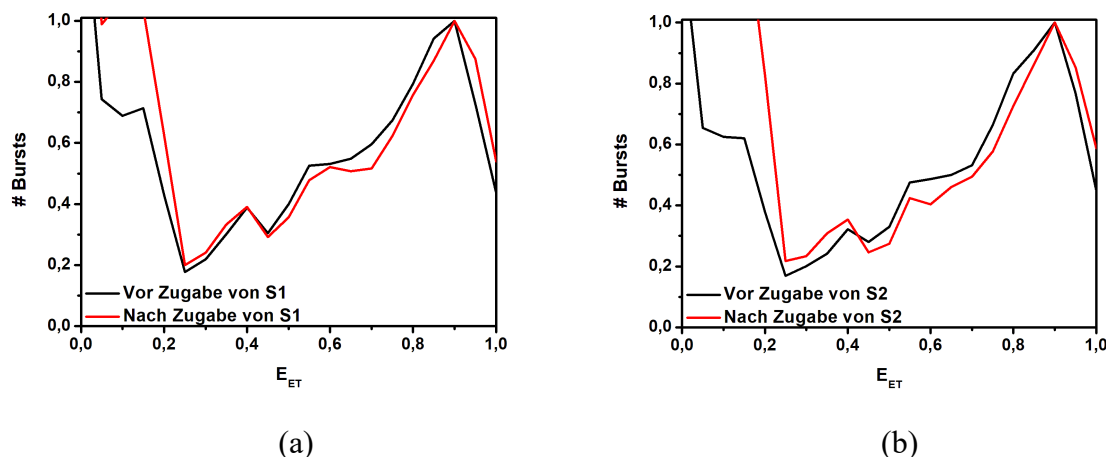


Abbildung 35: Vergleich der normierten 1D-Histogramme über die vorkommenden FRET-Effizienzen der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR jeweils vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) Zugabe eines ca. 1,5-millionenfachen Überschusses von S1 (a) bzw. S2 (b).

In beiden Fällen bedingt die Zugabe des jeweiligen Liganden eine leichte Verschiebung des Schwerpunktes der vorkommenden FRET-Populationen in Richtung größerer Energietransfereffizienzen. Folglich ist anzunehmen, dass sowohl S1 als auch S2, gemäß den theoretischen Erwartungen [27, 29], den geschlossenen Zustand des Enzyms stabilisieren (siehe Tabelle 5). Die Stabilisierung dieses Zustandes ist allerdings, ähnlich wie im Falle der beiden zuvor untersuchten Systeme, deutlich schwächer ausgeprägt als nach Zugabe von mb43. Mit der schwächeren Stabilisierung geht wiederum eine weniger effiziente Reduktion der Konformationsdynamik einher, sodass die aufgenommenen Daten auch nach Zugabe beider Substrate signifikant von der statischen FRET-Linie abweichen (siehe Abbildung 34 (c) + (d)) [74, 75]. Die Ursache hierfür wurde bereits an entsprechender Stelle in Kapitel 5.1.2.1 thematisiert.

Auch die Ergebnisse der zusätzlich durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimente (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A. 9 (b) und (c), Anhang) sind kompatibel mit der Erklärung, dass beide Substrate den geschlossenen Zustand stabilisieren.

Vor und nach Zugabe von BM214

Wie in der Einleitung zu Kapitel 5.1.2.3 skizziert, wurde die FRET-Paar markierte Doppelmutante S79C-S158C B vornehmlich kreiert, um mit deren Hilfe den Einfluss des allosterischen Inhibitors BM214 auf das konformationelle Gleichgewicht der DENV-2-PR zu untersuchen. Hierzu wurde S79C-S158C B jeweils vor und nach Zugabe eines ca. 780 000-fachen Überschusses von BM214 vermessen.

Gemäß Abbildung 36 (a) ist – im Gegensatz zu S79C-S158C A – auch in Anwesenheit des allosterischen Inhibitors Fluoreszenzintensität im Akzeptor-Kanal sichtbar. Allerdings werden sowohl die Anzahl als auch die mittlere Intensität der detektierten Bursts infolge der Ligandenzugabe erheblich reduziert. Gleichwohl ist diese Beeinträchtigung offensichtlich von deutlich geringerem Ausmaß als dies im Falle des mit ATTO 647N markierten Systems S79C-S158C A beobachtet wurde (siehe Abbildung 32 (a)).

Nun wurden die im Donor- sowie Akzeptor-Kanal aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäten einer Korrelationsanalyse unterzogen. Abbildung 36 (b) gibt die hierbei erhaltenen Korrelationsfunktionen wieder. Offensichtlich bedingt die Zugabe des allosterischen Inhibitors eine

5 Untersuchung der Proteindynamik

erhebliche Beschleunigung des Zerfalls der Kreuzkorrelationsfunktion, sodass diese in der Folge ein Abklingverhalten, welches jenem der beiden Autokorrelationsfunktionen ähnelt, zeigt. Diese Beobachtung ist mit dem Bild einer reduzierten konformationellen Dynamik kompatibel [52, 234] und könnte daher als Hinweis auf eine Konformationsstabilisierung verstanden werden. Allerdings fallen auch die beiden Autokorrelationsfunktionen nach Zugabe von BM214 schneller auf null ab, was zurzeit noch nicht erklärt werden kann.

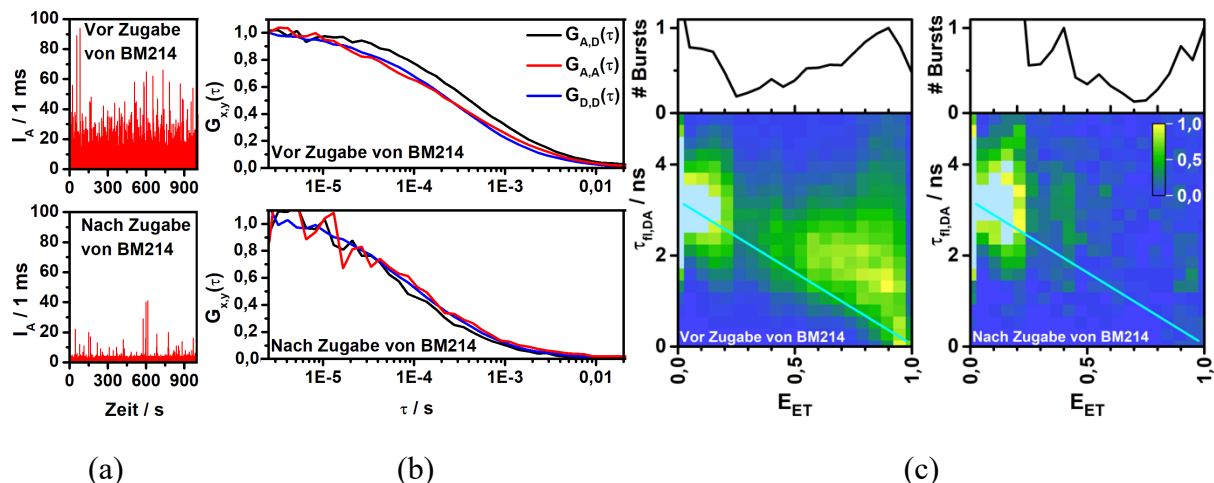


Abbildung 36: Ergebnisse der Messungen an der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR vor und nach Zugabe eines ca. 780 000-fachen Überschusses von BM214. (a) Zeitspuren der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe von BM214. Die Zeitauflösung beträgt jeweils 1 ms. (b) Vergleich der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (schwarze Kurve) mit den beiden normierten Autokorrelationsfunktionen (rote bzw. blaue Kurve), jeweils vor (oberer Graph) und nach (unterer Graph) Zugabe des allosterischen Inhibitors BM214. (c) Auftragung der normierten Häufigkeit der einzelnen Bursts, welche innerhalb der Intensitäts-Zeitspur der FRET-Paar markierten PR jeweils vor und nach Zugabe von BM214 aufgezeichnet wurden, in einem 2D-Histogramm, aufgelöst nach mittlerer Donor-Lebenszeit $\tau_{fl,DA}$ und Energietransfereffizienz E_{ET} . Um die FRET-Populationen vor und nach Zugabe des allosterischen Inhibitors leichter vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Maxima auf eins normiert. Die Maxima der Donor-Only-Spezies wurden bei der Normierung nicht berücksichtigt, weshalb Werte größer eins (hellblau dargestellt) auftreten. Die cyan-blauen Geraden repräsentieren die statischen FRET-Linien. Die normierten 1D-Histogramme über die jeweils vorkommenden FRET-Effizienzen werden als Projektion oberhalb des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt.

Zur Überprüfung, ob tatsächlich eine Konformation des Enzyms durch den allosterischen Inhibitor stabilisiert wird, wurden die Intensitätszeitspuren von S79C-S158C B, welche in An- und Abwesenheit von BM214 aufgenommen wurden, einer Burst-Analyse unterzogen. Die hieraus erhaltenen 2D- und 1D-Histogramme werden in Abbildung 36 (c) dargestellt. Daraus kann die Tendenz entnommen werden, dass die relative Gewichtung jener Bursts, welche FRET-Effizienzen von ca. 40 % aufweisen und damit entsprechend Tabelle 5 dem offenen Zustand der PR zuzuordnen sind, infolge der Zugabe des allosterischen Inhibitors zunimmt. Dies ist mit den theoretischen Erwartungen [27, 28, 151], dass allosterische Inhibitoren die inaktive, offene Konformation der DENV-2-PR begünstigen, kompatibel. Allerdings ist diese Schlussfolgerung aufgrund der deutlich reduzierten Burst-Anzahl unter Vorbehalt zu betrachten. Aus Gründen der Vollständigkeit sei abschließend erwähnt, dass die im smFRET-Experiment beobachtete Stabilisierung des offenen Zustandes in den ergänzend durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimenten nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel A.2.3 und Abbildung A.9 (d), Anhang).

5.2 smFRET-Messungen an immobilisierten PRs

Ein erheblicher Nachteil der in Kapitel 5.1 vorgestellten Messungen besteht in der limitierten Beobachtungszeit der untersuchten Moleküle. Diese ist auf die Transitzeit des farbstoffmarkierten Systems durch das Fokusvolumen begrenzt [65, 258] und beläuft sich im Falle der DENV-2-PR unter den verwendeten Versuchsbedingungen auf ca. 0,2 ms. Prozesse, welche auf einer signifikant langsameren Zeitskala ablaufen, können daher mit den vorstehend beschriebenen Messungen nicht zuverlässig untersucht werden [268]. In solchen Fällen ist es notwendig, die Beobachtungszeit der Probenmoleküle durch deren Anbindung an den Objektträger zu extendieren [268]. In Kapitel 5.1.2.2 wurde der Versuch unternommen, mithilfe der Daten, welche an der frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Doppelmutante S79C-S158C A aufgenommen wurden, das Zeitfenster, in welchem sich die Konformationsdynamik der PR bewegt, grob abzuschätzen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Daten mit einer Proteindynamik, die im Mittel auf einer Zeitskala von ca. 10 ms stattfindet, kompatibel sind. Diesem Überschlag zufolge scheint die Konformationsdynamik um das ca. Fünfzigfache langsamer zu sein als die mittlere Beobachtungszeit im Burst-Experiment, sodass die Genauigkeit der Abschätzung infrage zu stellen ist. Im Sinne einer verlässlicheren Quantifizierung der Proteindynamik wurden daher zusätzlich smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen der FRET-Paar markierten Doppelmutante S79C-S158C A, deren experimentelle Realisierung in Kapitel 3.4.2.3 detailliert skizziert wurde, durchgeführt. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Experimente präsentiert.

Insgesamt wurde das Emissionslicht von 610 Fluoreszenzspots farb- und zeitaufgelöst detektiert. Im Zuge einer Vorab-Kreuzkorrelationsanalyse wurde festgestellt, dass hiervon 160 Datensätze ein antikorreliertes Verhalten zwischen den im Donor- und Akzeptor-Kanal detektierten Fluoreszenzintensitäten zeigen und somit im Rahmen einer quantitativen Untersuchung der Proteindynamik von Interesse sind. Um Zugriff auf die Kinetik der Konformationsübergänge zu erhalten, wurden diese Datensätze schließlich einer Stufenanalyse [315] unterzogen. Der obere Part von Abbildung 37 zeigt beispielhaft die aus den Makroankunftszeiten der einzelnen Photonen einer immobilisierten PR berechneten Zeitspuren der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität sowie die mithilfe der Stufenanalyse innerhalb dieser Zeitspuren identifizierten Stufen. Demnach wurden im konkreten Beispiel 17 Stufen erkannt. Die horizontalen Linien symbolisieren hierbei Mittelwerte über die innerhalb einer Stufe im jeweiligen Detektionskanal detektierten Intensitäten. Wie dem unteren Teil von Abbildung 37 entnommen werden kann, wurden im nächsten Schritt die stufenweise gemittelten Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor mithilfe von Gleichung (43) in die jeweils korrespondierende Energietransfereffizienz überführt. Daraufhin wurden den einzelnen Stufen mithilfe eines Schwellenwertverfahrens [74, 278, 280, 281] Konformationszustände zugeordnet. Stufen, welche FRET-Effizienzen größer 65 % aufweisen, wurden hierbei dem geschlossenen Zustand (gelb) zugeordnet, wohingegen Zustände, die sich durch Energietransfereffizienzen kleiner 65 % auszeichnen, der offenen Konformation (hellblau) zugewiesen wurden. Entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.4.2.3 wurden im Zuge der Auswertung zudem Auszustände des Akzeptors berücksichtigt. Diese werden in grauer Farbe hervorgehoben.

Innerhalb der Stufen eins und drei liegt das Enzym, gemäß des definierten Schwellenwertes, im geschlossenen Zustand vor. Beide Stufen werden durch einen Auszustand des Akzeptor-Fluorophors separiert. Daher werden die Stufen eins bis drei, wie in Kapitel 3.4.2.3 geschildert, als ein Zustand, in welchem das Protein die geschlossene Konformation einnimmt, gewertet. Folglich fließt in die kumulative Verteilungsfunktion der Verweildauern im geschlossenen Zustand eine Verweilzeit, die sich aus der Summe der Verweildauern in den ersten drei Stufen ergibt, ein. Im Anschluss an Stufe drei wechselt das Protein in den offenen Zustand und fluktuiert sodann einige Male zwischen beiden Konformationen. Von Stufe sieben nach Stufe acht

5 Untersuchung der Proteindynamik

kann gemäß der festgelegten Schwellenwertklassifikation kein Konformationsübergang festgestellt werden, sodass beide Stufen als ein Zustand mit einer Verweildauer in die kumulative Verteilungsfunktion der geschlossenen Konformation einfließen. Für die Stufen neun und zehn gilt, abgesehen davon, dass die PR dieses Mal in der offenen Konformation vorliegt, das Gleiche, sodass auch diese beiden Stufen als ein Zustand mit einer Verweildauer in die entsprechende Verteilungsfunktion eingehen. Auf den offenen Zustand folgt in Stufe elf ein Auszustand des Akzeptors, ehe daraufhin die geschlossene Konformation beobachtet wird. Wie im Experimental-Teil beschrieben, wird in einem solchen Fall der Auszustand verworfen, sodass in den Verteilungsfunktionen lediglich die Verweildauern der beiden Zustände, welche den Auszustand flankieren, berücksichtigt werden. Während der Stufen 14 bis 17 liegt der Akzeptor jeweils im Auszustand vor, sodass diese Stufen im Sinne einer Untersuchung der Konformationsdynamik nicht informativ sind und folglich ebenfalls verworfen wurden.

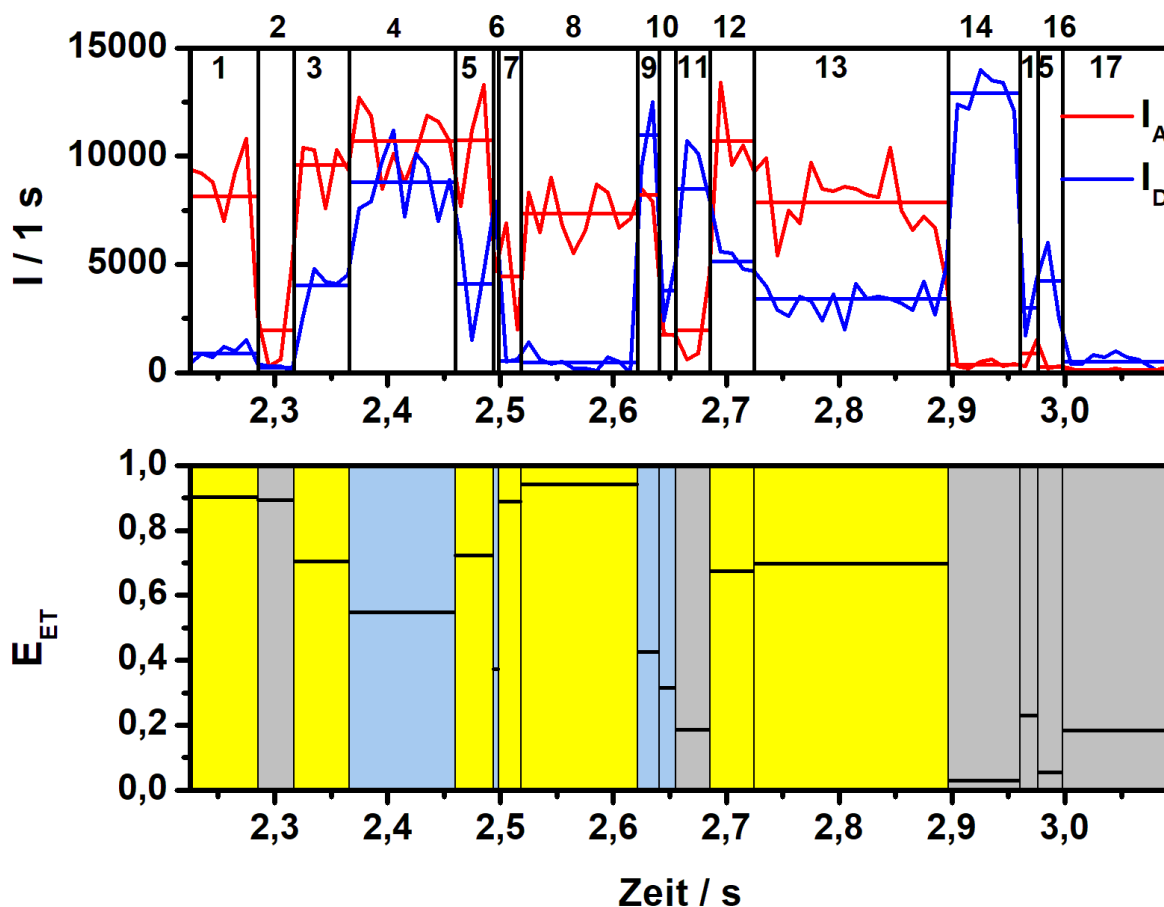


Abbildung 37: Untersuchung der Konformationsdynamik der DENV-2-PR mithilfe von smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Doppelmutante S79C-S158C. Der obere Graph zeigt beispielhaft die Zeitspuren der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A sowie der Donor-Fluoreszenzintensität I_D eines einzelnen Enzyms. Die Zeitauflösung beträgt jeweils 10 ms. Die vertikalen Linien separieren die mithilfe der Stufenanalyse [315] innerhalb dieser Zeitspuren extrahierten Stufen. Die horizontalen Linien hingegen repräsentieren die innerhalb der einzelnen Stufen gemittelten Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor. Der untere Graph stellt die aus diesen Intensitätsmittelwerten berechneten Energietransfereffizienzen E_{ET} in den einzelnen Stufen dar. Des Weiteren werden die beiden Konformationszustände des Enzyms, welche den einzelnen Stufen jeweils mithilfe eines Schwellenwertverfahrens [74, 278, 280, 281] zugeordnet wurden, farbig diskriminiert. Stufen, während welchen das Enzym per Definition die geschlossene Konformation einnimmt, werden in gelber Farbe visualisiert. Dahingegen wird der offene Zustand in hellblau hervorgehoben. Auszustände des Akzeptor-Fluorophors sind grau hinterlegt.

