

**Multiparameter-
fluoreszenzspektroskopische
Untersuchungen zur molekularen Dynamik
an einzelnen Oligonukleotiden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Woźniak

aus

Stettin

Düsseldorf 2006

Aus dem Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Jun.Prof. Dr. Philipp Oesterhelt
Korreferent:	Prof. Dr. Claus A.M. Seidel
2. Koreferent:	Prof. Dr. Stephan Diekmann, Universität Jena
Tag der mündlichen Prüfung:	23.05.2006

Moim Rodzicą

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich im Laufe der letzten Jahre in Göttingen und Düsseldorf begleitet haben. Es haben viele Kollegen und Freunde zu dem Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen, denen ich nun ein herzliches Dankeschön aussprechen möchte:

Jun. Prof. Filipp Oesterhelt für die Ermöglichung, diese Arbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können. Als seine erste Doktorandin hatte ich vor allem in den ersten Jahren seine volle Aufmerksamkeit, die sich in einer unermüdlichen Diskussionsbereitschaft und Ideenreichtum geäußert hat. Ich bin ihm vor allem auch für die stete Unterstützung, was Forschung, Lehre und Konferenzen angeht, dankbar.

Prof. Claus Seidel, in dessen Gruppe ich ebenso selbstverständlich integriert wurde. Sein Engagement in den gemeinsamen Projekten und vor allem der große Erfahrungsschatz trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei. Auch hier konnte ich auf eine große Unterstützung bauen.

Volodymyr Kudryavtsev für seine immer währende Bereitschaft, noch ein Programm für mich umzuschreiben und mich in das eine oder andere Mysterium der Auswerteverfahren einzuweihen. Des Weiterem möchte ich ihm für sein Interesse an meiner Meinung zur Photographie und zum Sport danken; die Gespräche waren eine große Bereicherung des „Laborlebens“.

Dr. Suren Felekyan, der immer sein Wissen über den MFD-Aufbau und die FCS großzügig geteilt hat. Danke auch für die Hilfe bei den Antikorrelationen.

Dr. Enno Schweinberger für die Einweisung in die Seidelschen Programme und Datenkorrekturen, vor allem am Anfang meiner Arbeit. Ich bin froh, von Deinem Erfahrungsschatz noch profitiert haben zu können.

Dr. Marcelle König, die mir ebenfalls viele Tricks zum MFD-Aufbau vermittelt hat und auch sonst immer mit Ratschlägen glänzen konnte. Danke Dir auch für Dein immer offenes Ohr und Dein soziales Engagement, das die Gruppe so maßgeblich beeinflußt hat.

Carl Sandhagen für seine unermüdliche Arbeit und innovativen Ideen auf dem Gebiet des Imagings. Dein Bleiben in Göttingen war für uns ein großer Verlust.

Dr. Matthew Antonik und Dr. Ralf Kühnemuth für ihre Kommentare und Sichtweise, die den manchmal eingeschränkten Horizont von uns Doktoranden erweitert hat.

Alessandro Valeri, mit dem ich mich zu jedem auch so wissenschaftlichen oder weniger wissenschaftlichen Thema auslassen konnte. Mit keinem anderen wollte ich mein Büro lieber teilen als mit Dir!

Martin Schramm, dessen helfende Hand bei jedem Problem im Praktikum oder im Labor und bei etwaigen anderen Bastelarbeiten immer sofort zur Stelle war. Danken möchte ich auch für die vielen interessanten Gespräche auf dem Weg zur Mensa und während anderer Pausen.

Marcel Merkwitz, der die PCs und das die Massen an Meßdaten enthaltende Netzwerk immer funktionstüchtig erhalten hat; Bärbel Hofmann und Veronika Mendorf dafür, daß sie uns bravourös die Lasten der Bürokratie abnehmen.

Marcelle König, Stefan Marawske, Daniela Pfiffi und Andreas Renner, die neben Filipp Oesterhelt fleißig korrekturgelesen haben.

An den ganzen Rest der Oesterhelt und Seidel Gruppe, die die Arbeit hier so abwechslungsreich gestaltet haben, und auch nach der Arbeit zu vielen Schandtaten bereit waren: Volker Arning, Heike Dömkes, Dennis Dörr, Alexander Gaiduk, Sebastian Heiroth, Richard Janissen, Stanislav Kalinin, Ralf Müller, Opas Tojira und Aike Stortelder.

