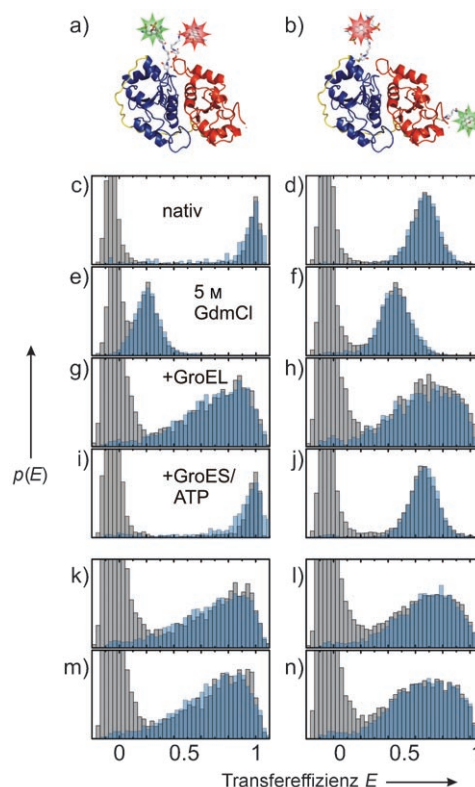


## Proteinfaltung

Untersuchung von Protein-Chaperon-Wechselwirkungen mit  
Einzelmolekülspektroskopie\*\*Frank Hillger, Dominik Hänni, Daniel Nettels, Sonja Geister, Michelle Grandin, Marcus Textor  
und Benjamin Schuler\*

Molekulare Chaperone sind ein essenzieller Bestandteil der zellulären Proteinfaltungsmaschinerie. Besonders bemerkenswert sind die Chaperone der Hsp60-Klasse, zu der auch das bakterielle GroEL/ES-System zählt, die das sich faltende Protein in einem Hohlraum einschließen. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden viele der daran beteiligten Prozesse aufgeklärt.<sup>[1]</sup> Über den Einfluss des Chaperons auf die Konformationsverteilungen und Faltungsmechanismen seiner Substratproteine ist jedoch erstaunlich wenig bekannt.<sup>[2]</sup> Die Heterogenität der nichtnativen Substratstrukturen im Komplex mit den molekularen Maschinen im Megadalton-Bereich gestaltet ihre experimentelle Untersuchung mit Ensemblemethoden schwierig.<sup>[2]</sup> Einzelmolekülspektroskopie, insbesondere in Kombination mit resonantem Förster-Energie-transfer (FRET), ermöglicht die Bestimmung nichtgemittelter Abstände und Orientierungen<sup>[3]</sup> sowie die Beobachtung intramolekularer Abstandsdynamik im Gleichgewicht<sup>[4,5]</sup> und ist damit ein vielversprechender Ansatz, um derartige Fragestellungen anzugehen.<sup>[6]</sup> Hier demonstrieren wir, wie Einzelmolekül-FRET zur Untersuchung von nichtnativen Konformationen und der Dynamik von Rhodanese aus Rinderleber, einem klassischen Chaperonsubstratprotein,<sup>[7,8]</sup> nach Bindung an GroEL genutzt werden kann.

Um charakteristische Transfereffizienzen zu erhalten, die eine Unterscheidung von nativen und nichtnativen Konformationen ermöglichen, wurden zwei Rhodanesevarianten mit komplementären Donor- und Akzeptorpositionen untersucht. Abbildungen 1 c–n zeigen Transfereffizienzhistogramme, die aus Photonensalven von einzelnen markierten Rhodanese-molekülen generiert wurden, während sie frei durch



**Abbildung 1.** Native Strukturen (basierend auf PDB ID 1RHD) und Transfereffizienzhistogramme der Rhodanesevarianten D102C–D219C (Interfacevariante, linke Spalte) und K135C–K174C (Linkervariante, rechte Spalte). a, b) Alexa-Fluorophore 488 und 594 wurden an die durch gerichtete Mutagenese eingeführten Cysteinreste gekuppelt. c–n) E-Histogramme unter nativen (c, d) und denaturierenden Bedingungen (5 M GdmCl, e, f), gebunden an GroEL nach Verdünnung aus GdmCl (g, h) und nach Rückfaltung durch Zugabe von GroES/ATP (i, j), gebunden an GroEL nach Inkubation mit gefaltetem Protein bei 30 °C für 16 h (k, l) und nach Verdünnung aus 0.1 M Phosphorsäure (m, n). Die grauen Histogramme wurden bei ausschließlicher Anregung des Donors aufgezeichnet. Für die blauen Histogramme kam gepulste verschachtelte Anregung<sup>[14]</sup> zum Einsatz.  $p(E)$  = Relative Häufigkeit von Ereignissen.