5.2 smFRET-Messungen an immobilisierten PRs

In Summe konnten in den 160 relevanten Datensätzen 419 Stufen identifiziert werden, innerhalb derer die DENV-2-PR den geschlossenen Zustand einnahm, wohingegen die offene Konformation 465-mal beobachtet wurde. Nachdem sämtlichen Datensätzen Sequenzen an Konformationszuständen zugeordnet wurden, konnten im nächsten Schritt die empirischen kumulativen Verteilungsfunktionen über die Verweildauern in der geschlossenen ($t_{\text{geschlossen}}$) und offenen (t_{offen}) Konformation des Enzyms aufgestellt werden:

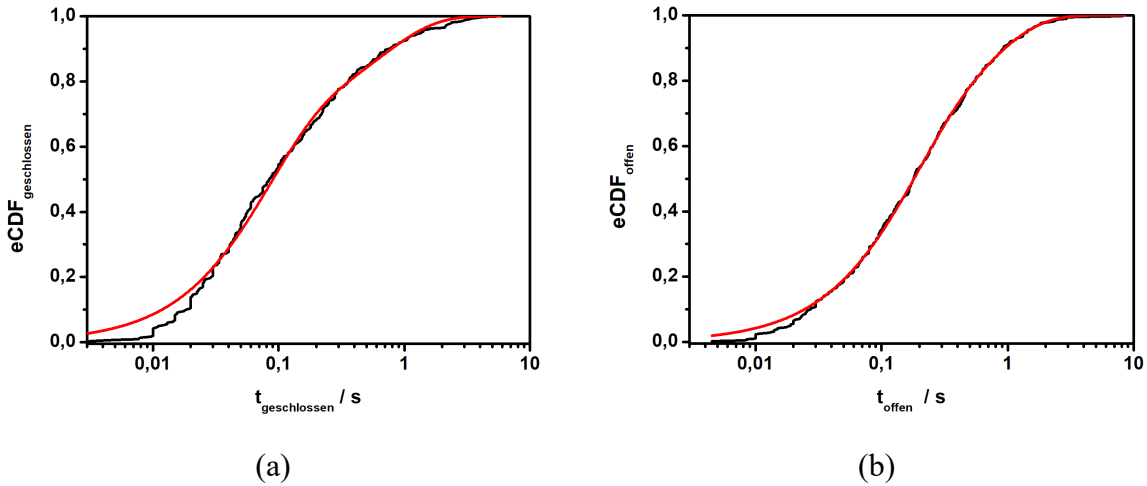


Abbildung 38: Empirische kumulative Verteilungsfunktionen (schwarze Kurven) über die Verweildauern in der geschlossenen (a) und offenen (b) Konformation der PR. Die rote Kurve stellt jeweils eine bi-exponentielle Anpassung an die entsprechende Verteilungsfunktion dar.

Um die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} der Übergänge zwischen beiden Zuständen des Proteins zu bestimmen, sollten beide Verteilungsfunktionen jeweils mit einem einfachen exponentiellen Zerfall angepasst werden [280–282]. Hierbei wurde allerdings festgestellt, dass für eine ausreichend adäquate Beschreibung der Daten mindestens die Summe zweier Exponentialfunktionen berücksichtigt werden muss:

$$\text{eCDF}_{\text{geschlossen/offen}} = 1 - A_1 \exp\left(-\frac{t_{\text{geschlossen/offen}}}{t_1}\right) - A_2 \exp\left(-\frac{t_{\text{geschlossen/offen}}}{t_2}\right) \quad (47)$$

Hierbei sind A_1 und A_2 die Amplituden der beiden Exponentialfunktionen mit den jeweiligen Abklingzeiten t_1 und t_2 . Tabelle 28 fasst die Ergebnisse der bi-exponentiellen Anpassungen zusammen.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Parameter, welche aus den Anpassungen der beiden kumulativen Verteilungsfunktionen $\text{eCDF}_{\text{geschlossen}}$ und $\text{eCDF}_{\text{offen}}$ mit Gleichung (47) erhalten wurden.

| $\text{eCDF}_{\text{geschlossen}}$ | | | $\text{eCDF}_{\text{offen}}$ | | |
|------------------------------------|-------|------------------|------------------------------|-------|------------------|
| Komponente i | A_i | t_i / s | Komponente i | A_i | t_i / s |
| 1 | 0,34 | 0,65 | 1 | 0,59 | 0,16 |
| 2 | 0,66 | 0,077 | 2 | 0,41 | 0,67 |

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die bi-exponentielle Anpassung keine physikalische Relevanz hat. Sie stellt lediglich eine Parametrisierung der Messdaten dar und verdeutlicht, dass den Daten vermutlich eine Verteilung verschiedener Übergangsraten zugrunde liegt. Dennoch können mithilfe der Anpassungen die mittleren Verweildauern $\langle t \rangle$ in der offenen bzw. geschlossenen

5 Untersuchung der Proteindynamik

Konformation abgeschätzt werden. Diese entsprechen jeweils dem amplitudengewichteten Mittelwert der Abklingzeiten t_1 und t_2 :

$$\langle t \rangle = A_1 \cdot t_1 + A_2 \cdot t_2 \quad (48)$$

Somit folgt für die mittlere Verweildauer im geschlossenen Zustand:

$$\langle t_{\text{geschlossen}} \rangle = 0,34 \cdot 0,65 \text{ s} + 0,66 \cdot 0,077 \text{ s} = 0,27 \text{ s} \quad (49)$$

Demnach wechselt das Enzym im Mittel ca. 3,7-mal pro Sekunde von der geschlossenen in die offene Konformation:

$$\langle k_{12} \rangle = \frac{1}{\langle t_{\text{geschlossen}} \rangle} = \frac{1}{0,27 \text{ s}} = 3,7 \text{ s}^{-1} \quad (50)$$

Dahingegen beträgt die mittlere Verweildauer $\langle t_{\text{offen}} \rangle$ in der offenen Konformation gemäß Gleichung (48) 0,37 s:

$$\langle t_{\text{offen}} \rangle = 0,59 \cdot 0,16 \text{ s} + 0,41 \cdot 0,67 \text{ s} = 0,37 \text{ s} \quad (51)$$

Hieraus ergibt sich für die mittlere Ratenkonstante $\langle k_{21} \rangle$ des Übergangs von der offenen in die geschlossene Konformation folgender Wert:

$$\langle k_{21} \rangle = \frac{1}{\langle t_{\text{offen}} \rangle} = \frac{1}{0,37 \text{ s}} = 2,7 \text{ s}^{-1} \quad (52)$$

Dem Verhältnis $\langle t_{\text{offen}} \rangle / \langle t_{\text{geschlossen}} \rangle$ nach zu urteilen, ist der offene Zustand der DENV-2-PR unter den gewählten Versuchsbedingungen ca. 1,4-mal stärker besetzt als die geschlossene Konformation. Folglich scheint das Enzym mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 60 % in seinem inaktiven, offenen Zustand zu verweilen. Dieses Resultat wiederum ist kompatibel mit den Ergebnissen zweier unabhängiger Arbeiten, welche ähnlich der vorliegenden Studie das kovalent verbrückte Konstrukt der DENV-2-PR im leicht basischen Milieu untersuchten [22, 59].

Die im Rahmen der Stufenanalyse erzielten Resultate sind gemäß Gleichung (42) mit einer Proteindynamik, welche sich im Mittel auf einer Zeitskala von $\langle \tau_{ex} \rangle \approx 150 \text{ ms}$ bewegt, kompatibel:

$$\langle \tau_{ex} \rangle = \frac{1}{\langle k_{12} \rangle + \langle k_{21} \rangle} = \frac{1}{(3,7 + 2,7) \text{ s}^{-1}} = 0,156 \text{ s} \quad (53)$$

Im Rahmen einer NMR-Studie wurde einige Jahre zuvor bereits eine ähnliche Zeitskala für die Konformationsdynamik der DENV-2-PR vorgeschlagen [62].

Abschließend sei erwähnt, dass auch innerhalb einiger Stufen – primär in solchen, welche dem offenen Zustand des Proteins zugeordnet wurden – leicht antikorrelierte, schnelle Intensitätsfluktuationen beobachtet werden. Beispielhaft für dieses Verhalten sei auf die Stufen 14 und 15 der in Abbildung 39 dargestellten Intensitäts-Zeitspuren einer immobilisierten Protease verwiesen. Zur besseren Veranschaulichung dieser schnellen und leicht antikorrelierten Intensitätsfluktuationen wird der innerhalb von Stufe 14 lokalisierte Abschnitt beider Intensitäts-Zeitspuren im unteren Part von Abbildung 39 vergrößert dargestellt. Die geringe Amplitude der antikorrelierten Schwankungen von Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität könnte als Indiz dafür verstanden werden, dass das Enzym innerhalb der entsprechenden Stufen zwischen diversen Unterzuständen der offenen Konformation fluktuiert. Dieser Interpretationsansatz ist

kompatibel mit der Beobachtung, dass sich der offene Zustand der DENV-2-PR durch eine erhöhte Flexibilität der C-terminalen Region von NS2B_{cf} auszeichnet [60]. Folglich wird vermutet, dass das Enzym in Lösung mehrere offene Konformationen einnehmen kann [62, 143], sodass der offene Zustand das Ergebnis einer Überlagerung strukturell ähnlicher Zustände darstellen könnte [52].

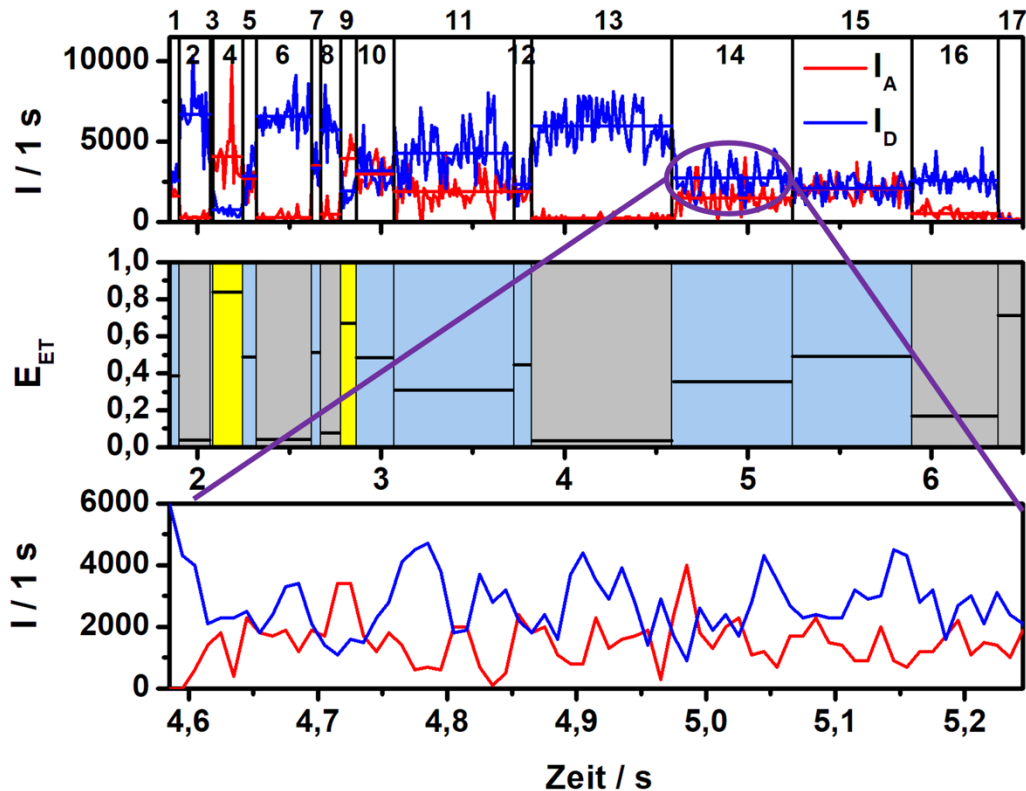


Abbildung 39: Untersuchung der Konformationsdynamik der DENV-2-PR mithilfe von smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen der FRET-Paar markierten Doppelmutante S79C-S158C A. Der obere Graph zeigt beispielhaft die Zeitspuren der Akzeptor-Fluoreszenzintensität I_A sowie der Donor-Fluoreszenzintensität I_D eines einzelnen Enzyms. Die Zeitauflösung beträgt jeweils 10 ms. Die vertikalen Linien separieren die mithilfe der Stufenanalyse [315] innerhalb dieser Zeitspuren extrahierten Stufen. Die horizontalen Linien hingegen repräsentieren die innerhalb der einzelnen Stufen gemittelten Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor. Der mittlere Graph stellt die aus diesen Intensitätsmittelwerten berechneten Energietransfereffizienzen E_{ET} in den einzelnen Stufen dar. Des Weiteren werden die beiden Konformationszustände des Enzyms, welche den einzelnen Stufen jeweils mithilfe eines Schwellenwertverfahrens [74, 278, 280, 281] zugeordnet wurden, farbig diskriminiert. Stufen, während welchen das Enzym per Definition die geschlossene Konformation einnimmt, werden in gelber Farbe visualisiert. Dahingegen wird der offene Zustand in hellblau hervorgehoben. Auszustände des Akzeptor-Fluorophors sind grau hinterlegt. Um die leicht antikorrelierten, schnellen Intensitätsfluktuationen, welche u. a. innerhalb der Stufe 14 beobachtbar sind, hervorzuheben, wird der im violetten Oval lokalisierte Abschnitt der Intensitäts-Zeitspuren im unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Absicht einen Beitrag zu einer zielgerichteten, rationalen Entwicklung antiviraler Pharmaka zur Behandlung von DENV-Infektionen zu leisten, wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an der DENV-2-PR durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden komprimiert zusammengefasst werden.

Die Experimente des ersten Themenkomplexes dieser Studie beschäftigten sich mit der Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen zwischen der DENV-2-PR und allosterischen Inhibitoren. In diesem Zusammenhang wurde in einem ersten Projekt untersucht, ob die Bindung der beiden nicht-markierten allosterischen Inhibitoren HWu180 und BM1 Änderungen der photophysikalischen Parameter einer an das Enzym gebundenen Farbstoffsonde hervorruft. Primäres Ziel dieser Untersuchungen war es, direkten Zugriff auf die Bindungskinetik zu erhalten [38–40]. Tatsächlich konnten im Rahmen von fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen an der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C verschiedene Parameter, welche sensitiv auf die Bindung der beiden allosterischen Inhibitoren reagierten, identifiziert werden. So induzierte die Zugabe beider Liganden neben einem deutlich beschleunigten Fluoreszenzabklingverhalten auch signifikante bathochrome Verschiebungen sowohl des Fluoreszenzemissions- als auch des Fluoreszenzanregungsspektrums. Gleichzeitig wurde eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität infolge der Zugabe beider Liganden beobachtet. So nahm die Emission nach Zugabe von HWu180 um einen Faktor von ca. 36 ab, wohingegen die Zugabe von BM1 gar eine Minderung der Fluoreszenzintensität um das Fünffache verursachte. Vermutlich konnten die im Ensemble beobachteten Änderungen der genannten spektroskopischen Parameter aufgrund dieses starken Einbruchs der Fluoreszenzemission auf Einzelmolekülebene nicht detektiert werden, sodass folglich kein Zugriff auf die Assoziations- und Dissoziationskinetik der Enzym-Inhibitor-Komplexe hergestellt werden konnte. Referenzmessungen am freien Farbstoff ergaben, dass die beobachtete Fluoreszenzlöschung zum Großteil statischer Natur und damit vermutlich auf die Ausbildung nicht-fluoreszierender Komplexe, bestehend aus dem unpolaren ATTO 647N-Farbstoff [284] und den ebenfalls unpolaren Liganden [29], zurückzuführen ist [155]. Mit dem Ziel ein System zu schaffen, welches die Untersuchung der Bindungskinetik erlaubt, wurde daher eine hydrophilere Fluoreszenzsonde gesucht, die eine verminderte Tendenz zur Bildung nicht-fluoreszierender Farbstoff-Ligand-Komplexe aufweisen und deren Emission folglich durch die Ligandenzugabe in deutlich geringerem Ausmaß gemindert werden sollte. Diese Bedingung wurde durch Cy5 erfüllt, sodass die beiden Cystein-Einzelmutanten G14C und S79C der PR mit diesem Fluorophor markiert wurden. Allerdings blieben die Untersuchungen an beiden Konstrukten gänzlich erfolglos, da im Rahmen der fluoreszenzspektroskopischen Ensemblemessungen festgestellt wurde, dass keiner der untersuchten Fluoreszenzparameter sensitiv auf die Zugabe von HWu180 reagierte. Auf der weiteren Suche nach einem System, welches zur Charakterisierung der Bindungskinetik der Enzym-Inhibitor-Komplexe geeignet ist, könnten künftig alternative Markierungspositionen innerhalb des Enzyms sowie weitere Fluorophore getestet werden. In diesem Zusammenhang

6 Zusammenfassung und Ausblick

könnte ATTO 643 ein interessanter Farbstoffkandidat sein. Dieses neue Fluoreszenzlabel zeichnet sich durch eine hervorragende Wasserlöslichkeit und damit, gemäß Herstellerangaben, durch eine deutlich reduzierte Neigung zur unspezifischen Bindung aus [320].