Meinen Eltern Ryszard und Zofia sowie Schwester Urszula Woźniak, die immer mit ihrer moralischen und tatkräftigen Unterstützung für mich da waren. Ein großer Dank geht auch an Alexander Haas, der mich einen Großteil der Promotion begleitet und mich immer wieder aufgebaut hat. Nicht zuletzt möchte ich den „KletterMenschen“ danken, die mir das Einleben in Düsseldorf so leicht gemacht haben und mit denen ich viele Stunden an der Wand und am Felsen verbracht habe.

"Są ludzie, którzy uczą się na własnych błędach. Są inni, którzy uczą się na błędach cudzych. Ci pierwsi to wynalazcy."

"Es gibt Menschen, die lernen aus eigenen Fehlern. Es gibt andere, die lernen aus den Fehlern von Fremden. Erstere sind Erfinder."

Andrzej Majewski

ZUSAMMENFASSUNG

Die MFD-FRET-Technik bietet auf Einzelmolekülebene die Möglichkeit, die absoluten Abstände zwischen zwei Fluorophoren zu bestimmen. Dies ist am Beispiel von unterschiedlichen Strukturen von Oligonukleotiden demonstriert worden. Obwohl Oligonukleotide lediglich aus vier verschiedenen Bausteinen – den Nukleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin (im Fall von DNA) bzw. Uracil (im Fall von RNA) – bestehen und damit den Proteinen in ihrer Vielfalt an Sekundärstrukturen unterlegen sind, bieten sie durch die Ausbildung von diversen Tertiärstrukturen gleichwohl eine Fülle an Konformationen. Die Kombination von einem oder mehreren Einzelsträngen sowie von gepaarten und ungepaarten Abschnitten führt zur Ausbildung von Schleifen, *bulges* (Beulen), *three-way junctions* (Dreiwegkreuzung) und *four-way junctions* (Vierwegkreuzung). Diese Formationen wiederum können Knicke in den Helices induzieren, deren Winkel für die Bindung von Proteinen maßgeblich ist. Neben einfachen Abstandsmessungen an DNA- und RNA-Helices sind auch Knicke in DNAs sowie Substrukturen der spleißosomalen U4/U6 snRNA untersucht worden.

Die DNA stellt mit ihrer ausgiebig untersuchten Tertiärstruktur ein hervorragendes Modellsystem dar. Aus diesem Grunde eignet sie sich sehr gut dafür, die Genauigkeit der aus MFD-FRET-Messungen resultierenden Transfereffizienzen durch den Vergleich mit theoretischen Vorhersagen zu ermitteln. Hierzu ist in einer Kollaboration eine Molekulardynamik(MD)-Simulation der an die DNA gebundenen Fluorophore durchgeführt worden, welche die mögliche örtliche Verteilung der Fluorophore unter rein sterischer Hinderung aufzeigt. Aus der Verteilung ließen sich unter Einbeziehung unterschiedlicher Mittelungsregimes, die verschieden schnelle rotative und translative Bewegungen in Betracht ziehen, die

Transfereffizienzen berechnen. Der Vergleich der experimentellen mit den theoretischen Daten von zwölf gemessenen Abständen zeigt auf, daß bei den vorliegenden Experimenten die Fluorophore den ihnen zur Verfügung stehenden Raum relativ zur Fluoreszenzlebensdauer nur langsam abtasten. Die translative Diffusion liegt somit im statischen Regime. Dabei ist jedoch die Rotationsbewegung schneller, so daß eine dynamische Mittelung der Orientierungen stattfindet. Mit der Kenntnis des korrekten Mittelungsregimes konnte eine neuartige Korrektur der experimentellen Daten vorgenommen werden, welche die genaue Bestimmung der mittleren Fluorophorabstände erlaubt hat. Die so berechneten Abstände bieten eine ausreichend hohe Auflösung der Struktur dar, die auf eine Überstruktur der untersuchten DNA in Lösung schließen läßt. Demnach liegt die DNA nicht als regelmäßige B-Helix vor, sondern nimmt eine sequenzabhängige Struktur an, wie sie sich mit Hilfe von entsprechenden Modellen berechnen lassen. Die hohe Genauigkeit der Abstandsmessungen ist weiterhin dazu genutzt worden, Knicke, die durch die Einführung von einem, drei und fünf ungepaarten Adenosinen (*1A-/3A-/5A-bulge*) in die Helix induziert werden, zu bestimmen. Dabei konnte nicht nur der Knickwinkel, sondern auch die Drehwinkel der beiden Helixarme sowie der Versatz der beiden Helixachsen zueinander bestimmt werden. Die Knickwinkel betragen jeweils 13° , 36° bzw. 73° für den 1A-, 3A- bzw. 5A-*bulge*.