das Beobachtungsvolumen des konfokalen Instruments diffundierten. Erwartungsgemäß zeigt die Variante mit den Farbstoffen an der Domänenkontakfläche (Interfacevariante) im nativen Zustand eine mittlere Transfereffizienz  $\langle E \rangle$  nahe 1 (Abbildung 1 c); die mittlere Transfereffizienz von  $\langle E \rangle = 0.69$  für die Variante mit den Farbstoffen an den Enden des Peptidsegments, das die beiden Domänen verbindet (Linkervariante), entspricht einem Abstand von 4.7 nm, nahe dem aus der Kristallstruktur erwarteten Wert von 4.5 nm.<sup>[9]</sup> Ebenfalls den Erwartungen entsprechend skaliert  $\langle E \rangle$  im entfalteten Guanidiniumchlorid(GdmCl)-Zustand mit der Sequenzseparation der Farbstoffpositionen (Abbildung 1 e, f).

[\*] Dr. F. Hillger, Dr. D. Hänni, Dr. D. Nettels, S. Geister, Prof. Dr. B. Schuler  
Universität Zürich, Biochemisches Institut, 8057 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 44-635-5907  
E-Mail: schuler@bioc.uzh.ch  
Homepage: <http://www.bioc.uzh.ch/schuler>

Dr. M. Grandin, Prof. Dr. M. Textor  
ETH Zürich, Departement Materialwissenschaft  
8093 Zürich (Schweiz)

[\*\*] Wir danken A. Szabo für Diskussionen und Unterstützung bei Anisotropiesimulationen, A. Plückthun und M. Kawe für Diskussionen und GroEL-Proben, H. Hofmann und D. Streich für Diskussionen, dem inzwischen verstorbenen P. Horowitz für ein Rhodanese-kodierendes Plasmid und G. Lorimer für ein SR1-kodierendes Plasmid. Diese Arbeit wurde unterstützt von der VolkswagenStiftung, dem Schweizerischen Nationalfonds, dem Schweizerischen Nationalen Forschungsschwerpunkt Strukturbiochemie und dem Human Frontier Science Program.

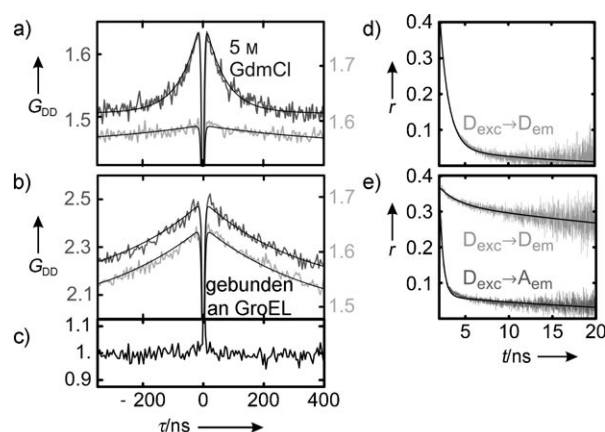
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200800298> zu finden.

Bei Verdünnung GdmCl-denaturierter, markierter Rhodanese in Puffer mit einem Überschuss an unmarkiertem GroEL wird Rhodanese vom Chaperon vollständig gebunden (Daten der analytischen Gelfiltration nicht gezeigt). Um die Möglichkeit der Bindung von Substrat an beide GroEL-Ringe, was eine Einzelmolekülanalyse erschweren würde, auszuschließen, haben wir die Einzelringvariante von GroEL, SR1, verwendet, welche das Substrat in einem 1:1-Komplex bindet.<sup>[10,11]</sup> Experimente mit tetradekamerem GroEL-Wildtyp führten zu identischen Ergebnissen. Die *E*-Histogramme von SR1-gebundener Rhodanese (Abbildung 1g,h) zeigen eine starke Verbreiterung, ein Indikator für statische Heterogenität auf der Beobachtungszeitskala (ca. 1 ms, Dauer einer Photonensalve). Für eine zufällige Konformationsverteilung würden wir, wie für das GdmCl-denaturierte Protein (Abbildung 1e,f), eine mittlere Transfereffizienz erwarten, die mit dem Sequenzabstand der Farbstoffe skaliert. Im Gegensatz dazu weisen die *E*-Histogramme nativähnliche Maxima auf (Abbildung 1c,d), was eine dem nativen Zustand ähnliche Topologie von chaperongebundener Rhodanese nahelegt. Mithilfe alternierender Anregung von Donor und Akzeptor<sup>[13,14]</sup> wurde ausgeschlossen, dass sich unter der „nur-Donor“-Population<sup>[12]</sup> bei  $\langle E \rangle \approx 0$  Ereignisse mit sehr niedriger Transfereffizienz verbergen (Abbildung 1c–n). Der leichte, aber reproduzierbare Unterschied in der Form der Transfereffizienzverteilungen der beiden chaperongebundenen Rhodanesevarianten (Abbildung 1g,h) legt nahe, dass die *E*-Histogramme charakteristisch für die Konformation des Substratproteins sind. Bemerkenswerterweise ist die Form der *E*-Histogramme unabhängig von der Art der Denaturierung (Abbildung 1g,h,k–n). Demnach reflektiert der chaperongebundene Zustand wohl nicht die Konformationsverteilung unter Entfaltungsbedingungen, sondern vielmehr ein Faltungsintermediat, das sich unmittelbar nach Verdünnung in die SR1-Lösung bildet (Abbildung 1g,h,m,n) und das ebenso ausgehend vom nativen Zustand unter leicht destabilisierenden Bedingungen populierte werden kann (Abbildung k,l).<sup>[15]</sup> Dass sich nach Zugabe von ATP und dem Co-Chaperon GroES zum Rhodanese-SR1-Komplex wieder die für den nativen Zustand charakteristischen *E*-Verteilungen ergeben<sup>[\*]</sup> (Abbildung 1c,d,i,j), belegt, dass es sich bei markierter Rhodanese um ein einwandfreies Chaperonsubstrat handelt.