Mit der Absicht die Bindungsaffinitäten bzw. die Dissoziationskonstanten der beiden Enzym-Inhibitor-Komplexe zu ermitteln, wurde G14C-ATTO 647N schließlich im Rahmen einer spektroskopischen Titration jeweils mit steigenden Mengen von HWu180 bzw. BM1 versetzt [37]. Hierbei wurde erwartungsgemäß festgestellt, dass sowohl das Ausmaß der bathochromen Verschiebung der Fluoreszenzspektren als auch das Ausmaß der Beschleunigung des Fluoreszenzzerfalls weitestgehend mit der Konzentration des jeweils zugesetzten Liganden korrelierten. Allerdings wurde während der ersten Titrationspunkte jeweils zunächst eine konträre Entwicklung der genannten photophysikalischen Parameter beobachtet. So wurde bei kleinen Inhibitorkonzentrationen eine hypsochrome Verschiebung der Fluoreszenzspektren sowie eine Entschleunigung des Fluoreszenzabklingverhaltens detektiert. Für die beschriebene Entwicklung konnte im Rahmen der vorliegenden Studie keine Erklärung gefunden werden. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass sich das Probensystem aus mindestens drei Komponenten zusammensetzt. In Ermangelung eines fundierten Wissens über die tatsächliche Anzahl der vorliegenden Spezies sowie eines grundlegenden Verständnisses für das initiale Auftreten der gegenläufigen Entwicklung der aufgezeichneten Fluoreszenzparameter, wurde darauf verzichtet, die Daten mit einem unbegründeten Dreikomponentenmodell anzupassen. Folglich konnten die Dissoziationskonstanten der beiden Komplexe nicht aus den Datensätzen der spektroskopischen Titrierkurven extrahiert werden.

Zum Abschluss der Untersuchungen an G14C-ATTO 647N konnte mithilfe zweier Chase-Experimente [37] der Nachweis erbracht werden, dass die Bindungswechselwirkungen zwischen dem Enzym und den beiden allosterischen Inhibitoren HWu180 [303] und BM1 [305] erwartungsgemäß reversibler Natur sind.

Als alternative Herangehensweise zur Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen zwischen Protein und Ligand wurden in einem weiteren Projekt die beiden farbstoffmarkierten Liganden AG124 und HM076 im Rahmen zweier FCS-Bindestudien jeweils gegen den nicht-markierten WT des Enzyms titriert. Allerdings blieb auch diese Methodik, deren Fokus auf der Bestimmung der Dissoziationskonstante des jeweiligen Komplexes [49–51] lag, erfolglos, wenngleich jeweils signifikante Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand in den Korrelationsfunktionen detektiert werden konnten. Gleichzeitig wurde jedoch im Zuge von Kontrollmessungen festgestellt, dass auch die beiden freien Fluoreszenzmarker mit einer ähnlichen Affinität wie AG124 bzw. HM076 am Enzym haften, sodass keiner der beiden Liganden zur Durchführung aussagekräftiger FCS-Bindestudien geeignet ist. Um belastbare sowie zielführende FCS-Bindestudien zu ermöglichen, sollten zukünftig farbstoffmarkierte Inhibitoren entwickelt werden, deren Inhibitor-Fragment eine signifikant größere Affinität zur WT-PR aufweist als der Fluorophor, welcher an die jeweilige Inhibitor-Struktur gekoppelt ist. Hierbei sind zwei Ansätze möglich. Zum einen könnten Farbstoffe gesucht werden, die im Vergleich mit den bereits getesteten Fluorophoren ein geringeres Bestreben zur unspezifischen Interaktion mit dem nicht-markierten WT der DENV-2-PR aufweisen. Zum anderen könnten die Inhibitor-Fragmente hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität und damit in Bezug auf ihre Affinität zur WT-PR optimiert werden.

Der zweite Themenkomplex dieser Arbeit widmete sich schließlich der Untersuchung der Proteindynamik der DENV-2-PR. Hierbei galt es zunächst zu eruieren, ob in Lösung tatsächlich ein Gleichgewicht zwischen mehreren Konformationen des Enzyms vorliegt und inwiefern die Anwesenheit verschiedener Liganden dieses Konformationsgleichgewicht beeinflusst. Zu diesem Zwecke wurden konfokale Fluoreszenzmessungen an frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten des Enzyms durchgeführt. Um Abhängigkeiten der experimentellen Ergebnisse von der Markierungsposition sowie dem gewählten FRET-

Paar auszuschließen, wurden die Messungen an zwei verschiedenen Doppelmutanten und mit zwei unterschiedlichen Farbstoff-Paaren durchgeführt. Teile der im Rahmen dieser Messungen erzielten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht [52].

Als eines der zentralen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Daten aller drei Systeme, welche jeweils in Abwesenheit eines jeglichen Liganden aufgenommen wurden, kompatibel mit dem Vorhandensein eines konformationellen Gleichgewichtes sind. Während die Korrelationsdaten von S79C-G14C keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich des Vorliegens oder der Abwesenheit einer intramolekularen Dynamik zuließen, ergaben sich aus den entsprechenden Daten von S79C-S158C A bzw. S79C-S158C B deutliche Hinweise auf die Präsenz einer Konformationsdynamik. Im Rahmen der Burst-Analyse konnte diese Vermutung schließlich für alle drei untersuchten Systeme durch Vergleich der Lage der einzelnen FRET-Populationen relativ zur statischen FRET-Linie bestätigt werden.

Ferner wurde systemunabhängig beobachtet, dass die Zugabe des kompetitiven Inhibitors mb43 eine signifikante Verschiebung des Konformationsgleichgewichtes in Richtung des geschlossenen Zustandes auslöste. So zeichnete sich im Falle beider S79C-S158C-Doppelmutanten bereits in den Korrelationsfunktionen eine deutliche Verringerung der Proteindynamik und damit die Stabilisierung einer Konformation ab. Mithilfe der aus den Burst-Analysen erhaltenen 2D-Histogrammen konnte sodann gezeigt werden, dass die Zugabe von mb43 in sämtlichen Fällen eine erhebliche Präferenz für den geschlossenen Zustand bedingte. Die mit dieser Stabilisierung einhergehende Reduzierung der intramolekularen Dynamik äußerte sich schließlich auch in einer deutlich besseren Übereinstimmung, der in den 2D-Histogrammen beobachteten Subpopulationen, mit der statischen FRET-Linie.

Erwartungsgemäß wurde auch infolge der Zugabe der beiden Substrate S1 und S2 eine systemunabhängige Tendenz zur Stabilisierung des geschlossenen Zustandes beobachtet [27, 29]. Diese Stabilisierung war jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als jene, welche durch mb43 hervorgerufen wurde. Folglich wurde die Proteindynamik weniger effizient blockiert, sodass die detektierten FRET-Populationen auch nach Zugabe des jeweiligen Substrates charakteristisch von der statischen FRET-Linie abwichen. Ursächlich hierfür könnte die Tatsache sein, dass S1 und S2 im aktiven Zentrum umgesetzt werden, demnach deutlich kürzer an das Enzym gebunden sind und dieses daher weniger effizient in der aktiven Konformation fixieren können.

Es kann konstatiert werden, dass die beschriebenen, grundlegenden Tendenzen über sämtliche Experimente hinweg reproduziert werden konnten und somit unabhängig von der jeweils gewählten Doppelmutante sowie dem Farbstoffpaar sind. Dies wiederum erlaubt die Schlussfolgerung, dass mithilfe der durchgeführten Untersuchungen die intrinsische Proteindynamik des Enzyms adressiert wurde. In Summe liefern die präsentierten Daten deutliche Hinweise dafür, dass in Lösung ein Gleichgewicht zwischen mehreren Konformationen der DENV-2-PR existiert, welches infolge der Zugabe von Liganden, welche auf das aktive Zentrum gerichtet sind, gemäß den theoretischen Erwartungen [27, 29, 52], in Richtung der geschlossenen Konformation des Enzyms verschoben wird.

Im Rahmen einer analogen Versuchsreihe wurde der Einfluss des allosterischen Inhibitors BM214 auf das konformationelle Gleichgewicht des Enzyms untersucht. Da die Fluoreszenzintensität des an die Protease gebundenen ATTO 647N-Farbstoffs in erheblichem Maße durch BM214 gelöscht wurde, konnten lediglich unter Einsatz der ATTO 488 / Cy5-markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C verwertbare Resultate erzielt werden. Bereits aus den Korrelationsdaten ergaben sich Hinweise auf eine infolge der Ligandenzugabe ausgelöste Verringerung der Proteindynamik. Die Burst-Analyse der aufgenommenen Daten ergab schließlich, dass die relative Gewichtung jener Bursts, welche dem offenen Zustand der DENV-2-PR zuzuordnen sind, infolge der Zugabe von BM214 zunahm. Folglich scheint die Zugabe von BM214, gemäß den theoretischen Erwartungen [28, 151], die inaktive, offene Konformation der PR zu

6 Zusammenfassung und Ausblick

begünstigen und damit die Proteindynamik zu reduzieren. Diese Schlussfolgerung ist allerdings unter Vorbehalt zu betrachten, da die Anzahl der detektierten Bursts in Gegenwart des Liganden deutlich abnahm.

Abschließend stand die Quantifizierung der Proteindynamik-Zeitskala im Fokus der Untersuchungen. Eine vorläufige, grobe Abschätzung, basierend auf den FCS-FRET-Experimenten, ergab, dass die Korrelationsdaten mit einem Konformationsaustausch, welcher auf einer Zeitskala von ca. 10 ms stattfindet, kompatibel sind. Diesem Überschlag zufolge scheint die Konformationsdynamik um das ca. Fünfzigfache langsamer zu sein als die mittlere Beobachtungszeit im Burst-Experiment, sodass die Genauigkeit dieser Abschätzung grundsätzlich infrage zu stellen ist. Im Sinne einer verlässlicheren Quantifizierung der Proteindynamik wurden daher im letzten Teil dieser Dissertation zusätzlich smFRET-Messungen an immobilisierten Molekülen der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C A durchgeführt. Mithilfe einer Stufenanalyse konnten die einzelnen Konformationsübergänge innerhalb eines jeden Datensatzes sowie die Kinetik dieser Übergänge extrahiert werden. Die entsprechende Auswertung der Daten ergab, dass die DENV-2-PR im Mittel ca. 3,7-mal pro Sekunde von der geschlossenen in die offene Konformation wechselt. Dahingegen findet der entgegengesetzte Übergang im Durchschnitt lediglich ca. 2,7-mal pro Sekunde statt. Hieraus folgt unmittelbar, dass das Enzym mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 60 % in seinem inaktiven, offenen Zustand verweilt. Dieses Resultat wiederum ist kompatibel mit den Ergebnissen zweier unabhängiger Arbeiten, welche ähnlich der vorliegenden Studie das kovalent verbrückte Konstrukt der DENV-2-PR im leicht basischen Milieu untersuchten [22, 59]. Interessanterweise wurden innerhalb einiger Stufen, welche überwiegend dem offenen Zustand des Enzyms zugeordnet wurden, schnelle, leicht antikorrelierte Fluktuationen von Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität festgestellt. Vor dem Hintergrund, dass sich der offene Zustand des Enzyms durch eine erhöhte Flexibilität der C-terminalen Region von NS2B_{cf} auszeichnet [60] und daher vermutlich ein Ensemble an offenen Konformationen in Lösung vorliegt [62], wurde diese Beobachtung als Hinweis dafür gewertet, dass die DENV-2-PR innerhalb der entsprechenden Stufen zwischen diversen Unterzuständen der offenen Konformation fluktuiert.

A Anhang

A.1 Untersuchung von Protein Ligand-Bindungswechselwirkungen

A.1.1 Spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkungen

ATTO 647N: Vor und nach Zugabe von HWu180

ATTO 647N: Vor und nach Zugabe von BM1

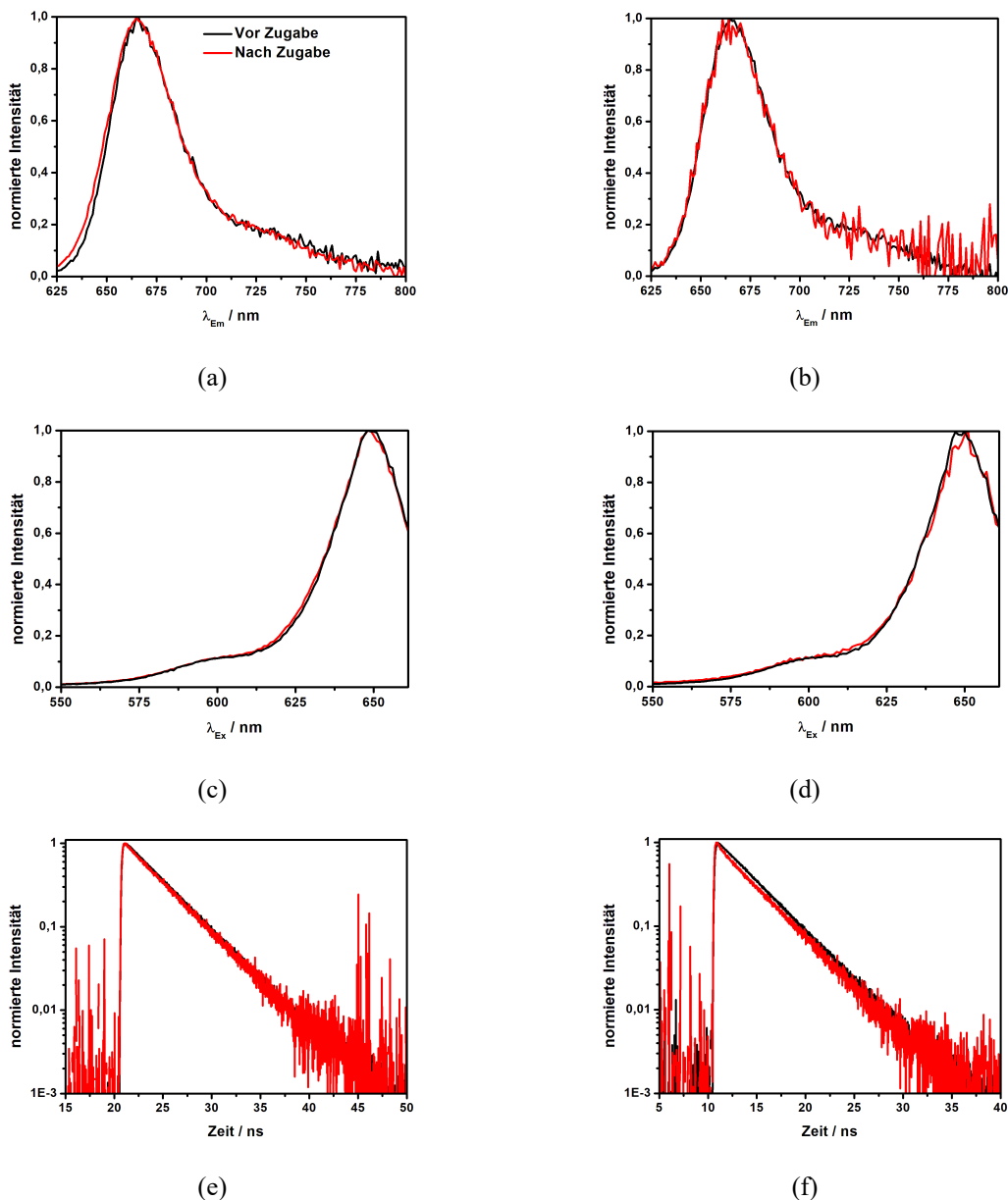
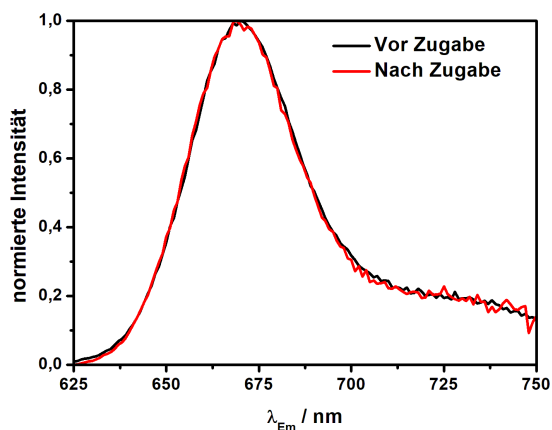


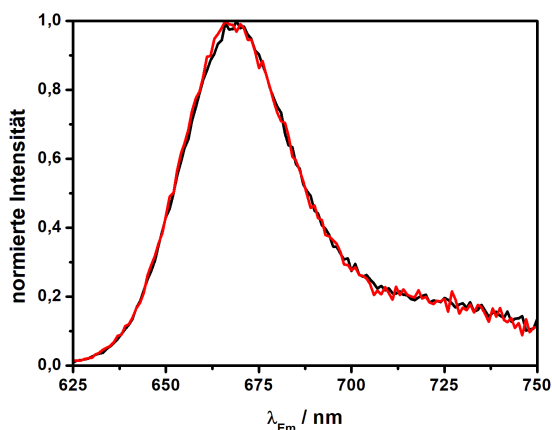
Abbildung A. 1: Ergebnisse der ensemblespektroskopischen Untersuchungen am freien ATTO 647N Farbstoff jeweils vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von HWu180 (links) bzw. BM1 (rechts). Dargestellt sind jeweils die normierten Emissions- (a, b) und Anregungsspektren (c, d) sowie die normierten Fluoreszenzzerfälle (e, f). Die zur Durchführung der Ensemblemessungen verwendeten Messparameter können Tabelle 10 entnommen werden. Entgegen den Angaben aus Tabelle 10 betrug die Akkumulationszeit zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurve in An- und Abwesenheit von HWu180 300 s. Auch die Anregungswellenlänge wurde in diesem Fall auf 633 nm geändert.

G14C-Cy5: Vor und nach Zugabe von HWu180

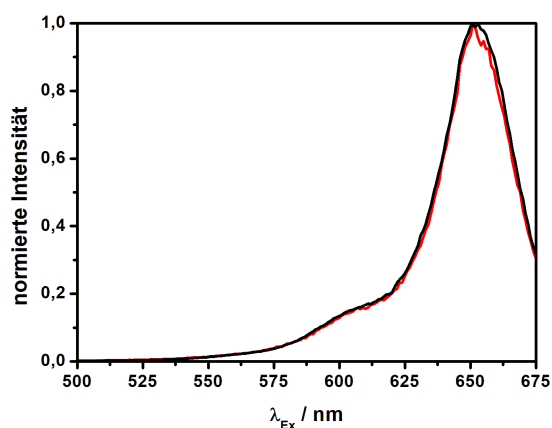


(a)

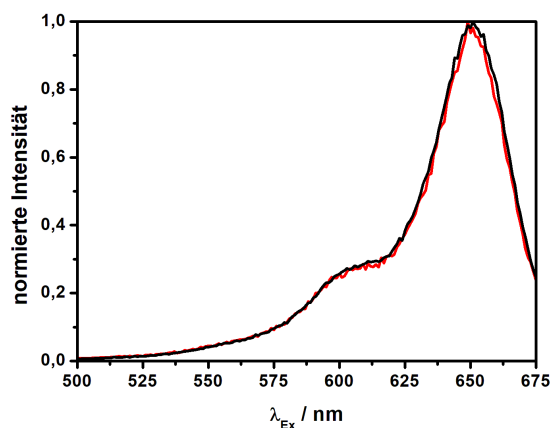
S79C-Cy5: Vor und nach Zugabe von HWu180



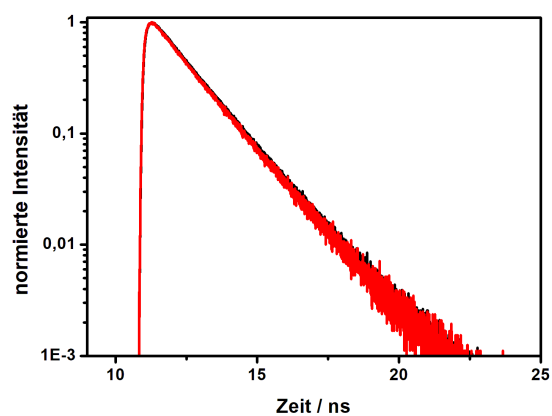
(b)



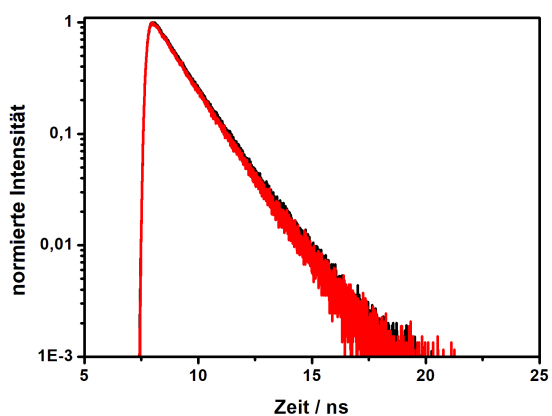
(c)



(d)



(e)



(f)

Abbildung A. 2: Ergebnisse der ensemblespektroskopischen Untersuchungen an den mit Cy5 markierten Cystein-Einzelmutanten G14C (links) und S79C (rechts) jeweils vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von HWu180. Dargestellt sind jeweils die normierten Emissions- (a, b) und Anregungsspektren (c, d) sowie die normierten Fluoreszenzzerfälle (e, f). Die zur Durchführung der Ensemblemessungen verwendeten Messparameter können Tabelle 10 entnommen werden. Entgegen den Angaben aus Tabelle 10 betrug die Akkumulationszeit zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven des G14C-Cy5-Probensystems in An- und Abwesenheit von HWu180 150 s. Auch die Integrationszeit zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde in diesem Fall auf 1 s geändert.