Analoge MFD-Messungen und MD-Simulationen von neun Abständen sind an einer A-RNA zu Referenzzwecken für Untersuchungen an spleißosomalen RNAs durchgeführt worden. Die im Vergleich zur DNA unterschiedliche Helixstruktur und Verwendung kürzerer Fluorophorlinker haben eine langsamere Mittelung der Orientierung zur Folge, die sich in den Meßdaten in einer reduzierten Transfereffizienzen äußert. Die Behinderung der lokalen Bewegung sowie des eingenommenen Raumes läßt sich in der zeitaufgelösten Anisotropie beobachten. Die residuale Anisotropie beträgt für den Donor 0,11 und für den Akzeptor 0,18. Die Messungen an der DNA und RNA zeigen die Bedeutung der Zeitskala der Fluorophorbewegung, ihre Abhängigkeit von der Linkerbeweglichkeit und die Auswirkung auf das Mittelungsregime. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren den starken Einfluß der Fluorophorbewegung auf die Transfereffizienzen und der daraus resultierenden Notwendigkeit, das zutreffende Mittelungsregime für die Korrektur der Meßdaten zu wählen. Für die Berechnung korrekter Abstände an der RNA ist ein statisches Mittelungsregime ermittelt worden, welches auf die

Messungen der U4/U6 snRNA *three-way junction* angewandt wird.

Die spleißosomale U4/U6 snRNA *three-way junction* ist eine Y-förmige Interaktionsdomäne bestehend aus drei Helices: zwei doppelhelikalen Segmenten, die aus den komplementären Abschnitten der U4 und U6 snRNAs gebildet werden (Stamm I und Stamm II), und der dazwischen liegenden 5'-terminalen Haarnadelschleife der U4 snRNA. Für gewöhnlich stapeln bei ausreichender Salzkonzentration zwei der drei Helices in einer *three-way junction* koaxial aufeinander. Zur Charakterisierung der Faltung der vorliegenden Kreuzung sind zwölf unterschiedliche Abstände zwischen den drei an die Kreuzung angrenzenden Helixarmen vermessen und entsprechend dem für die RNA-Messungen bestimmten statischen Mittelungsregime korrigiert worden. Mit Hilfe des Vergleichs dieser Abstände mit den an der A-RNA gemessenen Abständen konnte gezeigt werden, daß der Stamm II und die 5'-terminale Haarnadelschleife eine koaxiale Helixstapelung ausbilden. Die gemessenen Abstände lassen weiterhin darauf schließen, daß Stamm I bei der Faltung in Richtung des Stammes II knickt.

Der *Kink-turn* (*K-turn*), ein neues RNA-Strukturmotiv, welches sowohl im Spleißosom als auch dem Ribosom zu finden ist, dient als spezifisches Protein-Erkennungselement. Während die Struktur des spleißosomalen U4 snRNA *K-turn*/15.5K Protein-Komplexes aus einer Kristallstruktur bekannt ist, ist es nicht klar, ob der *K-turn* auch in Lösung in gefalteter Form vorliegt. In den vorliegenden Messungen ist der U4 snRNA *K-turn* mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen in Abwesenheit und Anwesenheit des 15.5K Proteins sowie in Abhängigkeit von der Na⁺- und Mg²⁺-Ionenkonzentration untersucht worden. Demnach liegt der *K-turn* in Lösung in ungefalteter Form mit einem Knickwinkel von 76° ±15° in der RNA-Helix vor. Während sowohl Na⁺- als auch Mg²⁺-Ionen diese eher offene Konformation des *K-turns* induzieren, wird durch die Bindung des 15.5K Proteins eine stärker geknickte Konformation mit einem Knickwinkel von etwa 48° ±15° induziert. Der Vergleich der gemessenen Abstände mit einer computer-modellierten Struktur, die auf der Kristallstruktur basiert, zeigt, daß der starke Knick mit dem 15.5K Protein der gefalteten Struktur des *K-turn*-Motifs im Kristall entspricht.