Die Dynamik der Rhodanese-Chaperon-Komplexe untersuchen wir mit Korrelationsexperimenten in einem Hanbury-Brown-and-Twiss-Aufbau.<sup>[4]</sup> In Abbildung 2a ist die schnelle intramolekulare Kettendynamik in 5 M GdmCl entfalteter Rhodanese auf einer Zeitskala von ca. 70 ns zu sehen. Diese Zeitskala ist der von entfaltetem Kälteschockprotein CspTm und der Sup35-NM-Domäne<sup>[\*\*]</sup> sehr ähnlich.<sup>[4,16]</sup> Wie

[\*] Unter den hier gewählten Bedingungen befindet sich gefaltete Rhodanese nicht mehr im Chaperon.

[\*\*] Allerdings zeigt (im Unterschied zu CspTm)<sup>[4]</sup> auch einfach markierte Rhodanese Bunching auf dieser Zeitskala, wenn auch mit geringerer Amplitude (Abbildung 3 a), was eine quantitative Analyse erschwert. Ähnliche Beobachtungen wurden kürzlich auch mit dem Sup35-Fragment gemacht, die der Fluoreszenzlöschung durch aromatische Aminosäureseitenketten zugeschrieben wurden.<sup>[16]</sup>



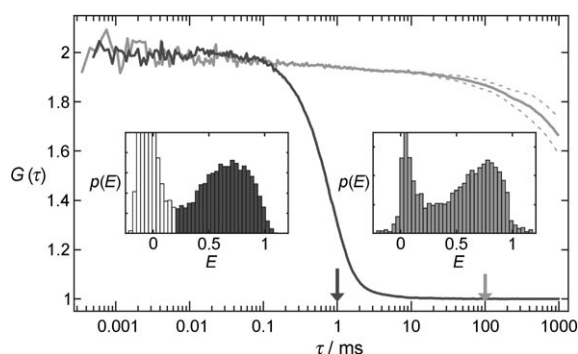
**Abbildung 2.** Dynamik von Rhodanese. a–c) Donor-Donor-Fluoreszenzintensitätsautokorrelationsfunktionen  $G_{DD}$  aus Hanbury-Brown-and-Twiss-Start-Stopp-Experimenten.<sup>[4]</sup> Korrelationsfunktionen für die Linkervariante entfaltet in 5 M GdmCl (a) und gebunden an GroEL (b) sind gezeigt. Dunkelgraue Linien markieren die Korrelationsfunktionen der FRET-markierten Linkervariante, hellgraue die der donormarkierten Rhodanese K174C. Die schwarzen Kurven in (a) und (b) sind Parametere Anpassungen an die Korrelationsdaten einschließlich des Photonenantibunchings.<sup>[4]</sup> c) Das normierte Verhältnis der beiden Korrelationsfunktionen aus (b) deutet auf eine Abwesenheit von Abstandsdynamik hin. d,e) Anisotropieabklingkurve von donormarkierter Rhodanese K174C (hellgrau) unter denaturierenden Bedingungen (d) und gebunden an GroEL (e). Die dunkelgrauen Daten in (e) zeigen das Abklingen der Akzeptorfluoreszenzanisotropie bei Donoranregung für die Linkervariante gebunden an GroEL. Die schwarzen Kurven in (d) und (e) sind Parametere Anpassungen von Gleichung (1) an die Daten.