A.1.2 Spektroskopische Titration

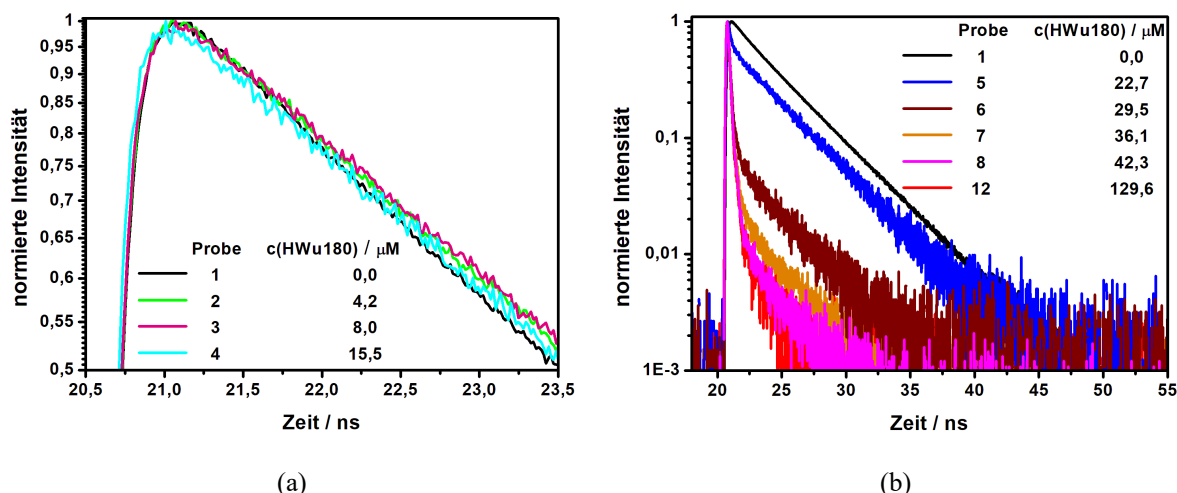


Abbildung A. 3: Fluoreszenzzerfälle der mit ATTO 647N markierten Cystein-Einzelmutante G14C, welche im Rahmen der spektroskopischen Titration mit HWu180 aufgenommen wurden. Teilabbildung (a) zeigt die zu Beginn der Titrierreihe (Proben 2 und 3) beobachtete Verlangsamung des Fluoreszenzabklingverhaltens, ehe mit Probe 4 eine leichte Beschleunigung einsetzt. Das Ausmaß der Beschleunigung korreliert sodann stark mit der Konzentration von HWu180, bis schließlich ab Probe 8 eine weitere Erhöhung der Inhibitorkonzentration keine zusätzliche Beschleunigung des Fluoreszenzzerfalles induziert (b). Die zur Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven verwendeten Messparameter können Tabelle 12 entnommen werden. Tabelle 13 liefert einen Überblick über die Konzentrationen des Enzyms sowie des Liganden HWu180, welche an den einzelnen Titrationspunkten in der Präzisionsküvette vorlagen.

A.1.3 FCS-Bindestudien

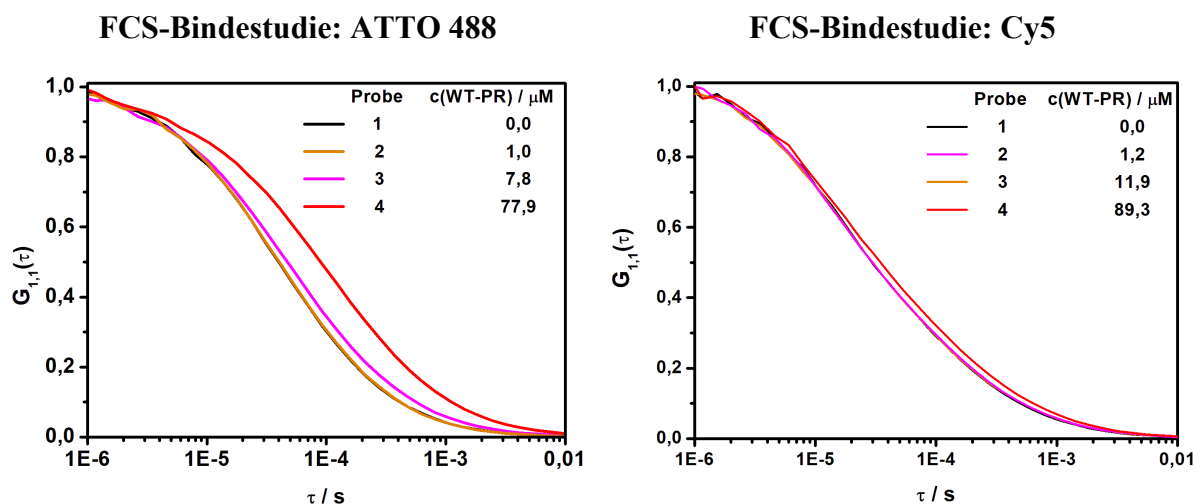


Abbildung A. 4: Normierte Autokorrelationsfunktionen $G_{1,1}(\tau)$ der Fluorophore ATTO 488 (links) und Cy5 (rechts) in Abwesenheit (Probe 1) sowie in Anwesenheit steigender Konzentrationen der nicht-markierten WT-PR (Proben 2 bis 4). Die Messparameter, welche zur Durchführung beider Bindestudien Verwendung fanden, entsprechen jenen Einstellungen, die zur Umsetzung der FCS-Bindestudien 1 (ATTO 488) bzw. 2 (Cy5) angewandt wurden und in Tabelle 17 aufgeführt werden. Tabelle 18 liefert einen Überblick über die Konzentrationen der unterschiedlichen Komponenten, welche während der beiden FCS-Bindestudien an den einzelnen Titrationspunkten in den Probenzellen vorlagen. Hierbei entsprechen die in der Tabelle aufgelisteten Konzentrationen von AG124 bzw. HM076 den jeweils eingesetzten Konzentrationen von ATTO 488 bzw. Cy5.

A.2 Untersuchung der Proteindynamik

A.2.1 FRET-Paar markierte dsDNA: Spektroskopische Charakterisierung

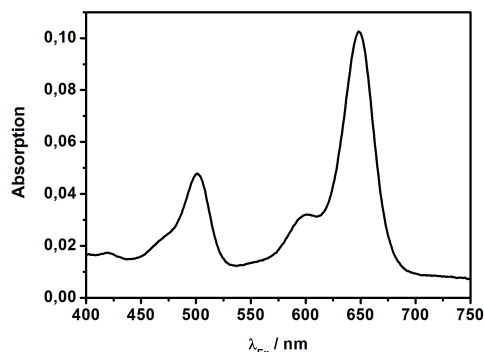


Abbildung A. 5: Absorptionsspektrum einer 1:1-Mischung der beiden jeweils mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten DNA-Doppelstrang-Proben dsDNA-1 und dsDNA-2 in Tris-EDTA-Puffer. Beide dsDNA-Proben lagen jeweils mit einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{mol/L}$ in der Mischung vor, sodass die theoretische Gesamtkonzentration an ATTO 488 und ATTO 647N jeweils 0,50 $\mu\text{mol/L}$ betragen sollte. Mithilfe der vom Farbstoffhersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} der beiden Farbstoffe (siehe Tabelle 1) können unter Zuhilfenahme des Gesetzes von Lambert und Beer die tatsächlich vorliegenden Konzentrationen beider Fluorophore abgeschätzt werden:

$$c_{ATTO\ 488} = \frac{A_{max,ATTO\ 488}}{\epsilon_{max,ATTO\ 488} \cdot d} = \frac{0,048}{90\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1\ \text{cm}} = 0,53\ \mu\text{M}$$

$$c_{ATTO\ 647N} = \frac{A_{max,ATTO\ 647N}}{\epsilon_{max,ATTO\ 647N} \cdot d} = \frac{0,102}{150\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1\ \text{cm}} = 0,69\ \mu\text{M}$$

Hierbei entspricht d der Länge der verwendeten Absorptionsküvette und A_{max} der Absorption am jeweiligen Absorptionsmaximum. Die Messparameter, welche zur Aufnahme des Absorptionsspektrums Verwendung fanden, können Kapitel 3.3.1 entnommen werden.

A.2.2 FRET-Paar markierte PRs: Spektroskopische Charakterisierung

Zur ensemblespektroskopischen Charakterisierung der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR wurden Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren des jeweiligen Probensystems in Assay-Puffer, welcher zusätzlich 10 Vol.-% DMSO enthielt, aufgenommen. Hierbei lagen die beiden FRET-Paar markierten Konstrukte S79C-S158C A und S79C-S158C B in Assay-Puffer 2 vor, wohingegen die FRET-Paar markierte S79C-G14C-Doppelmutante in Assay-Puffer 1 gelöst war. Tabelle A. 1 fasst die zur Ensemblecharakterisierung gewählten Enzymkonzentrationen zusammen.

Tabelle A. 1: Zusammenfassung der im Rahmen der ensemblespektroskopischen Charakterisierung verwendeten Konzentrationen der drei FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten der DENV-2-PR.

| Probe | Konzentration / μM |
|--------------|-------------------------------|
| S79C-G14C | 0,82 |
| S79C-S158C A | 0,95 |
| S79C-S158C B | 0,72 |

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wurden 600 μL der jeweiligen PR-Lösung in eine Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics, Länge: 1 cm) überführt. Anschließend wurden

A.2 Untersuchung der Proteindynamik

die Absorptionsspektren mit dem Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometer Lambda 850 (PerkinElmer) aufgenommen. Die Messparameter, welche hierbei Verwendung fanden, können Kapitel 3.3.1 entnommen werden.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren wurden 50 μL der jeweiligen PR-Lösung in einer Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics) vorgelegt. Anschließend wurden die Emissionsspektren in einer 90° Geometrie mit dem Spektrofluorometer FluoroLog-3 (Horiba Jobin-Yvon) gemessen. Hierbei wurde jeweils eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Die spektralen Bandbreiten des Anregungs- und Emissionsmonochromators wurden auf 1 nm eingestellt. Die Integrationszeit betrug bei einer Schrittweite von 1 nm stets 1,0 s.

Abbildung A. 6 liefert einen Überblick über die Absorptions- und Emissionsspektren der drei FRET-Paar markierten Proteinkonstrukte.

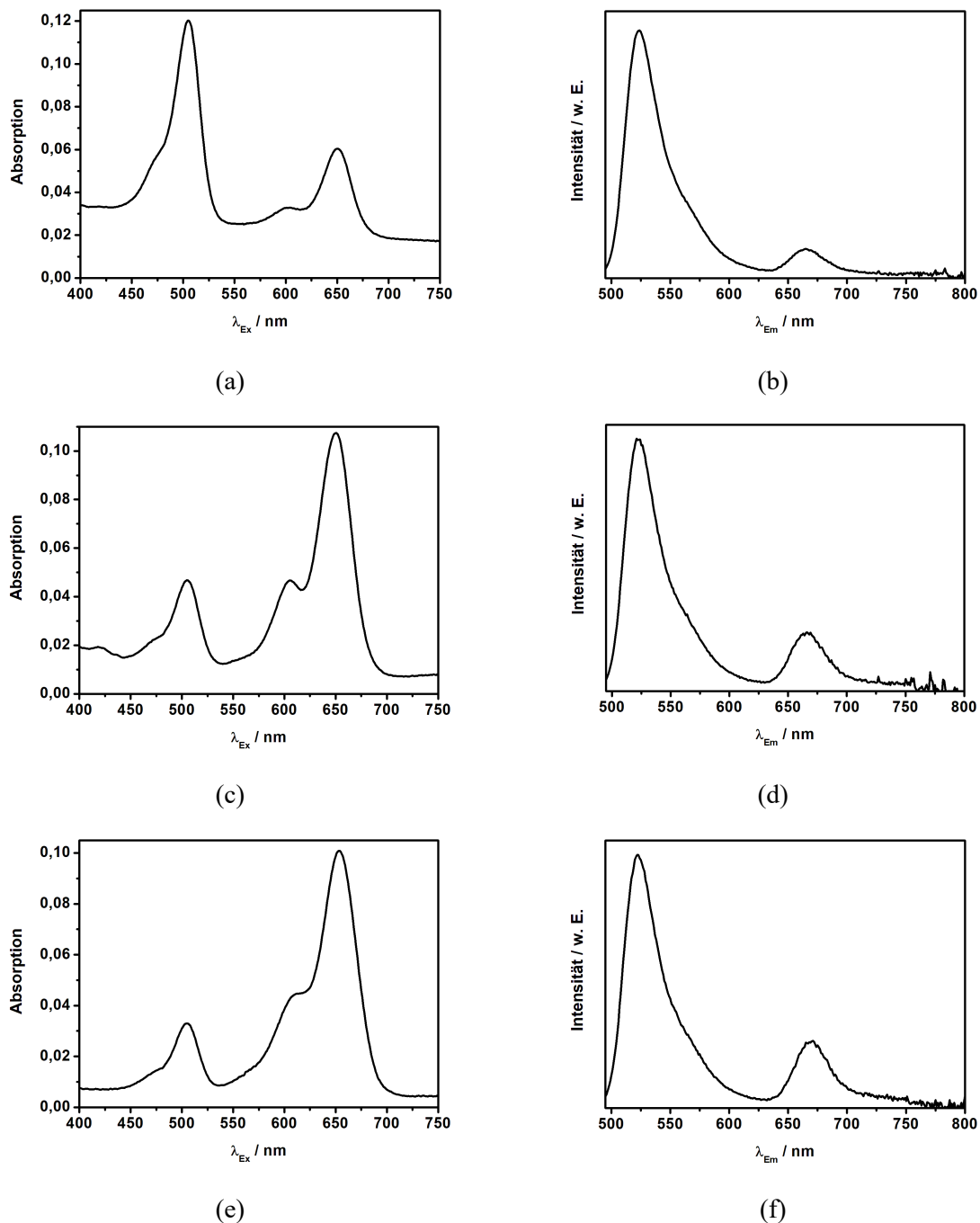


Abbildung A. 6: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutanten S79C-G14C (a, b), S79C-S158C A (c, d) und S79C-S158C B (e, f).

A.2.3 FRET-Paar markierte PRs: TCSPC-Messungen im Ensemble

In Ergänzung zu den smFRET-Experimenten an den frei in Lösung diffundierenden FRET-Paar markierten Doppelmutanten der DENV-2-PR wurde jedes der in Tabelle 21 aufgelisteten Proben-systeme, jeweils vor und nach Zugabe des entsprechenden Liganden, zusätzlich mithilfe eines zeitaufgelösten Ensembleexperimentes charakterisiert. Hierdurch sollte eruiert werden, ob die im Einzelmolekülexperiment beobachteten Effekte, welche durch die Zugabe der unterschiedlichen Liganden induziert wurden, auch auf Ensemble-Ebene nachgewiesen werden können. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung der entsprechenden Versuche kann dem Kapitel 3.4.2.2 entnommen werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der TCSPC-Messungen vorgestellt. Im Speziellen werden die Fluoreszenzabklingkurven des Akzeptors, welche infolge einer gepulsten Anregung des Donor-Fluorophors sowohl vor als auch nach Zugabe des jeweiligen Liganden registriert wurden, miteinander verglichen. Hierzu werden die Fluoreszenzzerfälle, welche in An- und Abwesenheit des entsprechenden Liganden aufgenommen wurden, im Bereich des Langzeiterfalls, der gemäß Gleichung (26) ausschließlich durch die Fluoreszenzlebensdauer des Akzeptors bestimmt wird, übereinandergelegt.