Die Machbarkeitsstudien zu Fluoreszenzmessungen in Zellen haben die Möglichkeit der pixelweisen MFD-Parameterbestimmung am Beispiel von FCS und Anisotropie demonstriert. Mit den Messungen wird eine Perspektive auf Einzelmolekülmessungen in Zellen aufgezeigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie	1
1.2	Einführung in das Untersuchungsobjekt: Oligonukleotide	3
1.2.1	DNA	3
1.2.1.1	Struktur	3
1.2.1.2	Funktion	5
1.2.2	RNA	6
1.2.2.1	Struktur	6
1.2.2.2	Funktion	7
1.2.3	Strukturbestimmung von Oligonukleotiden	8
1.3	Das humane U12-abhängige Spleißosom	9
1.3.1	Das U4/U6 snRNP	11
1.3.1.1	Three-way junctions	13
1.3.2	Der Kink-turn	15
2	GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	19
2.1	Absorption	19
2.2	Fluoreszenz	20
2.2.1	Grundlagen	22
2.2.2	Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer	24
2.2.3	Fluoreszenzanisotropie	26
2.2.3.1	Das wobbling-in-a-cone Modell	28
2.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	29
2.3.1	Grundlagen	30
2.3.2	Quantifizierung der FRET-Effizienz	31
2.3.2.1	Der Försterradius R_0	33
2.3.2.2	Der Orientierungsfaktor κ^2	33
2.3.2.3	Eigenschaften der Donor- und Akzeptorfarbstoffe	36
2.4	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	37

2.4.1	Kreuzkorrelation	40
2.4.2	Modellfunktionen für Korrelationskurven	41
2.4.2.1	<i>Mathematische Beschreibung des Triplett-Termes</i>	42
2.5	Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD)	44
2.5.1	Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime (BIFL)	44
2.5.1.1	<i>Bestimmung der Fluoreszenzparameter</i>	45
2.5.1.2	<i>Speziessensitive Spektroskopie</i>	50
3	MATERIAL UND METHODEN	53
3.1	Material	53
3.1.1	Fluorophore	53
3.1.2	Chemikalien	53
3.1.3	Puffer	54
3.1.4	Oligonukleotide und deren Markierung	54
3.1.5	15.5K und 61K Protein	55
3.1.6	Zellkultur	55
3.1.6.1	<i>Zelllinie</i>	55
3.1.6.2	<i>Medien und Feinchemikalien</i>	55
3.1.6.3	<i>Nährmedien</i>	56
3.2	Methoden	56
3.2.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden sowie Proteinanbindung	56
3.2.2	Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie	57
3.2.2.1	<i>Bestimmung der Quantenausbeute</i>	57
3.2.3	Multi-Parameter Fluoreszenzdetektion (MFD)	58
3.2.3.1	<i>Konfokales Mikroskop</i>	58
3.2.3.2	<i>Burst-Integrated Fluorescence Lifetime (BIFL)</i>	60
3.2.3.3	<i>FCS</i>	65
3.2.3.4	<i>MFD-Imaging</i>	65
3.2.3.5	<i>Software</i>	66
3.2.4	Molekulardynamik(MD)-Simulation	67
3.2.5	Zellkultur	67
4	ERGEBNISSE	69
4.1	DNA-Helix	69
4.1.1	Gerade Helix	70