ändert sich die Dynamik des entfalteten Proteins bei Interaktion mit GroEL? Die gleiche Messung mit GroEL-gebundener Rhodanese ergibt eine Korrelation, die mit 0.2  $\mu$ s abklingt (Abbildung 2b), was auf den ersten Blick als langsame Abstandsdynamik fehlinterpretiert werden könnte. Aber die ausgesprochene Empfindlichkeit der Korrelationsamplitude gegenüber den korrelierten Polarisationsrichtungen (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) ist ein Hinweis auf den starken Beitrag der Rotationsbewegung des gesamten GroEL-Rhodanese-Komplexes, die auf genau dieser Zeitskala stattfindet.<sup>[\*][18]</sup> Um die relativen Beiträge von Rotations- und Abstandsdynamik zu quantifizieren, vergleichen wir, jeweils im Komplex mit GroEL, FRET-markierte Rhodanese mit Rhodanese, die nur mit Donor markiert ist. Wie in Abbildung 2b zu sehen, zeigen beide Korrelationsfunktionen dieselbe Abklingzeit. Der Quotient aus beiden Funktionen liefert keinen Hinweis auf weitere Komponenten (Abbildung 2c), was für eine rein durch Rotation verursachte Korrelation spricht und dafür, dass Abstandsdynamik auf dieser Zeitskala nicht vorhanden ist. Ein weiteres Indiz für das Fehlen von Abstandsdynamik ist die starke Korrelation der polarisierten Akzeptorfluoreszenz bei polarisierter Anregung des Donors, die dieselbe 0.2- $\mu$ s-Abklingzeit zeigt (Abbildung S2). Dieses Ergebnis verdeutlicht,

[\*] Im Unterschied zu der mit konventionellen Fluorimetern möglichen Konfiguration im magischen Winkel ermöglicht die Geometrie konfokaler Epifluoreszenzinstrumente keine einfache Eliminierung von Polarisierungseffekten auf die Korrelationsfunktionen.<sup>[17]</sup>

dass die relative Orientierung von Donor und Akzeptor auf dieser Zeitskala relativ unveränderlich ist, was dafür spricht, dass gleiches auch für ihren Abstand gilt. Die bei GdmCl-entfalteter Rhodanese beobachtete Kettendynamik im Nanosekundenbereich wird also durch Bindung des Proteins an das Chaperon unterdrückt.

Um mögliche Abstandsänderungen auf längeren Zeitskalen zu untersuchen, haben wir zunächst frei diffundierende Rhodanese-GroEL-Komplexe mit subpopulationsspezifischer Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht (Abbildung 3). Dazu korrelieren wir nur Signale von FRET-



**Abbildung 3.** Normierte Fluoreszenzintensitäts-Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelationen und Transfereffizienzhistogramme der Linkervariante von Rhodanese gebunden an GroEL (frei diffundierend: dunkelgrau, oberflächenimmobilisiert: hellgrau; Klassifizierungszeiten der entsprechenden Histogramme mit Pfeilen markiert). Unterbrochene Linien zeigen die individuellen Kreuzkorrelationen ( $D \rightarrow A$  und  $A \rightarrow D$ , für  $\tau > 0.5$  ms). Für frei diffundierende Moleküle wurden nur Ereignisse mit  $E > 0.2$  (dunkelgrau) für die Korrelation verwendet.

markierten Molekülen mit  $E > 0.2$ , um den Einfluss von Spezies ohne aktiven Akzeptor zu minimieren, und wir verwenden Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelation zur Minimierung des Einflusses der  $\mu$ s-Triplettdynamik.<sup>[19]</sup> Abstandsänderungen würden in diesem Fall zu einer Antikorrelation zwischen den Signalen führen, d.h. zu einem Anstieg in der Korrelationsfunktion. Jedoch zeigen die Korrelationskurven bis ca. 100  $\mu$ s keine Anzeichen für Abstandsfluktuationen. Um die Zeitskalen jenseits der Diffusionszeit durch das konfokale Volumen zugänglich zu machen, wurden Rhodanese-SR1-Komplexe auf mit biotiniliertem Poly(L-lysin)-graft-Poly(ethylenglycol) (PLL-g-PEG)<sup>[20]</sup> beschichteten Deckgläsern immobilisiert. Einzelne Komplexe auf der Oberfläche wurden durch automatisiertes Absuchen identifiziert und jeweils bis zum Bleichen der Farbstoffe beobachtet. Überraschenderweise deutet die Analyse der Donor-Akzeptor-Kreuzkorrelation dieser Daten auf die Abwesenheit langreichweitiger Abstands-dynamik in chaperongebundener Rhodanese hin, selbst auf langen Zeitskalen. Die bei  $> 10$  ms einsetzende Abnahme der Korrelation wird durch Bleichen verursacht, wie die Divergenz zwischen Donor-Akzeptor- und Akzeptor-Donor-Kreuzkorrelation belegt (Abbildung 3).<sup>[21]</sup> Für die Abwesenheit großer Abstandsfluktuationen und somit für eine statische Heterogenität auf einer Zeitskala bis zu wenigstens 100 ms spricht auch die Breite der mit unter-

schiedlichen Beobachtungs- bzw. Integrationsintervallen erhaltenen  $E$ -Histogramme (Abbildung 3, Einschübe).