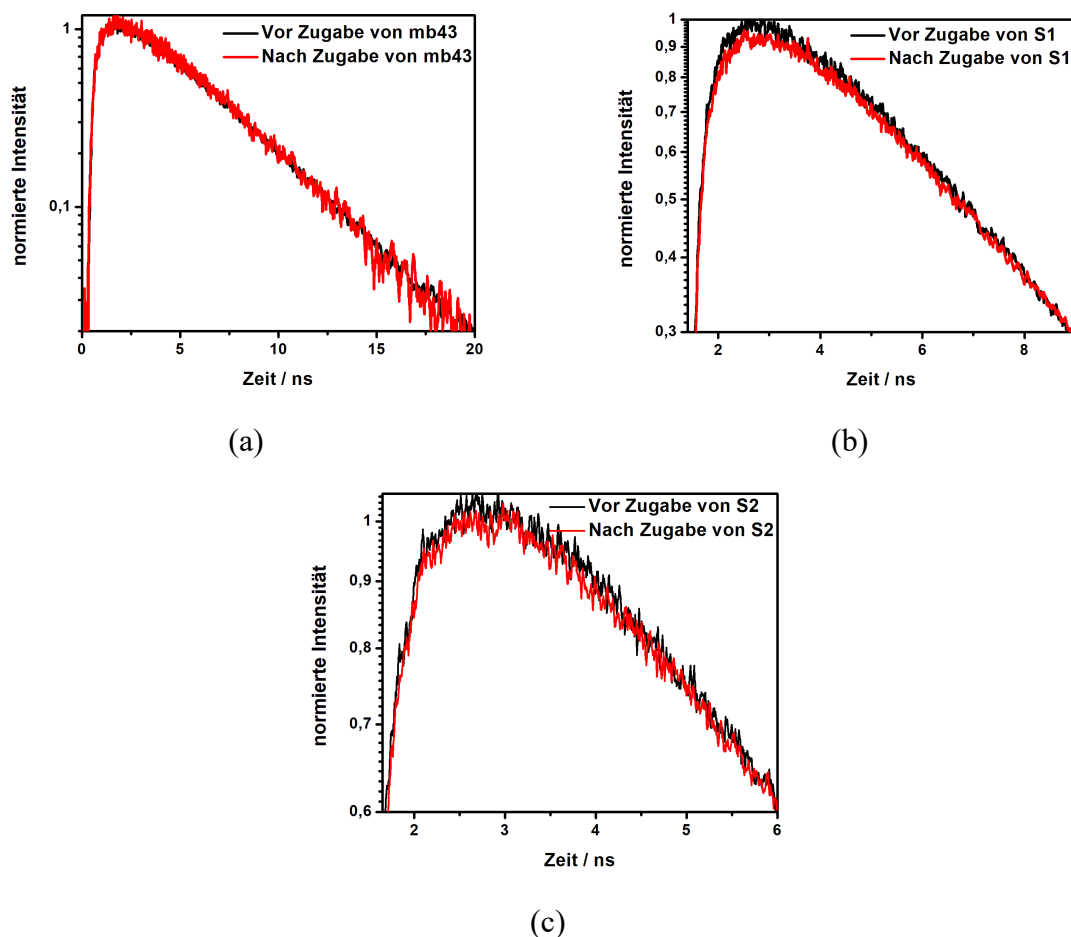


Abbildung A. 7: Fluoreszenzabklingkurven der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Cystein-Doppelmutante S79C-G14C der DENV-2-PR. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzzerfälle des Akzeptors, welche infolge der Anregung des Donors vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von mb43 (a), S1 (b) bzw. S2 (c) aufgezeichnet wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Abklingkurven jeweils im Bereich des Langzeiterfalls übereinandergelegt.

Abbildung A. 7 liefert einen Überblick über die entsprechenden Fluoreszenzzerfälle der FRET-Paar markierten Cystein-Doppelmutante S79C-G14C jeweils vor und nach Zugabe von mb43 (a), S1 (b) bzw. S2 (c). Hierbei scheint die Zugabe von mb43 keine signifikante Veränderung der Fluoreszenzabklingkurve zu induzieren, sodass die im smFRET-Experiment

beobachtete Stabilisierung der geschlossenen Konformation mithilfe des ergänzend durchgeführten zeitaufgelösten Ensembleexperimentes nicht nachgewiesen werden kann. Dahingegen führt die Zugabe der beiden Substrate jeweils zu einem signifikant langsameren Anstieg der Akzeptor-Emission, was gemäß Gleichung (26) auf einen ineffizienteren Energietransfer schließen lässt. Diese Beobachtung ist, wie Tabelle 5 entnommen werden kann, kompatibel mit einer Stabilisierung des geschlossenen Zustandes des Enzyms und bestätigt somit die Ergebnisse der smFRET-Experimente.

Abbildung A. 8 fasst die Fluoreszenzzerfälle der mit dem FRET-Paar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C, welche jeweils vor und nach Zugabe von mb43 (a), S1 (b) bzw. S2 (c) aufgenommen wurden, zusammen.

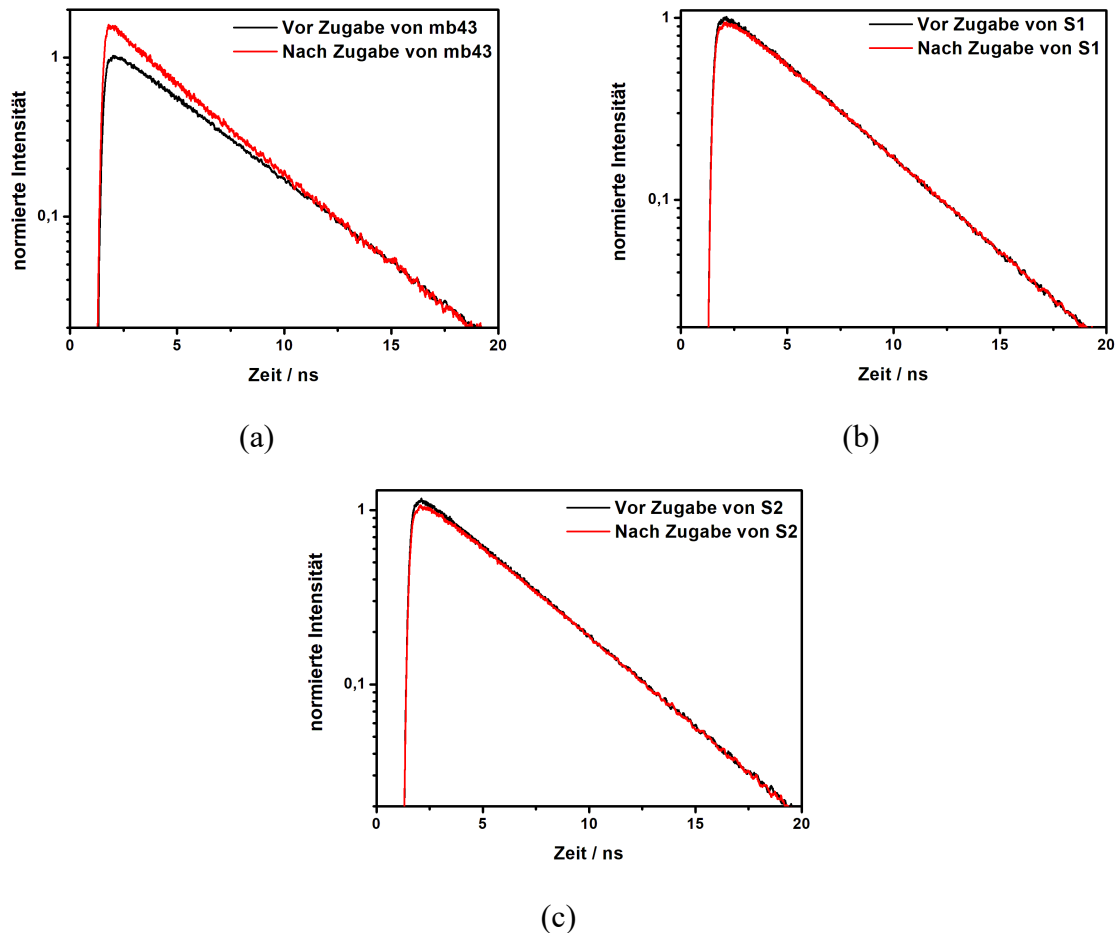


Abbildung A. 8: Fluoreszenzabklingkurven der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / ATTO 647N markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzzerfälle des Akzeptors, welche infolge der Anregung des Donors vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von mb43 (a), S1 (b) bzw. S2 (c) aufgezeichnet wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Abklingkurven jeweils im Bereich des Langzeiterfalls übereinandergelegt.

Offenkundig bedingt die Zugabe von mb43 einen erheblich beschleunigten Anstieg der Akzeptor-Emission, was entsprechend Gleichung (26) auf einen effizienteren Energietransfer schließen lässt. Diese Beobachtung wiederum ist gemäß Tabelle 5 kompatibel mit einer Stabilisierung des geschlossenen Zustandes des Enzyms und bestätigt somit die Ergebnisse der smFRET-Experimente. Im Gegensatz hierzu scheint die Zugabe der Substrate S1 bzw. S2 jeweils einen etwas langsameren Anstieg der Akzeptor-Emission und damit gemäß Gleichung (26) eine Verringerung der Energietransfereffizienz zu induzieren. Demnach kann die im smFRET-Experiment als Resultat der Ligandenzugabe beobachtete Stabilisierung der geschlossenen Konformation mithilfe des zeitaufgelösten Ensembleexperimentes nicht nachgewiesen werden.

Abbildung A. 9 fasst die Fluoreszenzzerfälle der mit dem FRET-Paar ATTO 488 / Cy5 markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C, welche jeweils vor und nach Zugabe von mb43 (a), S1 (b), S2 (c) bzw. BM214 (d) aufgenommen wurden, zusammen.

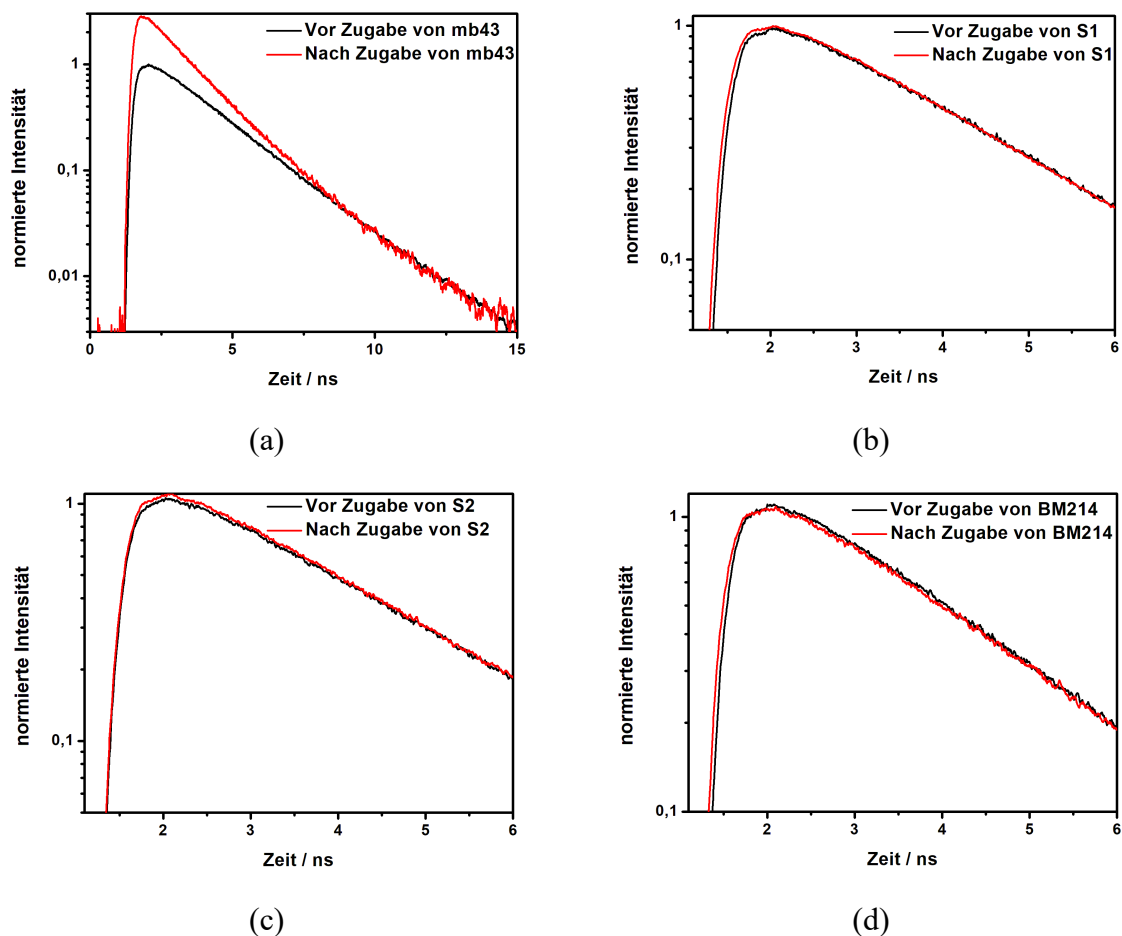


Abbildung A. 9: Fluoreszenzabklingkurven der mit dem FRET-Farbstoffpaar ATTO 488 / Cy5 markierten Cystein-Doppelmutante S79C-S158C der DENV-2-PR. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzzerfälle des Akzeptors, welche infolge der Anregung des Donors vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von mb43 (a), S1 (b), S2 (c) bzw. BM214 (d) aufgezeichnet wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Abklingkurven jeweils im Bereich des Langzeitzerfalls übereinandergelegt.

In Analogie zu den Ergebnissen, welche an S79C-S158C A erzielt wurden, bedingt die Zugabe von mb43 auch in diesem Falle einen signifikant beschleunigten Anstieg der Akzeptor-Emission, was abermals auf eine Steigerung der FRET-Effizienz schließen lässt. Diese Beobachtung wiederum ist gemäß Tabelle 5 kompatibel mit einer Stabilisierung des geschlossenen Zustandes des Enzyms und steht somit im Einklang mit den Ergebnissen, welche im Rahmen der smFRET-Experimente erhalten wurden. Ebenfalls führt die Zugabe der beiden Substrate jeweils zu einer leichten, aber signifikanten Beschleunigung des Anstiegs der Akzeptor-Emission, sodass auch in diesem Fall auf eine Steigerung der Energietransfereffizienz und damit auf eine Stabilisierung der aktiven Konformation geschlossen werden kann. Folglich können auch diese beiden Ensemble-Messungen die Ergebnisse der korrespondierenden smFRET-Experimente bestätigen. Wider Erwarten scheint jedoch die Zugabe des allosterischen Inhibitors BM214 ebenfalls einen leicht beschleunigten Anstieg der Akzeptor-Emission und damit eine Steigerung der Energietransfereffizienz zu induzieren. Demnach kann die im smFRET-Experiment als Resultat der Ligandenzugabe beobachtete Stabilisierung der offenen Konformation mithilfe des zeitaufgelösten Ensembleexperimentes nicht nachgewiesen werden.

Literatur

- [1] T. C. Winegard, *Die Mücke: Das gefährlichste Tier der Welt und die Geschichte der Menschheit*, 1. Aufl. Salzburg, München: Terra Mater Books, 2020.
- [2] B. Gates, „The deadliest animal in the world: Sharks are wimps, compared to this beast.“, GatesNotes, Apr. 2014. [Online] Verfügbar unter: <https://www.gatesnotes.com/Health/Most-Lethal-Animal-Mosquito-Week>. Zugriff am: 12. November 2022 um 10:57.
- [3] J.-W. Ai, Y. Zhang und W. Zhang, „Zika virus outbreak: 'a perfect storm'“, *Emerging microbes & infections*, Jg. 5, e21, 2016.
- [4] H. Sakkas, P. Bozidis, X. Giannakopoulos, N. Sofikitis und C. Papadopoulou, „An Update on Sexual Transmission of Zika Virus“, *Pathogens (Basel, Switzerland)*, Jg. 7, Nr. 3, 2018.
- [5] M. Blasberg, H. Goos und V. Hackenbroch, „Das gefährlichste Tier der Welt: Die tödliche Invasion der Mücken“, *DER SPIEGEL*, S. 44–53, 16 Jul., 2016.
- [6] H. Dahmana und O. Mediannikov, „Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically“, *Pathogens (Basel, Switzerland)*, Jg. 9, Nr. 4, 2020.
- [7] A. Aggarwal und N. Garg, „Newer Vaccines against Mosquito-borne Diseases“, *Indian journal of pediatrics*, Jg. 85, Nr. 2, S. 117–123, 2018.
- [8] „Chapter 2 - Mosquito-Borne Diseases“ in *Zika Virus Disease*, A. I. Qureshi, Hg., Academic Press, 2018, S. 27–45.
- [9] H. Caraballo und K. King, „Emergency department management of mosquito-borne illness: Malaria, dengue, and West Nile virus“, *Emergency medicine practice*, Jg. 16, Nr. 5, 1-23; quiz 23-4, 2014.
- [10] World Health Organization, *World malaria report 2021*. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [11] P. Makam und R. Matsa, „'Big Three' Infectious Diseases: Tuberculosis, Malaria and HIV/AIDS“, *Current topics in medicinal chemistry*, Jg. 21, Nr. 31, S. 2779–2799, 2021.
- [12] L. Braack, A. P. Gouveia de Almeida, A. J. Cornel, R. Swanepoel und C. de Jager, „Mosquito-borne arboviruses of African origin: Review of key viruses and vectors“, *Parasites & vectors*, Jg. 11, Nr. 1, 2018.
- [13] J. P. Messina *et al.*, „The current and future global distribution and population at risk of dengue“, *Nature microbiology*, Jg. 4, Nr. 9, S. 1508–1515, 2019.
- [14] M. G. Guzman und E. Harris, „Dengue“, *The Lancet*, Jg. 385, Nr. 9966, S. 453–465, 2015.

- [15] World Health Organization, *Dengue and severe dengue*. [Online] Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (Zugriff am: 6. März 2021).
- [16] S. Bhatt *et al.*, „The global distribution and burden of dengue“, *Nature*, Jg. 496, Nr. 7446, S. 504–507, 2013.
- [17] J. D. Stanaway *et al.*, „The global burden of dengue: An analysis from the Global Burden of Disease Study 2013“, *The Lancet Infectious Diseases*, Jg. 16, Nr. 6, S. 712–723, 2016.
- [18] N. E. A. Murray, M. B. Quam und A. Wilder-Smith, „Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects“, *Clinical epidemiology*, Jg. 5, S. 299–309, 2013.
- [19] D. S. Shepard, L. Coudeville, Y. A. Halasa, B. Zambrano und G. H. Dayan, „Economic impact of dengue illness in the Americas“, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Jg. 84, Nr. 2, S. 200–207, 2011.
- [20] D. Mavalankar, S. Vasan, T. Puwar und T. Murtola, „Quantifying the Impact of Chikungunya and Dengue on Tourism Revenues“, *IIMA Working Papers*, No. 2009-02-03, 2009.
- [21] C. Nitsche, „Proteases from dengue, West Nile and Zika viruses as drug targets“, *Biophysical reviews*, Jg. 11, Nr. 2, S. 157–165, 2019.
- [22] M. E. Hill, M. Yildiz und J. A. Hardy, „Cysteine Disulfide Traps Reveal Distinct Conformational Ensembles in Dengue Virus NS2B-NS3 Protease“, *Biochemistry*, Jg. 58, Nr. 6, S. 776–787, 2019.
- [23] J. G. Low, R. Gatsinga, S. G. Vasudevan und A. Sampath, „Dengue Antiviral Development: A Continuing Journey“, *Advances in experimental medicine and biology*, Jg. 1062, S. 319–332, 2018.
- [24] S. J. Kaptein und J. Neyts, „Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections“, *Current opinion in pharmacology*, Jg. 30, S. 1–7, 2016.
- [25] J. Whitehorn *et al.*, „Dengue therapeutics, chemoprophylaxis, and allied tools: State of the art and future directions“, *PLoS neglected tropical diseases*, Jg. 8, Nr. 8, e3025, 2014.
- [26] M. Brecher, J. Zhang und H. Li, „The flavivirus protease as a target for drug discovery“, *Virologica Sinica*, Jg. 28, Nr. 6, S. 326–336, 2013.
- [27] M. Brecher *et al.*, „A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease“, *PLoS pathogens*, Jg. 13, Nr. 5, e1006411, 2017.
- [28] M. Yildiz, S. Ghosh, J. A. Bell, W. Sherman und J. A. Hardy, „Allosteric inhibition of the NS2B-NS3 protease from dengue virus“, *ACS chemical biology*, Jg. 8, Nr. 12, S. 2744–2752, 2013.
- [29] B. Millies *et al.*, „Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases“, *Journal of medicinal chemistry*, Jg. 62, Nr. 24, S. 11359–11382, 2019.
- [30] M. P. Gleeson, A. Hersey, D. Montanari und J. Overington, „Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters“, *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 10, Nr. 3, S. 197–208, 2011.