4.1.1.1	Experimentelle FRET-Daten	71
4.1.1.2	Betrachtung von Mittelungsregimes	74
4.1.1.3	Vergleich der Meßdaten mit Molekulardynamik-Simulationen.....	78
4.1.1.4	Vergleich mit gekrümmten Helix-Modellen	80
4.1.1.5	Speziessensitive Korrelationsanalyse	82
4.1.2	Geknickte Helix	85
4.1.2.1	Experimentelle FRET-Daten mit 1, 3 und 5 Adenosinbasen.....	86
4.1.2.2	Bestimmung des Knickwinkels	88
4.2	RNA-Helix	93
4.2.1.1	Experimentelle FRET-Daten	94
4.2.1.2	Betrachtung von Mittelungsregimes	98
4.2.1.3	Vergleich der Meßdaten mit Molekulardynamik-Simulationen.....	99
4.2.1.4	Anpassung eines wobbling-in-a-cone-Modells an die Meßdaten .	103
4.3	Spleißosomen	104
4.3.1	U4/U6 snRNA three-way junction.....	105
4.3.1.1	Experimentelle Daten	106
4.3.1.2	Korrektur der Meßdaten und Aufstellung vom Modell der three-way-junction	109
4.3.2	K-turn der humanen U4 snRNA unter Einfluß vom 15.5K Protein ...	112
4.3.2.1	FRET-Messungen ohne Protein	115
4.3.2.2	FRET-Messungen mit Protein	117
4.3.2.3	Einfluß von Salzen auf den K-turn	120
4.3.2.4	Vergleich mit Molekulardynamik-Simulationen.....	122
4.3.2.5	Abschätzung von Winkeln.....	124
4.4	MFD-Imaging.....	124
4.4.1	Diffusionsmessungen in Sepharose-Kugeln.....	125
4.4.2	Fluoreszenzhintergrund in Zellen	127
5	DISKUSSION	129
5.1	DNA-Helix.....	130
5.1.1	Gerade Helix.....	130
5.1.1.1	Experimentelle Daten zeigen ein helikales Förstermodell auf	130
5.1.1.2	Die Fluorophore unterliegen einer „schnellen Rotation“	131
5.1.1.3	Experimentelle Daten lassen auf eine Überstruktur der B-DNA schließen	133
5.1.1.4	Kleine Abstände liefern eine zu niedrige FRET-Effizienz.....	134

5.1.2	Geknickte Helix.....	135
5.1.2.1	<i>Der Knick nimmt mit der Anzahl der eingeschobenen Basen zu.</i>	135
5.1.2.2	<i>Die Einführung von ungepaarten Basen führt zu Drehung, Versatz und Knicken der Helices zueinander</i>	138
5.2	RNA-Helix.....	139
5.2.1.1	<i>Kurze Linker und eine tiefe, enge große Grube der RNA führen zu einer hohen Anisotropie.....</i>	140
5.2.1.2	<i>Die Fluorophore unterliegen nicht der schnellen Rotation.....</i>	141
5.2.1.3	<i>Die Fluorophore sind in ihrem örtlichen Aufenthalt sowie ihrer lokalen Bewegung eingeschränkt</i>	142
5.3	Spleißosomen.....	145
5.3.1	U4/U6 snRNA <i>three-way junction</i>	145
5.3.1.1	<i>Die Umgebung der Fluorophore wirkt sich direkt auf ihre spektroskopischen Eigenschaften aus</i>	145
5.3.1.2	<i>Stamm II und 5'-terminale Haarnadelschleife bilden eine koaxiale Helixstapelung aus.....</i>	147
5.3.2	<i>K-turn</i> der humanen U4 snRNA unter Einfluß vom 15.5K Protein ...	149
5.3.2.1	<i>Sowohl der native als auch der modifizierte K-turn führen einen Knick in die RNA ein.....</i>	149
5.3.2.2	<i>Die Bindung des 15.5K Proteins führt einen starken Knick ein ..</i>	150
5.3.2.3	<i>Weder Natrium- noch Magnesium-Ionen können einen starken Knick induzieren.....</i>	151
5.3.2.4	<i>Die Struktur des K-turns in Lösung entspricht derjenigen im Kristall</i>	153
5.4	MFD-Imaging	154
5.4.1	Diffusionsmessungen in Sepharose-Kugeln	155
5.4.2	Fluoreszenzhintergrund in Zellen	155
	LITERATURVERZEICHNIS	157
	ANHANG	167
	Abkürzungsverzeichnis	167
	Fluorophore	170
	Oligonukleotidsequenzen	172
	Originaldaten der FRET-Studien	174
	TCSPC-Quantenausbeutemessungen.....	189