Abschließend bleibt die strukturelle Ursache der breiten  $E$ -Verteilungen chaperongebundener Rhodanese zu klären (Abbildung 1). Statische Heterogenität der Transfergeschwindigkeit kann ihren Ursprung sowohl in einer Verteilung von Abständen als auch in einer Verteilung von Donor-Akzeptor-Orientierungen haben.<sup>[\*]</sup> Für mit Donor oder Akzeptor einfach markierte Rhodanese in 5 M GdmCl wird die Anisotropieabklingkurve  $r(t)$  von einer Komponente mit einer Zeitkonstante von ca. 1 ns dominiert (Abbildung 2d), was auf eine schnelle und vollständige Reorientierung der Farbstoffe hinweist und damit die gebräuchliche Näherung von  $\kappa^2 \approx 2/3$  für den Orientierungsfaktor in der Förster-Theorie rechtfertigt.<sup>[22]</sup> Nach Bindung an SR1 ist die Anisotropie aller einfach markierten Varianten (D102C, K135C, K174C, D219C) jedoch drastisch erhöht und klingt zum größten Teil auf der Zeitskala der Rotation des gesamten Rhodanese-SR1-Komplexes ab ( $> 100$  ns, Abbildung 2e). Folglich ist es für die Gewinnung von Abstandsinformationen unabdingbar, die Einschränkung der Farbstofforientierungen zu berücksichtigen.

Zu diesem Zweck haben wir das Abklingen der Fluoreszenz-anisotropie unserer einfach markierten Rhodanesevarianten mit der Gleichung (1) analysiert, die den Abklingvorgang als kombinierten Effekt von eingeschränkter Farbstoffrotation ( $\tau_{\text{eff}}$ ) und Rotation des gesamten Protein-Chaperon-Komplexes ( $\tau_M$ ) beschreibt.<sup>[23]</sup>

$$r(t) = \left( (r_0 - r_\infty) e^{-t/\tau_{\text{eff}}} + r_\infty \right) e^{-t/\tau_M} \quad (1)$$

$r_0$  ist die limitierende Anisotropie der Farbstoffe,<sup>[\*\*]</sup>  $r_\infty$  ist die verbleibende Anisotropie unter der Annahme eines unbeweglichen Protein-Chaperon-Komplexes. Unter der Annahme eingeschränkter Rotationsdiffusion in einem Konus als einfachstem plausiblen Modell für die Bewegung der Farbstoffe<sup>[24]</sup> (Abbildung 4a) kann der Halbwinkel  $\Theta_{\text{max}}$  des Konus mit Gleichung 2 berechnet werden,<sup>[23,25]</sup> der für alle unsere Varianten und Farbstoffe Werte zwischen 17° und 19° ergibt.<sup>[\*\*\*]</sup>

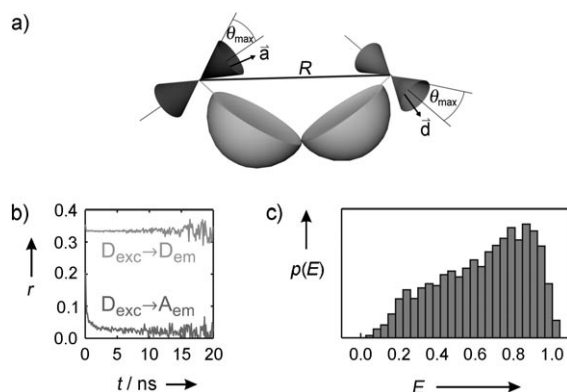
$$r_\infty = r_0 \left( \frac{1}{2} \cos \Theta_{\text{max}} (1 + \cos \Theta_{\text{max}}) \right)^2 \quad (2)$$

[\*] Heterogenität in der Quantenausbeute der Farbstoffe, beispielsweise verursacht durch unterschiedliche lokale Umgebungen, kann ausgeschlossen werden, da die Fluoreszenzlebensdauer (sowohl in Ensemble- als auch in Einzelmolekülmessungen) des Akzeptors in FRET-markierter bzw. die des Donors in einfach markierter Rhodanese im Komplex mit GroEL mit der entsprechenden Lebensdauer des in 5 M GdmCl entfalteten Proteins übereinstimmt.