- [31] D. J. Huggins, W. Sherman und B. Tidor, „Rational approaches to improving selectivity in drug design“, *Journal of medicinal chemistry*, Jg. 55, Nr. 4, S. 1424–1444, 2012.
- [32] W. Keighley, „The need for high throughput kinetics early in the drug discovery process“, *Drug Discovery World*, S. 39–45, 2011.
- [33] A. C. Pan, D. W. Borhani, R. O. Dror und D. E. Shaw, „Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics“, *Drug discovery today*, Jg. 18, 13-14, S. 667–673, 2013.
- [34] G. Vauquelin, S. Bostoen, P. Vanderheyden und P. Seeman, „Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D2 dopamine receptor antagonism“, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, Jg. 385, Nr. 4, S. 337–372, 2012.
- [35] M. Sorokina, H.-R. Koh, S. S. Patel und T. Ha, „Fluorescent lifetime trajectories of a single fluorophore reveal reaction intermediates during transcription initiation“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 131, Nr. 28, S. 9630–9631, 2009.
- [36] A. S. Klymchenko, „Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications“, *Accounts of chemical research*, Jg. 50, Nr. 2, S. 366–375, 2017.
- [37] F. Spenkuch *et al.*, „Dye label interference with RNA modification reveals 5-fluorouridine as non-covalent inhibitor“, *Nucleic acids research*, Jg. 42, Nr. 20, S. 12735–12745, 2014.
- [38] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer und D.-P. Hertel, „Direct monitoring of formation and dissociation of individual metal complexes by single-molecule fluorescence spectroscopy“, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, Jg. 46, Nr. 18, S. 3363–3366, 2007.
- [39] R. A. Marko *et al.*, „Binding kinetics and affinities of heterodimeric versus homodimeric HIV-1 reverse transcriptase on DNA-DNA substrates at the single-molecule level“, *The journal of physical chemistry. B*, Jg. 117, Nr. 16, S. 4560–4567, 2013.
- [40] X. S. Xie und H. P. Lu, „Single-molecule enzymology“, *The Journal of biological chemistry*, Jg. 274, Nr. 23, S. 15967–15970, 1999.
- [41] S. Weiss, „Fluorescence spectroscopy of single biomolecules“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 283, Nr. 5408, S. 1676–1683, 1999.
- [42] V. Buschmann, K. D. Weston und M. Sauer, „Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes“, *Bioconjugate chemistry*, Jg. 14, Nr. 1, S. 195–204, 2003.
- [43] M. Levitus und S. Ranjit, „Cyanine dyes in biophysical research: The photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments“, *Quarterly reviews of biophysics*, Jg. 44, Nr. 1, S. 123–151, 2011.
- [44] N. Marmé, J.-P. Knemeyer, M. Sauer und J. Wolfrum, „Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan“, *Bioconjugate chemistry*, Jg. 14, Nr. 6, S. 1133–1139, 2003.
- [45] M. Dal Molin *et al.*, „Fluorescent flippers for mechanosensitive membrane probes“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 137, Nr. 2, S. 568–571, 2015.
- [46] D. A. Doval *et al.*, „Planarizable push–pull oligothiophenes: In search of the perfect twist“, *Chem. Sci.*, Jg. 5, Nr. 7, S. 2819–2825, 2014.

- [47] C. G. Hübner, A. Renn, I. Renge und U. P. Wild, „Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 115, Nr. 21, S. 9619–9622, 2001.
- [48] F. Köhn, J. Hofkens, R. Gronheid, M. van der Auweraer und F. C. de Schryver, „Parameters Influencing the On- and Off-Times in the Fluorescence Intensity Traces of Single Cyanine Dye Molecules“, *J. Phys. Chem. A*, Jg. 106, Nr. 19, S. 4808–4814, 2002.
- [49] M. S. Dietz, S. S. Wehrheim, M.-L. I. E. Harwardt, H. H. Niemann und M. Heilemann, „Competitive Binding Study Revealing the Influence of Fluorophore Labels on Biomolecular Interactions“, *Nano letters*, Jg. 19, Nr. 11, S. 8245–8249, 2019.
- [50] S. Ly *et al.*, „Quantifying interactions of a membrane protein embedded in a lipid nanodisc using fluorescence correlation spectroscopy“, *Biophysical Journal*, Jg. 106, Nr. 2, L05-8, 2014.
- [51] T. Wohland, K. Friedrich, R. Hovius und H. Vogel, „Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores: Evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand“, *Biochemistry*, Jg. 38, Nr. 27, S. 8671–8681, 1999.
- [52] C. Götz *et al.*, „Conformational Dynamics of the Dengue Virus Protease Revealed by Fluorescence Correlation and Single-Molecule FRET Studies“, *The journal of physical chemistry. B*, Jg. 125, Nr. 25, S. 6837–6846, 2021.
- [53] Q. Li und C. Kang, „Insights into Structures and Dynamics of Flavivirus Proteases from NMR Studies“, *International journal of molecular sciences*, Jg. 21, Nr. 7, 2020.
- [54] C. G. Noble und P.-Y. Shi, „Structural biology of dengue virus enzymes: Towards rational design of therapeutics“, *Antiviral research*, Jg. 96, Nr. 2, S. 115–126, 2012.
- [55] J.-P. Renaud, *Structural biology in drug discovery: Methods, techniques, and practices*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2020.
- [56] A. Yazhini, S. Chakraborti und N. Srinivasan, „Protein Structure, Dynamics and Assembly: Implications for Drug Discovery“ in *Innovations and Implementations of Computer Aided Drug Discovery Strategies in Rational Drug Design*, S. K. Singh, Hg., Singapore: Springer Singapore, 2021, S. 91–122.
- [57] E. Moroni, A. Paladino und G. Colombo, „The Dynamics of Drug Discovery“, *Current topics in medicinal chemistry*, Jg. 15, Nr. 20, S. 2043–2055, 2015.
- [58] A. Roy, L. Lim, S. Srivastava, Y. Lu und J. Song, „Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants“, *PloS one*, Jg. 12, Nr. 7, e0180632, 2017.
- [59] L. Zhu *et al.*, „Conformational change study of dengue virus NS2B-NS3 protease using 19F NMR spectroscopy“, *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 461, Nr. 4, S. 677–680, 2015.
- [60] C. Nitsche, S. Holloway, T. Schirmeister und C. D. Klein, „Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease“, *Chemical reviews*, Jg. 114, Nr. 22, S. 11348–11381, 2014.
- [61] C. G. Noble, C. C. Seh, A. T. Chao und P. Y. Shi, „Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation“, *Journal of virology*, Jg. 86, Nr. 1, S. 438–446, 2012.

- [62] L. de La Cruz *et al.*, „Binding of low molecular weight inhibitors promotes large conformational changes in the dengue virus NS2B-NS3 protease: Fold analysis by pseudocontact shifts“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 133, Nr. 47, S. 19205–19215, 2011.
- [63] M. A. M. Behnam und C. D. P. Klein, „Conformational selection in the flaviviral NS2B-NS3 protease“, *Biochimie*, Jg. 174, S. 117–125, 2020.
- [64] H. Maus, G. Hinze, S. J. Hammerschmidt, T. Basché und T. Schirmeister, „A competition smFRET assay to study ligand-induced conformational changes of the dengue virus protease“, *Protein Science*, Jg. 32, Nr. 1, e4526, 2023.
- [65] C. Bräuchle, D. C. Lamb und J. Michaelis, Hg., *Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer*. Wiley, 2009.
- [66] T. Ha *et al.*, „Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 96, Nr. 3, S. 893–898, 1999.
- [67] Y. Santoso *et al.*, „Conformational transitions in DNA polymerase I revealed by single-molecule FRET“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 107, Nr. 2, S. 715–720, 2010.
- [68] M. Ruer, G. Krainer, P. Gröger und M. Schlierf, „ATPase and Protease Domain Movements in the Bacterial AAA+ Protease FtsH Are Driven by Thermal Fluctuations“, *Journal of Molecular Biology*, Jg. 430, Nr. 22, S. 4592–4602, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283618308258>, 2018.
- [69] G. Gouridis *et al.*, „Conformational dynamics in substrate-binding domains influences transport in the ABC importer GlnPQ“, *Nature structural & molecular biology*, Jg. 22, Nr. 1, S. 57–64, 2015.
- [70] T. Ha *et al.*, „Ligand-induced conformational changes observed in single RNA molecules“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 96, Nr. 16, S. 9077–9082, 1999.
- [71] H. D. Kim *et al.*, „Mg²⁺-dependent conformational change of RNA studied by fluorescence correlation and FRET on immobilized single molecules“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 99, Nr. 7, S. 4284–4289, 2002.
- [72] A. Miyawaki *et al.*, „Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin“, *Nature*, Jg. 388, Nr. 6645, S. 882–887, 1997.
- [73] E. S. Price, M. S. DeVore und C. K. Johnson, „Detecting intramolecular dynamics and multiple Förster resonance energy transfer states by fluorescence correlation spectroscopy“, *The journal of physical chemistry. B*, Jg. 114, Nr. 17, S. 5895–5902, 2010.
- [74] L. Voith von Voithenberg und D. C. Lamb, „Single Pair Förster Resonance Energy Transfer: A Versatile Tool To Investigate Protein Conformational Dynamics“, *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 40, Nr. 3, 2018.
- [75] S. Kalinin, A. Valeri, M. Antonik, S. Felekyan und C. A. M. Seidel, „Detection of structural dynamics by FRET: A photon distribution and fluorescence lifetime analysis of systems with multiple states“, *The journal of physical chemistry. B*, Jg. 114, Nr. 23, S. 7983–7995, 2010.

- [76] M. S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain und V. Gupta, „Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control“, *Medical journal, Armed Forces India*, Jg. 71, Nr. 1, S. 67–70, 2015.
- [77] G. Kuno, G. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos und C. B. Cropp, „Phylogeny of the genus *Flavivirus*“, *Journal of virology*, Jg. 72, Nr. 1, S. 73–83, 1998.
- [78] E. A. Gould und T. Solomon, „Pathogenic flaviviruses“, *The Lancet*, Jg. 371, Nr. 9611, S. 500–509, 2008.
- [79] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn und M. G. Rossmann, „A structural perspective of the flavivirus life cycle“, *Nature reviews. Microbiology*, Jg. 3, Nr. 1, S. 13–22, 2005.
- [80] P. Simmonds *et al.*, „ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae“, *The Journal of general virology*, Jg. 98, Nr. 1, S. 2–3, 2017.
- [81] T. Ishikawa, A. Yamanaka und E. Konishi, „A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available“, *Vaccine*, Jg. 32, Nr. 12, S. 1326–1337, 2014.
- [82] M. U. G. Kraemer *et al.*, „Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*“, *Nature microbiology*, Jg. 4, Nr. 5, S. 854–863, 2019.
- [83] D. J. Gubler, „Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever“, *Clin. Microbiol. Rev.*, Jg. 11, Nr. 3, S. 480–496, 1998.
- [84] O. J. Brady *et al.*, „Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus“, *PLoS neglected tropical diseases*, Jg. 6, Nr. 8, 2012.
- [85] World Health Organization, *Dengue: Guidelines for Diagnosis Treatment Prevention and Control (New Edition 2009)*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009.
- [86] J. P. Messina *et al.*, „Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history“, *Trends in microbiology*, Jg. 22, Nr. 3, S. 138–146, 2014.
- [87] T. P. Endy *et al.*, „Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand“, *PLoS neglected tropical diseases*, Jg. 5, Nr. 3, 2011.
- [88] C. P. Simmons, J. J. Farrar, V. C. van Nguyen und B. Wills, „Dengue“, *The New England journal of medicine*, Jg. 366, Nr. 15, S. 1423–1432, 2012.
- [89] J. J. Waggoner *et al.*, „Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus“, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, Jg. 63, Nr. 12, S. 1584–1590, 2016.
- [90] World Health Organization, *Global strategy for dengue prevention and control, 2012-2020*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012.
- [91] J. G. Rigau-Pérez *et al.*, „Dengue and dengue haemorrhagic fever“, *The Lancet*, Jg. 352, Nr. 9132, S. 971–977, 1998.
- [92] D. J. Gubler, „Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century“, *Tropical medicine and health*, Jg. 39, 4 Suppl, S. 3–11, 2011.
- [93] D. M. Watts, D. S. Burke, B. A. Harrison, R. E. Whitmire und A. Nisalak, „Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus“, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, Jg. 36, Nr. 1, S. 143–152, 1987.

- [94] D. J. Gubler *et al.*, „Climate variability and change in the United States: Potential impacts on vector- and rodent-borne diseases“, *Environmental health perspectives*, Jg. 109, Nr. 2, S. 223–233, 2001.
- [95] J. P. Messina *et al.*, „The many projected futures of dengue“, *Nature reviews. Microbiology*, Jg. 13, Nr. 4, S. 230–239, 2015.
- [96] E. van Kleef, H. Bambrick und S. Hales, „The geographic distribution of dengue fever and the potential influence of global climate change“, *TroIKA.net*, S. 1–22, 2010.
- [97] G. La Ruche *et al.*, „First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010“, *Euro Surveillance*, Jg. 15, Nr. 39, S. 19676, 2010.
- [98] J. Schmidt-Chanasit *et al.*, „Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany“, *Euro Surveillance*, Jg. 15, Nr. 40, 2010.
- [99] J. Lourenço und M. Recker, „The 2012 Madeira dengue outbreak: Epidemiological determinants and future epidemic potential“, *PLoS neglected tropical diseases*, Jg. 8, Nr. 8, e3083, 2014.
- [100] D. Altmann *et al.*, *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019*. Berlin: Robert Koch-Institut, 2020.
- [101] N. Becker *et al.*, „Repeated introduction of *Aedes albopictus* into Germany, July to October 2012“, *Parasitology research*, Jg. 112, Nr. 4, S. 1787–1790, 2013.
- [102] B. Pluskota *et al.*, „Successful overwintering of *Aedes albopictus* in Germany“, *Parasitology research*, Jg. 115, Nr. 8, S. 3245–3247, 2016.
- [103] F. Baldacchino *et al.*, „Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: A review“, *Pest management science*, Jg. 71, Nr. 11, S. 1471–1485, 2015.
- [104] F. J. Carod-Artal, O. Wichmann, J. Farrar und J. Gascón, „Neurological complications of dengue virus infection“, *The Lancet Neurology*, Jg. 12, Nr. 9, S. 906–919, 2013.
- [105] World Health Organization, *Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control*, 2. Aufl. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1997.
- [106] R. Rodriguez-Roche und E. A. Gould, „Understanding the dengue viruses and progress towards their control“, *BioMed research international*, Jg. 2013, 2013.
- [107] S. Kalayanarooj, „Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS“, *Tropical medicine and health*, Jg. 39, 4 Suppl, S. 83–87, 2011.
- [108] M. G. Guzman, D. J. Gubler, A. Izquierdo, E. Martinez und S. B. Halstead, „Dengue infection“, *Nature reviews. Disease primers*, Jg. 2, 2016.
- [109] J. L. Kyle und E. Harris, „Global spread and persistence of dengue“, *Annual review of microbiology*, Jg. 62, S. 71–92, 2008.
- [110] M. Recker *et al.*, „Immunological serotype interactions and their effect on the epidemiological pattern of dengue“, *Proceedings. Biological sciences*, Jg. 276, Nr. 1667, S. 2541–2548, 2009.
- [111] K. S. Vannice *et al.*, „Clinical development and regulatory points for consideration for second-generation live attenuated dengue vaccines“, *Vaccine*, Jg. 36, Nr. 24, S. 3411–3417, 2018.
- [112] L. Villar *et al.*, „Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America“, *The New England journal of medicine*, Jg. 372, Nr. 2, S. 113–123, 2015.

- [113] S. S. Whitehead, „Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine?“, *Expert review of vaccines*, Jg. 15, Nr. 4, S. 509–517, 2016.
- [114] S. R. Hadinegoro *et al.*, „Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease“, *The New England journal of medicine*, Jg. 373, Nr. 13, S. 1195–1206, 2015.
- [115] S.-Q. Deng *et al.*, „A Review on Dengue Vaccine Development“, *Vaccines*, Jg. 8, Nr. 1, 2020.
- [116] S. B. Halstead, „Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age“, *Vaccine*, Jg. 35, Nr. 47, S. 6355–6358, 2017.
- [117] World Health Organization, „Dengue vaccine: WHO position paper - September 2018“, *Weekly epidemiological record*, Jg. 93, Nr. 36, S. 457–476, 2018.
- [118] J. M. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert und J. Wilschut, „Flavivirus cell entry and membrane fusion“, *Viruses*, Jg. 3, Nr. 2, S. 160–171, 2011.
- [119] J. L. Slon Campos, J. Mongkolsapaya und G. R. Screaton, „The immune response against flaviviruses“, *Nature immunology*, Jg. 19, Nr. 11, S. 1189–1198, 2018.
- [120] D. M. Knipe und P. M. Howley, Hg., *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: *Fields Virology*, 5. Aufl. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007.
- [121] D. Sirohi *et al.*, „The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 352, Nr. 6284, S. 467–470, 2016.
- [122] A. Sampath und R. Padmanabhan, „Molecular targets for flavivirus drug discovery“, *Antiviral research*, Jg. 81, Nr. 1, S. 6–15, 2009.
- [123] C. Klein, „Antivirale Strategien. Dengue- und West-Nil-Virus“, *Pharmazie in unserer Zeit*, Jg. 39, Nr. 1, S. 50–53, 2010.
- [124] H. Maus, „Synthese und Testung von NS2B-NS3-Dengue- und -Zika- Virus-Protease-Inhibitoren“. Masterarbeit, Institut für Pharmazie und Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2019.
- [125] V. Boldescu, M. A. M. Behnam, N. Vasilakis und C. D. Klein, „Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond“, *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 16, Nr. 8, S. 565–586, 2017.
- [126] R. Perera, M. Khaliq und R. J. Kuhn, „Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design“, *Antiviral research*, Jg. 80, Nr. 1, S. 11–22, 2008.
- [127] N. J. Barrows *et al.*, „Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses“, *Chemical reviews*, Jg. 118, Nr. 8, S. 4448–4482, 2018.
- [128] A. T. Bäck und A. Lundkvist, „Dengue viruses - an overview“, *Infection ecology & epidemiology*, Jg. 3, 2013.
- [129] M.-D. Fernandez-Garcia, M. Mazzon, M. Jacobs und A. Amara, „Pathogenesis of flavivirus infections: Using and abusing the host cell“, *Cell host & microbe*, Jg. 5, Nr. 4, S. 318–328, 2009.
- [130] L. Lim, M. Dang, A. Roy, J. Kang und J. Song, „Curcumin Allosterically Inhibits the Dengue NS2B-NS3 Protease by Disrupting Its Active Conformation“, *ACS omega*, Jg. 5, Nr. 40, S. 25677–25686, 2020.