[\*\*]  $r_0 = 0.38$  wurde in einer Matrix aus 99 % Glycerin bei  $-10^\circ\text{C}$  bestimmt.

[\*\*\*] Die fehlende Bindung der freien Farbstoffe und anderer farbstoffmarkierter, kleiner Proteine und Peptide an GroEL in Größenausschlusschromatographieexperimenten (Daten nicht gezeigt) weist darauf hin, dass diese Begrenzung der Orientierung größtenteils auf räumliche Einschränkungen im Rhodanese-Chaperon-Komplex und nicht auf direkte Farbstoff-Chaperon-Wechselwirkungen zurückzuführen ist.





**Abbildung 4.** Simulationen und strukturelle Interpretation. a) Unter der Annahme von eingeschränkter Rotationsdiffusion der Fluorophordipole  $\vec{d}$  und  $\vec{a}$  in Konen mit dem Halbwinkel  $\theta_{\max}$  an der Proteinoberfläche und einer schmalen Gauß-Verteilung um den Abstand  $R$  können wir sowohl den experimentell beobachteten charakteristischen Anisotropieabklingzeiten<sup>[34]</sup> (b) als auch den breiten  $E$ -Histogrammen Rechnung tragen (c) (vgl. Abbildung 1 und 2e). Die beiden Rhodanesedomänen sind durch graue Halbkugeln angedeutet (a).

Eine weitere wichtige Information, und zwar über die *relative* Orientierung der Farbstoffe, liefert die Anisotropieabklingkurve der Akzeptorfluoreszenz nach Donoranregung (Abbildung 2e): In diesem Fall ist die verbleibende Anisotropie annähernd null für beide chaperongebundene Varianten, was eine zufällige Winkelverteilung zwischen den Konusachsen nahelegt. Eine relative Orientierung der Konusachsen nahe dem magischen Winkel von  $54.7^\circ$  kann als Erklärung ausgeschlossen werden, da eine fundamentale Akzeptoranisotropie (bei Donoranregung) von null die Folge wäre, was im Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht (Abbildung 2e). Außerdem würde eine schmale Verteilung relativer Orientierungen gleichzeitig eine breite Abstandsverteilung erfordern, um den breiten  $E$ -Histogrammen, die wir beobachten (Abbildung 1g,h,k–n), gerecht zu werden, was aber in dieser Kombination physikalisch unrealistisch ist.

Um die experimentellen Ergebnisse quantitativ interpretieren zu können, haben wir den Transferprozess zwischen räumlich eingeschränkten Dipolen basierend auf dem einfachsten plausiblen Modell für unser System simuliert (Abbildung 4): Wir nehmen an, dass die relative Orientierung der Konen für jeden einzelnen Rhodanese-GroEL-Komplex unveränderlich, aber von Molekül zu Molekül zufällig verteilt sei. Diese Annahme führt zu Anisotropieabklingkurven (Abbildung 4b), die den experimentellen (Abbildung 2e) sehr ähneln, selbst für den charakteristischen Abklingvorgang der Akzeptoranisotropie nach Donoranregung. Wenn wir nun eine Normalverteilung von Farbstoffabständen  $R$  annehmen (Abbildung 4a) und deren Mittelwert und Standardabweichung so wählen, dass die Übereinstimmung zwischen simulierten und beobachteten  $E$ -Histogrammen (Abbildung 4c und S3) maximal ist, erhalten wir Abstandsverteilungen von GroEL-gebundener Rhodanese mit einem Mittelwert von  $4.5 \pm 0.5$  nm und einer Breite von  $0.5 \pm 0.2$  nm für beide Varianten. Das entspricht etwa dem Wert für die native Struktur der Linkervariante, jedoch einem viel größeren Wert bezogen auf die gefaltete Interfacevariante, was für eine große Sepa-

ration der Domänen spricht. Wenn wir die mittleren Abstände unserer beiden Varianten als Randbedingungen wählen, um in einem Strukturmodell die relativen Orientierungen der beiden nativen Domänen einzustellen, erhielten wir eine Rhodanese-Konformation, die eine Bindung an den Rand des GroEL-Rings nahelegt, der mit als Bindestellen dienenden hydrophoben Resten besetzt ist,<sup>[26]</sup> eine Anordnung, die im Einklang mit einer Reihe früherer Ergebnisse ist.<sup>[27–29]</sup>

Zusammenfassend haben wir eine neue Analyse eingesetzt, die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie- und Einzelmolekül-FRET-Experimente kombiniert, um quantitative Informationen über ein System mit eingeschränkten Farbstofforientierungen zu erhalten, eine Situation, die wiederholt in FRET-Experimenten zu Protein-Chaperon-Wechselwirkungen beobachtet wurde.<sup>[6,30]</sup> In unserer Analyse definieren die Abklingvorgänge der Donor- und Akzeptoranisotropie die Öffnungswinkel der die Rotation beschränkenden Konen, das Abklingen der Akzeptoranisotropie bei Donoranregung begrenzt die Verteilung der relativen Orientierungen der beiden Konusachsen, und die Form der Transfereffizienzhistogramme bestimmt Mittelwert und Breite der Abstandsverteilung. Was sich aus diesen Messungen, zusammen mit der Information über die Abstandsdynamik aus subpopulations-spezifischen Korrelationsfunktionen, ergibt, ist das Bild eines recht wohldefinierten Ensembles von Rhodanese-Molekülen, das, gebunden an GroEL, einem partiell strukturierten Intermediat ähnelt. Interessanterweise scheint die Abwesenheit langreichweitiger Abstandsdynamik lokale Fluktuationen nicht auszuschließen, wie aus Proteolyseempfindlichkeit,<sup>[27,28]</sup> NMR<sup>[18,31]</sup> oder Fluoreszenzspektroskopie<sup>[8,27]</sup> deutlich wird. Unsere Experimente illustrieren die Möglichkeit, quantitative Abstandsinformationen aus FRET-Experimenten zu erhalten, selbst wenn hohe Anisotropien einen starken Einfluss von Orientierungseffekten nahelegen, und stellen einen wichtigen Schritt bei der Erforschung der Rolle zellulärer Faktoren in der Proteinfaltung dar.

## Experimentelles

Die Proteine wurden wie bereits beschrieben präpariert und mit den Farbstoffen Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 markiert.<sup>[10,32]</sup> Die Bindung von Rhodanese an SR1 wurde wie folgt erreicht: A) In 5 mM GdmCl denaturierte Rhodanese wurde schnell zehnfach in Faltungspuffer (0.1 M Kaliumphosphat, 5 mM Magnesiumchlorid, 0.2 M 2-Mercaptoethanol, 0.001 % Tween 20, 1 mM EDTA, pH 7.0) verdünnt, der einen mindestens zehnfachen molaren Überschuss an SR1-Heptameren enthielt. B) Wie (A), aber die Entfaltung wurde in 0.1 M Phosphorsäure durchgeführt. C) Native Rhodanese wurde bei  $30^\circ\text{C}$  16 h in Faltungspuffer mit einem zehnfachen molaren Überschuss an SR1-Heptameren inkubiert.

Für die Oberflächenimmobilisierung wurde SR1 mit (+)-Biotin-*N*-hydroxysuccinimidester in einem molaren Verhältnis von 1:7 tinyliert. 0.1 mg mL<sup>-1</sup> PLL(20)-g[3.5]-PEG(2)/PEG(3.4)-Biotin (50 %)<sup>[20]</sup> wurde in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7.0, aufgelöst und in eine eigens konstruierte Flusszelle aus Quarz appliziert. Nach 15 min Inkubation wurde die Flusszelle mit 0.1 M Kaliumphosphat, 5 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EDTA, pH 7.0, gewaschen; danach wurde Avidin im selben Puffer aufgetragen. Nach 15 min Inkubation wurde die Flusszelle gründlich gespült, 250–500 nm GroEL-Rhodanese-

Komplex aufgetragen, 5 min inkubiert und die Zelle wieder mit Puffer gewaschen.

Anisotropieabklingdaten wurden mit einem eigens konstruierten Fluoreszenzlebensdauerspektrometer an 1  $\mu\text{m}$  Proben markierten Proteinen aufgenommen. Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden wie bereits beschrieben mit einem angepassten konfokalen Mikroskop vom Typ MicroTime 200 (PicoQuant, Berlin) durchgeführt.<sup>[4,32,33]</sup> Weitere Einzelheiten sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 21. Januar 2008,