- [131] A. E. Shannon *et al.*, „Simultaneous uncoupled expression and purification of the Dengue virus NS3 protease and NS2B co-factor domain“, *Protein expression and purification*, Jg. 119, S. 124–129, 2016.
- [132] C. Nitsche, „Strategies Towards Protease Inhibitors for Emerging Flaviviruses“, *Advances in experimental medicine and biology*, Jg. 1062, S. 175–186, 2018.
- [133] F. von Hammerstein *et al.*, „Cis autocatalytic cleavage of glycine-linked Zika virus NS2B-NS3 protease constructs“, *FEBS letters*, Jg. 593, Nr. 16, S. 2204–2213, 2019.
- [134] A. K. Bera, R. J. Kuhn und J. L. Smith, „Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease“, *The Journal of biological chemistry*, Jg. 282, Nr. 17, S. 12883–12892, 2007.
- [135] L. Hedstrom, „Serine protease mechanism and specificity“, *Chemical reviews*, Jg. 102, Nr. 12, S. 4501–4524, 2002.
- [136] R. Wiczorek, K. Adamala, T. Gasperi, F. Polticelli und P. Stano, „Small and Random Peptides: An Unexplored Reservoir of Potentially Functional Primitive Organocatalysts. The Case of Seryl-Histidine“, *Life (Basel, Switzerland)*, Jg. 7, Nr. 2, 2017.
- [137] G. Gupta, L. Lim und J. Song, „NMR and MD Studies Reveal That the Isolated Dengue NS3 Protease Is an Intrinsically Disordered Chymotrypsin Fold Which Absolutely Requests NS2B for Correct Folding and Functional Dynamics“, *PloS one*, Jg. 10, Nr. 8, e0134823, 2015.
- [138] R. Yusof, S. Clum, M. Wetzel, H. M. Murthy und R. Padmanabhan, „Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro“, *The Journal of biological chemistry*, Jg. 275, Nr. 14, S. 9963–9969, 2000.
- [139] L. de La Cruz, W.-N. Chen, B. Graham und G. Otting, „Binding mode of the activity-modulating C-terminal segment of NS2B to NS3 in the dengue virus NS2B-NS3 protease“, *The FEBS journal*, Jg. 281, Nr. 6, S. 1517–1533, 2014.
- [140] D. Leung *et al.*, „Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors“, *The Journal of biological chemistry*, Jg. 276, Nr. 49, S. 45762–45771, 2001.
- [141] T. L. Arakaki, N.-X. Fang, D. P. Fairlie, P. R. Young und J. L. Martin, „Catalytically active Dengue virus NS3 protease forms aggregates that are separable by size exclusion chromatography“, *Protein expression and purification*, Jg. 25, Nr. 2, S. 241–247, 2002.
- [142] Y. M. Kim *et al.*, „NMR analysis of a novel enzymatically active unlinked dengue NS2B-NS3 protease complex“, *The Journal of biological chemistry*, Jg. 288, Nr. 18, S. 12891–12900, 2013.
- [143] P. Erbel *et al.*, „Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus“, *Nature structural & molecular biology*, Jg. 13, Nr. 4, S. 372–373, 2006.
- [144] S. Chandramouli *et al.*, „Serotype-specific structural differences in the protease-cofactor complexes of the dengue virus family“, *Journal of virology*, Jg. 84, Nr. 6, S. 3059–3067, 2010.
- [145] W.-N. Chen, K. V. Loscha, C. Nitsche, B. Graham und G. Otting, „The dengue virus NS2B-NS3 protease retains the closed conformation in the complex with BPTI“, *FEBS letters*, Jg. 588, Nr. 14, S. 2206–2211, 2014.

- [146] X. Chen *et al.*, „Mechanisms of activation and inhibition of Zika virus NS2B-NS3 protease“, *Cell research*, Jg. 26, Nr. 11, S. 1260–1263, 2016.
- [147] M. C. Mahawaththa *et al.*, „Solution conformations of a linked construct of the Zika virus NS2B-NS3 protease“, *Antiviral research*, Jg. 142, S. 141–147, 2017.
- [148] C. Kang, „Applications of In-Cell NMR in Structural Biology and Drug Discovery“, *International journal of molecular sciences*, Jg. 20, Nr. 1, 2019.
- [149] T. S. Kiat *et al.*, „Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease“, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Jg. 16, Nr. 12, S. 3337–3340, 2006.
- [150] R. Othman *et al.*, „Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: Understanding the interactions with allosteric binding sites“, *Journal of chemical information and modeling*, Jg. 48, Nr. 8, S. 1582–1591, 2008.
- [151] Y. Yao *et al.*, „Discovery, X-ray Crystallography and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 141, Nr. 17, S. 6832–6836, 2019.
- [152] A. Jabłoński, „Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren“, *Z. Physik*, Jg. 94, 1-2, S. 38–46, 1935.
- [153] M. Haase, „Einzelmolekülspektroskopie an einer homologen Reihe von Rylendiimiden und an einem bichromophoren Modellsystem für elektronischen Energietransfer“. Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2010.
- [154] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
- [155] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, NY: Springer, 2006.
- [156] M. Kasha, „Characterization of electronic transitions in complex molecules“, *Discuss. Faraday Soc.*, Jg. 9, S. 14–19, 1950.
- [157] G. G. Stokes, „On the change of refrangibility of light“, *Phil. Trans. R. Soc.*, Jg. 142, S. 463–562, 1852.
- [158] B. Röder, *Einführung in die molekulare Photobiophysik*. Teubner Verlag, 1999.
- [159] I. Hwang und G. D. Scholes, „Electronic Energy Transfer and Quantum-Coherence in π -Conjugated Polymers †“, *Chem. Mater.*, Jg. 23, Nr. 3, S. 610–620, 2011.
- [160] T. Förster, „Energiewanderung und Fluoreszenz“, *Naturwissenschaften*, Jg. 33, Nr. 6, S. 166–175, 1946.
- [161] G. D. Scholes, „Long-range resonance energy transfer in molecular systems“, *Annual review of physical chemistry*, Jg. 54, S. 57–87, 2003.
- [162] Y.-C. Cheng und G. R. Fleming, „Dynamics of light harvesting in photosynthesis“, *Annual review of physical chemistry*, Jg. 60, S. 241–262, 2009.
- [163] G. D. Scholes, „Quantum-Coherent Electronic Energy Transfer: Did Nature Think of It First?“, *J. Phys. Chem. Lett.*, Jg. 1, Nr. 1, S. 2–8, 2009.
- [164] E. Collini und G. D. Scholes, „Electronic and vibrational coherences in resonance energy transfer along MEH-PPV chains at room temperature“, *The journal of physical chemistry. A*, Jg. 113, Nr. 16, S. 4223–4241, 2009.

- [165] E. Collini und G. D. Scholes, „Coherent intrachain energy migration in a conjugated polymer at room temperature“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 323, Nr. 5912, S. 369–373, 2009.
- [166] W. T. Simpson und D. L. Peterson, „Coupling Strength for Resonance Force Transfer of Electronic Energy in Van der Waals Solids“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 26, Nr. 3, S. 588–593, 1957.
- [167] T. Förster, *Delocalized Excitation and Excitation Transfer*. Florida State University, 1965.
- [168] H. Fidder, J. Knoester und D. A. Wiersma, „Optical properties of disordered molecular aggregates: A numerical study“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 95, Nr. 11, S. 7880–7890, 1991.
- [169] M. Lippitz *et al.*, „Coherent electronic coupling versus localization in individual molecular dimers“, *Physical review letters*, Jg. 92, Nr. 10, S. 103001, 2004.
- [170] R. H. Friend *et al.*, „Electroluminescence in conjugated polymers“, *Nature*, Jg. 397, Nr. 6715, S. 121–128, 1999.
- [171] G. Cario und J. Franck, „Über Zerlegung von Wasserstoffmolekülen durch angeregte Quecksilberatome“, *Z. Physik (Zeitschrift für Physik)*, Jg. 11, Nr. 1, S. 161–166, 1922.
- [172] G. Cario und J. Franck, „Über sensibilisierte Fluoreszenz von Gasen“, *Z. Physik (Zeitschrift für Physik)*, Jg. 17, Nr. 1, S. 202–212, 1923.
- [173] T. Förster, „Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz“, *Ann. Phys.*, Jg. 437, 1-2, S. 55–75, 1948.
- [174] B. R. Masters, „Paths to Förster’s resonance energy transfer (FRET) theory“, *EPJ H*, Jg. 39, Nr. 1, S. 87–139, 2014.
- [175] B. Fückel *et al.*, „Theoretical investigation of electronic excitation energy transfer in bichromophoric assemblies“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 128, Nr. 7, S. 74505, 2008.
- [176] P. C. Ray, Z. Fan, R. A. Crouch, S. S. Sinha und A. Pramanik, „Nanoscopic optical rulers beyond the FRET distance limit: Fundamentals and applications“, *Chemical Society reviews*, Jg. 43, Nr. 17, S. 6370–6404, 2014.
- [177] C. S. Yun *et al.*, „Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 127, Nr. 9, S. 3115–3119, 2005.
- [178] G. Hinze, M. Haase, F. Nolde, K. Müllen und T. Basché, „Time-resolved measurements of intramolecular energy transfer in single donor/acceptor dyads“, *J. Phys. Chem. A*, Jg. 109, Nr. 30, S. 6725–6729, 2005.
- [179] S. P. Liptenok *et al.*, „Global analysis of Förster resonance energy transfer in live cells measured by fluorescence lifetime imaging microscopy exploiting the rise time of acceptor fluorescence“, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, Jg. 12, Nr. 27, S. 7593–7602, 2010.
- [180] V. May und O. Kühn, *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems*, 2. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- [181] Enrico Fermi, *Nuclear Physics*. University of Chicago Press, 1950.

- [182] R. van Grondelle, „Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, Jg. 811, Nr. 2, S. 147–195, 1985.
- [183] K. F. Wong, B. Bagchi und P. J. Rossky, „Distance and Orientation Dependence of Excitation Transfer Rates in Conjugated Systems: Beyond the Förster Theory“, *J. Phys. Chem. A*, Jg. 108, Nr. 27, S. 5752–5763, 2004.
- [184] D. L. Dexter, „A Theory of Sensitized Luminescence in Solids“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 21, Nr. 5, S. 836–850, 1953.
- [185] A. Muñoz-Losa, C. Curutchet, B. P. Krueger, L. R. Hartsell und B. Mennucci, „Fretting about FRET: Failure of the ideal dipole approximation“, *Biophysical Journal*, Jg. 96, Nr. 12, S. 4779–4788, 2009.
- [186] R. S. Knox und H. van Amerongen, „Refractive Index Dependence of the Förster Resonance Excitation Transfer Rate“, *J. Phys. Chem. B*, Jg. 106, S. 5289–5293, 2002.
- [187] M. Dimura *et al.*, „Quantitative FRET studies and integrative modeling unravel the structure and dynamics of biomolecular systems“, *Current opinion in structural biology*, Jg. 40, S. 163–185, 2016.
- [188] L. Stryer und R. P. Haugland, „Energy transfer: A spectroscopic ruler“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 58, Nr. 2, S. 719–726, 1967.
- [189] L. Stryer, „Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler“, *Annual review of biochemistry*, Jg. 47, S. 819–846, 1978.
- [190] A. Neininger, H. Thielemann und M. Gaestel, „FRET-based detection of different conformations of MK2“, *EMBO reports*, Jg. 2, Nr. 8, S. 703–708, 2001.
- [191] K. B. Eisenthal und S. Siegel, „Influence of Resonance Transfer on Luminescence Decay“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 41, Nr. 3, S. 652–655, 1964.
- [192] T. Kulinski, A. J. Visser, D. J. O’Kane und J. Lee, „Spectroscopic investigations of the single tryptophan residue and of riboflavin and 7-oxolumazine bound to lumazine apoprotein from *Photobacterium leiognathi*“, *Biochemistry*, Jg. 26, Nr. 2, S. 540–549, 1987.
- [193] N. V. Visser, J. W. Borst, M. A. Hink, A. van Hoek und A. J. W. G. Visser, „Direct observation of resonance tryptophan-to-chromophore energy transfer in visible fluorescent proteins“, *Biophysical chemistry*, Jg. 116, Nr. 3, S. 207–212, 2005.
- [194] J. W. Borst *et al.*, „Structural changes of yellow Cameleon domains observed by quantitative FRET analysis and polarized fluorescence correlation spectroscopy“, *Biophysical Journal*, Jg. 95, Nr. 11, S. 5399–5411, 2008.
- [195] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis und M. Orrit, „Ten Years of Single-Molecule Spectroscopy“, *J. Phys. Chem. A*, Jg. 104, Nr. 1, S. 1–16, 2000.
- [196] W. E. Moerner, „A Dozen Years of Single-Molecule Spectroscopy in Physics, Chemistry, and Biophysics“, *J. Phys. Chem. B*, Jg. 106, Nr. 5, S. 910–927, 2002.
- [197] P. Tinnefeld und M. Sauer, „Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: Challenges for chemistry and influence on biology“, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, Jg. 44, Nr. 18, S. 2642–2671, 2005.

- [198] M. A. Medina und P. Schwille, „Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology“, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 24, Nr. 8, S. 758–764, 2002.
- [199] T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit und U. P. Wild, Hg., *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996.
- [200] W. E. Moerner und D. P. Fromm, „Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy“, *Review of Scientific Instruments*, Jg. 74, Nr. 8, S. 3597–3619, 2003.
- [201] W. E. Moerner und T. Basché, „Optical Spectroscopy of Single Impurity Molecules in Solids“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Jg. 32, Nr. 4, S. 457–476, 1993.
- [202] S. Nie, D. T. Chiu und R. N. Zare, „Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 266, Nr. 5187, S. 1018–1021, 1994.
- [203] R. H. Webb, „Confocal optical microscopy“, *Reports on Progress in Physics*, Jg. 59, Nr. 3, S. 427–471, 1996.
- [204] T. Wilson, *Confocal Microscopy*. London: Academic Press, 1990.
- [205] S. W. J. Stöttinger, „Simultane Rasterkraft- und konfokale Fluoreszenzmikroskopie von einzelnen Nanoteilchen“. Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2017.
- [206] B. Fückel, „Einzelmolekülspektroskopische und quantenchemische Untersuchungen zum elektronischen Energietransfer“. Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2009.
- [207] J. R. Lakowicz, Hg., *Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [208] C. Zander, J. Enderlein und R. A. Keller, Hg., *Conceptual Basis of Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Techniques as Tools in Bioscience. In: Single Molecule Detection in Solution*. Wiley, 2002.
- [209] J. Ries und P. Schwille, „Fluorescence correlation spectroscopy“, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 34, Nr. 5, S. 361–368, 2012.
- [210] O. Krichevsky und G. Bonnet, „Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications“, *Reports on Progress in Physics*, Jg. 65, S. 251–297, 2002.
- [211] S. Sterrer und K. Henco, „Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)--a highly sensitive method to analyze drug/target interactions“, *Journal of receptor and signal transduction research*, Jg. 17, 1-3, S. 511–520, 1997.
- [212] S. A. Kim und P. Schwille, „Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: Prospects for neuroscience“, *Current opinion in neurobiology*, Jg. 13, Nr. 5, S. 583–590, 2003.
- [213] E. Haustein und P. Schwille, „Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy“, *Methods*, Jg. 29, Nr. 2, S. 153–166, 2003.
- [214] C. Gell, D. Brockwell und A. Smith, *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*. New York, NY: Oxford University Press, 2006.

- [215] E. L. Elson und D. Magde, „Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory“, *Biopolymers*, Jg. 13, Nr. 1, S. 1–27, 1974.
- [216] T. Arens *et al.*, *Mathematik*, 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl., 2010.
- [217] W. W. Webb, „Applications of fluorescence correlation spectroscopy“, *Quarterly reviews of biophysics*, Jg. 9, Nr. 1, S. 49–68, 1976.
- [218] T. Torres und M. Levitus, „Measuring conformational dynamics: A new FCS-FRET approach“, *J. Phys. Chem. B*, Jg. 111, Nr. 25, S. 7392–7400, 2007.
- [219] D. Magde, E. L. Elson und W. W. Webb, „Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization“, *Biopolymers*, Jg. 13, Nr. 1, S. 29–61, 1974.
- [220] P. F. Fahey *et al.*, „Lateral diffusion in planar lipid bilayers“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 195, Nr. 4275, S. 305–306, 1977.
- [221] G. Bonnet, O. Krichevsky und A. Libchaber, „Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 95, Nr. 15, S. 8602–8606, 1998.
- [222] K. Chattopadhyay, S. Saffarian, E. L. Elson und C. Frieden, „Measurement of microsecond dynamic motion in the intestinal fatty acid binding protein by using fluorescence correlation spectroscopy“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 99, Nr. 22, S. 14171–14176, 2002.
- [223] S. Sen Mojumdar, R. Chowdhury, S. Chatteraj und K. Bhattacharyya, „Role of ionic liquid on the conformational dynamics in the native, molten globule, and unfolded states of cytochrome c: A fluorescence correlation spectroscopy study“, *The journal of physical chemistry. B*, Jg. 116, Nr. 40, S. 12189–12198, 2012.
- [224] D. Lumma, S. Keller, T. Vilgis und J. O. Rädler, „Dynamics of large semiflexible chains probed by fluorescence correlation spectroscopy“, *Physical review letters*, Jg. 90, Nr. 21, S. 218301, 2003.
- [225] G. Altan-Bonnet, A. Libchaber und O. Krichevsky, „Bubble dynamics in double-stranded DNA“, *Physical review letters*, Jg. 90, Nr. 13, S. 138101, 2003.
- [226] L. Edman und R. Rigler, „Memory landscapes of single-enzyme molecules“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 97, Nr. 15, S. 8266–8271, 2000.
- [227] M. I. Wallace, L. Ying, S. Balasubramanian und D. Klenerman, „FRET Fluctuation Spectroscopy: Exploring the Conformational Dynamics of a DNA Hairpin Loop“, *J. Phys. Chem. B*, Jg. 104, Nr. 48, S. 11551–11555, 2000.
- [228] J. Widengren, Ü. Mets und R. Rigler, „Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy“, *Chemical Physics*, Jg. 250, Nr. 2, S. 171–186, 1999.
- [229] J. Widengren, R. Rigler und U. Mets, „Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy“, *Journal of fluorescence*, Jg. 4, Nr. 3, S. 255–258, 1994.
- [230] A. G. Palmer und N. L. Thompson, „Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy“, *Biophysical Journal*, Jg. 51, Nr. 2, S. 339–343, 1987.
- [231] S. R. Aragón und R. Pecora, „Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 64, Nr. 4, S. 1791–1803, 1976.

- [232] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren und P. Kask, „Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: Analysis of translational diffusion“, *Eur Biophys J*, Jg. 22, Nr. 3, S. 169–175, 1993.
- [233] A. Einstein, „Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen“, *Ann. Phys.*, Jg. 322, Nr. 8, S. 549–560, 1905.
- [234] P. Schwille, F. J. Meyer-Almes und R. Rigler, „Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution“, *Biophysical Journal*, Jg. 72, Nr. 4, S. 1878–1886, 1997.
- [235] M. Margittai *et al.*, „Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 100, Nr. 26, S. 15516–15521, 2003.
- [236] D. Nettels, A. Hoffmann und B. Schuler, „Unfolded protein and peptide dynamics investigated with single-molecule FRET and correlation spectroscopy from picoseconds to seconds“, *J. Phys. Chem. B*, Jg. 112, Nr. 19, S. 6137–6146, 2008.
- [237] G. Li, M. Levitus, C. Bustamante und J. Widom, „Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA“, *Nature structural & molecular biology*, Jg. 12, Nr. 1, S. 46–53, 2005.
- [238] A. G. Palmer, „NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules“, *Chemical reviews*, Jg. 104, Nr. 8, S. 3623–3640, 2004.
- [239] A. J. Wand, „Dynamic activation of protein function: A view emerging from NMR spectroscopy“, *Nature structural biology*, Jg. 8, Nr. 11, S. 926–931, 2001.
- [240] T. Ha *et al.*, „Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 93, Nr. 13, S. 6264–6268, 1996.
- [241] P. Roach, D. Farrar und C. C. Perry, „Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 127, Nr. 22, S. 8168–8173, 2005.
- [242] L. Konermann, „Protein Unfolding and Denaturants“, *eLS*, 2012.
- [243] A. A. Deniz *et al.*, „Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 96, Nr. 7, S. 3670–3675, 1999.
- [244] E. Lerner *et al.*, „Toward dynamic structural biology: Two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 359, Nr. 6373, 2018.
- [245] R. Roy, S. Hohng und T. Ha, „A practical guide to single-molecule FRET“, *Nature methods*, Jg. 5, Nr. 6, S. 507–516, 2008.
- [246] J. G. Yodh, M. Schlierf und T. Ha, „Insight into helicase mechanism and function revealed through single-molecule approaches“, *Quarterly reviews of biophysics*, Jg. 43, Nr. 2, S. 185–217, 2010.

- [247] J. G. Yodh, B. C. Stevens, R. Kanagaraj, P. Janscak und T. Ha, „BLM helicase measures DNA unwound before switching strands and hRPA promotes unwinding reinitiation“, *The EMBO journal*, Jg. 28, Nr. 4, S. 405–416, 2009.
- [248] S. Myong, M. M. Bruno, A. M. Pyle und T. Ha, „Spring-loaded mechanism of DNA unwinding by hepatitis C virus NS3 helicase“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 317, Nr. 5837, S. 513–516, 2007.
- [249] Y. Alhadid *et al.*, „Studying transcription initiation by RNA polymerase with diffusion-based single-molecule fluorescence“, *Protein science : a publication of the Protein Society*, Jg. 26, Nr. 7, S. 1278–1290, 2017.
- [250] J. B. Munro, A. Vaiana, K. Y. Sanbonmatsu und S. C. Blanchard, „A new view of protein synthesis: Mapping the free energy landscape of the ribosome using single-molecule FRET“, *Biopolymers*, Jg. 89, Nr. 7, S. 565–577, 2008.
- [251] S. C. Blanchard, „Single-molecule observations of ribosome function“, *Current opinion in structural biology*, Jg. 19, Nr. 1, S. 103–109, 2009.
- [252] Y. He *et al.*, „Probing single-molecule enzyme active-site conformational state intermittent coherence“, *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 133, Nr. 36, S. 14389–14395, 2011.
- [253] Y. Chen, D. Hu, E. R. Vorpagel und H. P. Lu, „Probing Single-Molecule T4 Lysozyme Conformational Dynamics by Intramolecular Fluorescence Energy Transfer“, *J. Phys. Chem. B*, Jg. 107, Nr. 31, S. 7947–7956, 2003.
- [254] B. Schuler und W. A. Eaton, „Protein folding studied by single-molecule FRET“, *Current opinion in structural biology*, Jg. 18, Nr. 1, S. 16–26, 2008.
- [255] Y. Gambin und A. A. Deniz, „Multicolor single-molecule FRET to explore protein folding and binding“, *Molecular bioSystems*, Jg. 6, Nr. 9, S. 1540–1547, 2010.
- [256] X. Zhuang *et al.*, „A single-molecule study of RNA catalysis and folding“, *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 288, Nr. 5473, S. 2048–2051, 2000.
- [257] R. Zhao und D. Rueda, „RNA folding dynamics by single-molecule fluorescence resonance energy transfer“, *Methods*, Jg. 49, Nr. 2, S. 112–117, 2009.
- [258] X. Zhuang, „Single-molecule RNA science“, *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, Jg. 34, S. 399–414, 2005.
- [259] M. Helm, A. Y. Kobitski und G. U. Nienhaus, „Single-molecule Förster resonance energy transfer studies of RNA structure, dynamics and function“, *Biophysical reviews*, Jg. 1, Nr. 4, S. 161–176, 2009.
- [260] J. R. Fries, L. Brand, C. Eggeling, M. Köllner und C. A. M. Seidel, „Quantitative Identification of Different Single Molecules by Selective Time-Resolved Confocal Fluorescence Spectroscopy“, *J. Phys. Chem. A*, Jg. 102, Nr. 33, S. 6601–6613, 1998.
- [261] C. Eggeling *et al.*, „Data registration and selective single-molecule analysis using multiparameter fluorescence detection“, *Journal of Biotechnology*, Jg. 86, Nr. 3, S. 163–180, 2001.
- [262] E. Haustein und P. Schwill, „Single-molecule spectroscopic methods“, *Current opinion in structural biology*, Jg. 14, Nr. 5, S. 531–540, 2004.

- [263] E. Brooks Spera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller und S. A. Soper, „Detection of single fluorescent molecules“, *Chemical Physics Letters*, Jg. 174, Nr. 6, S. 553–557, 1990.
- [264] C. Eggeling, J. R. Fries, L. Brand, R. Günther und C. A. Seidel, „Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 95, Nr. 4, S. 1556–1561, 1998.
- [265] J. Widengren *et al.*, „Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection“, *Analytical chemistry*, Jg. 78, Nr. 6, S. 2039–2050, 2006.
- [266] R. Kühnemuth und C. A. M. Seidel, „Principles of Single Molecule Multiparameter Fluorescence Spectroscopy“, *Single Mol.*, Jg. 2, Nr. 4, S. 251–254, 2001.
- [267] J. Schaffer *et al.*, „Identification of Single Molecules in Aqueous Solution by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy“, *J. Phys. Chem. A*, Jg. 103, Nr. 3, S. 331–336, 1999.
- [268] I. Rasnik, S. A. McKinney und T. Ha, „Surfaces and orientations: Much to FRET about?“, *Accounts of chemical research*, Jg. 38, Nr. 7, S. 542–548, 2005.
- [269] M. Friedel, A. Baumketner und J.-E. Shea, „Effects of surface tethering on protein folding mechanisms“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, Nr. 22, S. 8396–8401, 2006.
- [270] T. Cha, A. Guo und X.-Y. Zhu, „Enzymatic activity on a chip: The critical role of protein orientation“, *Proteomics*, Jg. 5, Nr. 2, S. 416–419, 2005.
- [271] T. Cha *et al.*, „Immobilization of oriented protein molecules on poly(ethylene glycol)-coated Si(111)“, *Proteomics*, Jg. 4, Nr. 7, S. 1965–1976, 2004.
- [272] P. T. Charles *et al.*, „Reduction of Non-Specific Protein Adsorption Using Poly(ethylene) Glycol (PEG) Modified Polyacrylate Hydrogels In Immunoassays for Staphylococcal Enterotoxin B Detection“, *Sensors (Basel, Switzerland)*, Jg. 9, Nr. 1, S. 645–655, 2009.
- [273] R. Lamichhane, A. Solem, W. Black und D. Rueda, „Single-molecule FRET of protein-nucleic acid and protein-protein complexes: Surface passivation and immobilization“, *Methods*, Jg. 52, Nr. 2, S. 192–200, 2010.
- [274] M. Rabe, D. Verdes und S. Seeger, „Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces“, *Advances in colloid and interface science*, Jg. 162, 1-2, S. 87–106, 2011.
- [275] B. O. Leung, Z. Yang, S. S. H. Wu und K. C. Chou, „Role of interfacial water on protein adsorption at cross-linked polyethylene oxide interfaces“, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, Jg. 28, Nr. 13, S. 5724–5728, 2012.
- [276] C. Leng *et al.*, „Probing the Surface Hydration of Nonfouling Zwitterionic and PEG Materials in Contact with Proteins“, *ACS applied materials & interfaces*, Jg. 7, Nr. 30, S. 16881–16888, 2015.
- [277] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama und G. M. Whitesides, „A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein“, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, Jg. 17, Nr. 18, S. 5605–5620, 2001.
- [278] S. A. McKinney, C. Joo und T. Ha, „Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling“, *Biophysical Journal*, Jg. 91, Nr. 5, S. 1941–1951, 2006.

- [279] E. Tan *et al.*, „A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 100, Nr. 16, S. 9308–9313, 2003.
- [280] S. A. McKinney, A.-C. Déclais, D. M. J. Lilley und T. Ha, „Structural dynamics of individual Holliday junctions“, *Nature structural biology*, Jg. 10, Nr. 2, S. 93–97, 2003.
- [281] S. A. McKinney, A. D. J. Freeman, D. M. J. Lilley und T. Ha, „Observing spontaneous branch migration of Holliday junctions one step at a time“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 102, Nr. 16, S. 5715–5720, 2005.
- [282] M. K. Nahas *et al.*, „Observation of internal cleavage and ligation reactions of a ribozyme“, *Nature structural & molecular biology*, Jg. 11, Nr. 11, S. 1107–1113, 2004.
- [283] M. Wahl, „Time-Correlated Single Photon Counting“, 2014. [Online] Verfügbar unter: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf. Zugriff am: 29. Oktober 2021 um 12:40.
- [284] ATTO-TEC GmbH, Hg., „ATTO-TEC Fluorescent Labels and Dyes Catalogue 2019/2020“. [Online] Verfügbar unter: https://www.atto-tec.com/images/ATTO/Katalog_Preisliste/Katalog_2019_2020.pdf. Zugriff am: 29. Mai 2021 um 14:02.
- [285] Cytiva, Hg., „Amersham CyDye Maleimides - Reagents for the labeling of biological compounds with Cy monofunctional maleimide dyes“. [Online] Verfügbar unter: <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13131>. Zugriff am: 30. Mai 2021 um 12:59.
- [286] Cytiva, Hg., „Amersham CyDye mono-reactive NHS Esters -Reagents for the labeling of biological compounds with Cy monofunctional dye“. [Online] Verfügbar unter: <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13133>. Zugriff am: 30. Mai 2021 um 12:45.
- [287] Cytiva, *Amersham CyDye Value Packs (Mono-Reactive NHS Ester)*. [Online] Verfügbar unter: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/protein-analysis/immunoassays-biochemical-assays-accessories-and-reagents/reagents/amersham-cydye-value-packs-mono-reactive-nhs-ester-p-00340> (Zugriff am: 3. Juni 2021 um 11:30).
- [288] Cytiva, *CyDye Value Packs (Mono-Reactive Maleimide)*. [Online] Verfügbar unter: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/protein-analysis/immunoassays-biochemical-assays-accessories-and-reagents/reagents/amersham-cydye-value-packs-mono-reactive-maleimide-p-00274> (Zugriff am: 3. Juni 2021 um 11:26).
- [289] D. M. Mitchell und R. B. Gennis, „Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* by Ni²⁺-NTA affinity chromatography“, *FEBS letters*, Jg. 368, Nr. 1, S. 148–150, 1995.
- [290] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz und D. Stüber, „Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent“, *Nat Biotechnol*, Jg. 6, Nr. 11, S. 1321–1325, 1988.
- [291] E. Hochuli, H. Döbeli und A. Schacher, „New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues“, *Journal of Chromatography A*, Jg. 411, S. 177–184, 1987.
- [292] S. D. Quinn *et al.*, „Single-Molecule Fluorescence Detection of the Epidermal Growth Factor Receptor in Membrane Discs“, *Biochemistry*, Jg. 58, Nr. 4, S. 286–294, 2019.

- [293] H. S. Chung, J. M. Louis und W. A. Eaton, „Distinguishing between protein dynamics and dye photophysics in single-molecule FRET experiments“, *Biophysical Journal*, Jg. 98, Nr. 4, S. 696–706, 2010.
- [294] H. C. Tie, V. Madugula und L. Lu, „The development of a single molecule fluorescence standard and its application in estimating the stoichiometry of the nuclear pore complex“, *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 478, Nr. 4, S. 1694–1699, 2016.
- [295] Y. Kim *et al.*, „Efficient site-specific labeling of proteins via cysteines“, *Bioconjugate chemistry*, Jg. 19, Nr. 3, S. 786–791, 2008.
- [296] A. N. Kapanidis und S. Weiss, „Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single-molecule fluorescence analysis of biomolecules“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 117, Nr. 24, S. 10953–10964, 2002.
- [297] C. Steuer, K. H. Heinonen, L. Kattner und C. D. Klein, „Optimization of assay conditions for dengue virus protease: Effect of various polyols and nonionic detergents“, *Journal of biomolecular screening*, Jg. 14, Nr. 9, S. 1102–1108, 2009.
- [298] A. Gellert, „Entwicklung von Markierungsstrategien für smFRET und PAL am Beispiel der DENV-NS2B-NS3-Protease und ihrer Inhibitoren“. Dissertation, Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2020.
- [299] A. C. Gibbs, B. Tounge und R. Steele, *NMR structure of an inhibitor bound dengue NS3 protease*, 2014.
- [300] A. C. Gibbs, R. Steele, G. Liu, B. A. Tounge und G. T. Montelione, „Inhibitor Bound Dengue NS2B-NS3pro Reveals Multiple Dynamic Binding Modes“, *Biochemistry*, Jg. 57, Nr. 10, S. 1591–1602, 2018.
- [301] F. Husada *et al.*, „Watching conformational dynamics of ABC transporters with single-molecule tools“, *Biochemical Society transactions*, Jg. 43, Nr. 5, S. 1041–1047, 2015.
- [302] A. Koch *et al.*, „High-precision FRET analysis of the G-protein coupled receptor TGR5 in live cells“, *Eur J Med Res*, Jg. 19, Suppl 1, S12, 2014.
- [303] H. Wu *et al.*, „Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors“, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Jg. 59, Nr. 2, S. 1100–1109, 2015.
- [304] M. A. M. Behnam, C. Nitsche, S. M. Vechi und C. D. Klein, „C-terminal residue optimization and fragment merging: Discovery of a potent Peptide-hybrid inhibitor of dengue protease“, *ACS medicinal chemistry letters*, Jg. 5, Nr. 9, S. 1037–1042, 2014.
- [305] A. Gellert, persönliche Mitteilung vom 05.05.2017; Mündliche Mitteilung.
- [306] H. Maus, persönliche Mitteilung vom 17.11.2020.; Mündliche Mitteilung.
- [307] S. J. Holden *et al.*, „Defining the limits of single-molecule FRET resolution in TIRF microscopy“, *Biophysical Journal*, Jg. 99, Nr. 9, S. 3102–3111, 2010.
- [308] M. Niwar, Angebot 2018-401027 der IBA Lifesciences GmbH vom 08.11.2018.
- [309] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 7. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [310] E. Hochuli, „Large-scale chromatography of recombinant proteins“, *Journal of Chromatography A*, Jg. 444, S. 293–302, 1988.

- [311] YSL Photonics, Hg., „Supercontinuum Source SC-OEM“. [Online] Verfügbar unter: <http://www.eqphotonics.de/cms/cms/upload/datasheets/SC-OEM-58ec4463166d4.pdf>. Zugriff am: 23. Oktober 2021 um 17:00.
- [312] S. Red, persönliche Mitteilung vom 01.07.2016; E-Mail.
- [313] PicoQuant, Hg., „Photon Counting and Timing - Reliable and easy to use modules with high-end performance“, Apr. 2020. [Online] Verfügbar unter: https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/photon_counting_and_timing_brochure.pdf. Zugriff am: 14. November 2021.
- [314] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr und D. Braun, „Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding“, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, Jg. 49, Nr. 12, S. 2238–2241, 2010.
- [315] M. Bauer, C. Li, K. Müllen, T. Basché und G. Hinze, „State transition identification in multivariate time series (STIMTS) applied to rotational jump trajectories from single molecules“, *The Journal of Chemical Physics*, Jg. 149, Nr. 16, S. 164104, 2018.
- [316] A. Gust *et al.*, „A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research“, *Molecules (Basel, Switzerland)*, Jg. 19, Nr. 10, S. 15824–15865, 2014.
- [317] S. Doose, H. Neuweiler und M. Sauer, „A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan“, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, Jg. 6, Nr. 11, S. 2277–2285, 2005.
- [318] W. Bujalowski und M. J. Jezewska, „Quantitative Thermodynamic Analyses of Spectroscopic Titration Curves“, *Journal of molecular structure*, Jg. 1077, S. 40–50, 2014.
- [319] A. Gellert, persönliche Mitteilung vom 28.08.2018; Mündliche Mitteilung.
- [320] ATTO-TEC GmbH, Hg., „Product Information: ATTO 643“, Okt. 2021. [Online] Verfügbar unter: https://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/ATTO_643.pdf. Zugriff am: 18. Oktober 2022 um 15:56.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn [REDACTED], der es mir ermöglichte, die hier beschriebenen Studien in seiner hervorragend ausgestatteten Forschungsgruppe durchzuführen. Auch möchte ich mich für die äußerst interessante Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente sowie seine zahlreichen Hilfestellungen recht herzlich bedanken.
- in besonderer Weise [REDACTED] für die ständige Hilfsbereitschaft bei allen technischen und experimentellen Problemen, die wertvolle Unterstützung bei der Datenanalyse sowie die Durchsicht und detaillierte Besprechung dieser Arbeit.
- des Weiteren Frau [REDACTED] und ihren Mitarbeitern, insbesondere [REDACTED] sowie [REDACTED], für die Bereitstellung der untersuchten Proben. Frau [REDACTED] möchte ich zusätzlich für die stets fruchtbaren und überaus lehrreichen Diskussionen sowie für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu dieser Arbeit zu erstellen, danken. Frau [REDACTED] danke ich ferner für die sorgfältige Durchsicht des „Bio-Teils“ dieser Arbeit.
- [REDACTED] für die ständige sowie überaus geschätzte Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen jeglicher Art.
- allen weiteren Kollegen aus dem Arbeitskreis [REDACTED] für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit in den zurückliegenden Jahren.
- [REDACTED], [REDACTED] sowie [REDACTED] für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Forschungsmodule.
- nicht zuletzt meiner Familie, insbesondere meinem Vater sowie meiner Partnerin [REDACTED], für ihren bedingungslosen Rückhalt sowie ihre fortwährende Unterstützung während meines Promotionsvorhabens.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2016 bis März 2024 unter Betreuung von Herrn [REDACTED].

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mainz, den 05.03.2024

Christian Götz