veränderte Fassung am 29. April 2008

Online veröffentlicht am 10. Juli 2008

**Stichwörter:** Chaperone · Einzelmoleküluntersuchungen · FRET · Korrelationspektroskopie · Proteinfaltung

- [1] D. Thirumalai, G. H. Lorimer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, 30, 245–269; H. Grallert, J. Buchner, *J. Struct. Biol.* **2001**, 135, 95–103; J. C. Young, V. R. Agashe, K. Siegers, F. U. Hartl, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 781–791; A. L. Horwich, G. W. Farr, W. A. Fenton, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1917–1930.
- [2] W. A. Fenton, A. L. Horwich, *Q. Rev. Biophys.* **2003**, 36, 229–256.
- [3] G. Haran, *J. Phys. Condens. Matter* **2003**, 15, R1291–R1317; B. Schuler, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 1206–1220; X. Michalet, S. Weiss, M. Jäger, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1785–1813; B. Schuler, W. A. Eaton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18, 16–26.
- [4] D. Nettels, I. V. Gopich, A. Hoffmann, B. Schuler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 2655–2660.
- [5] E. V. Kuzmenkina, C. D. Heyes, G. U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15471–15476.
- [6] S. Sharma, K. Chakraborty, B. K. Müller, N. Astola, Y. C. Tang, D. C. Lamb, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, *Cell* **2008**, 133, 142–153.
- [7] J. A. Mendoza, E. Rogers, G. H. Lorimer, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 13044–13049.
- [8] J. Martin, T. Langer, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich, F. U. Hartl, *Nature* **1991**, 352, 36–42.
- [9] J. H. Ploegman, G. Drent, K. H. Kalk, W. G. J. Hol, *J. Mol. Biol.* **1978**, 123, 557–594.
- [10] A. L. Horwich, S. G. Burston, H. S. Rye, J. S. Weissman, W. A. Fenton, *Methods Enzymol.* **1998**, 290, 141–146.
- [11] J. S. Weissman, H. S. Rye, W. A. Fenton, J. M. Beechem, A. L. Horwich, *Cell* **1996**, 84, 481–490.
- [12] B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 2754–2759.
- [13] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margat, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 8936–8941.
- [14] B. K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle, D. C. Lamb, *Biophys. J.* **2005**, 89, 3508–3522.
- [15] T. Shibata, G. Kramer, B. Hardesty, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 33795–33799; K. E. Smith, P. A. Voziyan, M. T. Fisher, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 28677–28681.
- [16] S. Mukhopadhyay, R. Krishnan, E. A. Lemke, S. Lindquist, A. A. Deniz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 2649–2654.
- [17] Ü. Mets in *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (Hrsg.: E. S. Elson, R. Rigler), Springer, Berlin, **2001**.
- [18] R. Horst, E. B. Bertelsen, J. Fiaux, G. Wider, A. L. Horwich, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 12748–12753.
- [19] P. Schwille in *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (Hrsg.: E. S. Elson, R. Rigler), Springer, Berlin, **2001**; C. Eggeling, P. Kask, D. Winkler, S. Jäger, *Biophys. J.* **2005**, 89, 605–618.
- [20] N. P. Huang, J. Vörös, S. M. De Paul, M. Textor, N. D. Spencer, *Langmuir* **2002**, 18, 220–230.
- [21] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 2979–2995.
- [22] B. W. Van Der Meer, G. Coker III, S. Y. S. Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, VCH, New York, **1994**.
- [23] G. Lipari, A. Szabo, *Biophys. J.* **1980**, 30, 489–506.
- [24] G. F. Schröder, U. Alexiev, H. Grubmüller, *Biophys. J.* **2005**, 89, 3757–3770.
- [25] K. Kinoshita, S. Kawato, A. Ikegami, *Biophys. J.* **1977**, 20, 289–305.
- [26] K. Braig, Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich, P. B. Sigler, *Nature* **1994**, 371, 578–586.
- [27] J. A. Mendoza, M. C. Butler, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24648–24654.
- [28] R. Hlodan, P. Tempst, F. U. Hartl, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 587–595.
- [29] P. Thiyagarajan, S. J. Henderson, A. Joachimiak, *Structure* **1996**, 4, 79–88; A. van der Vaart, J. P. Ma, M. Karplus, *Biophys. J.* **2004**, 87, 562–573; G. W. Farr, K. Furtak, M. B. Rowland, N. A. Ranson, H. R. Saibil, T. Kirchhausen, A. L. Horwich, *Cell* **2000**, 100, 561–573.
- [30] Z. Lin, H. S. Rye, *Mol. Cell* **2004**, 16, 23–34.
- [31] R. Zahn, S. Perrett, G. Stenberg, A. R. Fersht, *Science* **1996**, 271, 642–645; R. Zahn, C. Spitzfaden, M. Ottiger, K. Wüthrich, A. Plückthun, *Nature* **1994**, 368, 261–265.
- [32] F. Hillger, D. Nettels, S. Dorsch, B. Schuler, *J. Fluoresc.* **2007**, 17, 759–765.
- [33] A. Hoffmann, A. Kane, D. Nettels, D. E. Hertzog, P. Baumgärtel, J. Lengefeld, G. Reichardt, D. A. Horsley, R. Seckler, O. Bakajin, B. Schuler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 105–110.
- [34] Die Rotation des Rhodanese-GroEL-Komplexes wurde in den Simulationen nicht berücksichtigt, diesen fehlt daher die langsame Relaxationskomponente ( $\tau_M = \infty$  in Gleichung (1)).