Veröffentlichungen	190
Erklärung.....	191

1 EINLEITUNG

1.1 Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie

Die meisten Techniken zur Untersuchung von molekularen Prozessen basieren auf der gleichzeitigen Betrachtung von vielen Molekülen, sogenannten Ensemblemessungen. Dies ist zum einen in der dadurch verbesserten Statistik und zum anderen in der nicht ausreichenden Sensitivität der jeweiligen Meßgeräte zur Betrachtung von einzelnen Molekülen begründet. Die Interpretation der so erhaltenen Daten erfolgt in der Regel jedoch auf molekularer Ebene. Dies ist nur bei homogenen Systemen gerechtfertigt, welche lediglich eine Spezies enthalten, deren Moleküle keine unabhängige Dynamik aufweisen. Ansonsten führt diese Form der Auswertung zu einem Herausmitteln der Inhomogenitäten. Zur Lösung des Problems können zwei Ansätze verfolgt werden: Zum einen die Synchronisierung von molekularen Prozessen, zum anderen die Benutzung von Einzelmolekülmeßtechniken. Beide Felder haben sich parallel entwickelt und besitzen jeweils einen speziellen, wenn auch begrenzten Anwendungsbereich.

Diese Arbeit stützt sich auf die Einzelmolekülspektroskopie. Die Entwicklung der optischen Detektion einzelner Moleküle hatte ihre Anfänge Ende der 80er Jahre. Dabei fanden die ersten Messungen bei extrem niedrigen Temperaturen und in der Festphase statt (Moerner & Kador 1989). Die Detektion von einzelnen Molekülen in Lösung wurde durch den Einsatz empfindlicher Detektoren ermöglicht (Shera *et al.* 1990). Ausschlaggebend für die heute verbreitete Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie war aber die Entwicklung des

konfokalen Aufbaus (Mets & Rigler 1994; Nie *et al.* 1994; Nie *et al.* 1995; Rigler & Widengren 1990), welches endlich ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis lieferte. Praktisch wird die Einzelmolekülspektroskopie in Form der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie realisiert (Goodwin *et al.* 1996; Moerner & Orrit 1999; Weiss 1999). Sie bietet neben der hohen Empfindlichkeit ein breites Spektrum an Analyseverfahren, so daß sich mit ihr unterschiedliche Problemstellungen untersuchen lassen.

Wie es der Name schon sagt, ist eine Grundvoraussetzung für die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie die Verfügbarkeit von Fluorophoren bei dem verwendeten System. In der Biologie ist die intrinsische Fluoreszenz auf Proteine mit den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bzw. fluoreszenten prosthetischen Gruppen eingeschränkt. Zusätzlich weisen einzelne Co-Faktoren und Lipide Fluoreszenz auf. Aufgrund dieser begrenzten Verbreitung und vor allem auch Qualität der intrinsischen Fluoreszenz wird häufig auf eine extrinsische Markierung von Makromolekülen zurückgegriffen. Dazu dienen Fluorophore – meist organische Verbindungen – mit erwünschten spektralen Eigenschaften, hohen Quantenausbeuten und einer großen Photostabilität.

Die Fluoreszenz eines Farbstoffs ist mehrdimensional: sie besteht aus der spektralen Verteilung, der Fluoreszenzintensität, der Lebensdauer und der Anisotropie. Beim Einsatz von zwei Farbstoffen mit geeigneten Fluoreszenzcharakteristiken kommt der fluoreszenzresonante Energietransfer (FRET) als zusätzlicher Parameter hinzu. Er dient der Bestimmung des Abstandes zwischen zwei Fluorophoren und kann somit Aussagen sowohl über Moleküldimensionen als auch ihre Dynamik treffen (Clegg 1992; Förster 1948; Lakowicz 1999; van der Meer *et al.* 1994). Zusammen werden all diese Informationen dazu herangezogen, um Aufschluß über Struktur, Beweglichkeit, Kinetiken und Lösungsprozesse zu erhalten.

Bisherige Arbeiten zur Konformationsdynamik von Nukleinsäuren (und Proteinen) befassen sich lediglich mit relativen Abstandsänderungen bzw. Änderungen in der Energietransfereffizienz (Deniz *et al.* 2000; Weiss 1999; Weiss 2000), jedoch wird kein Bezug auf die absoluten Abstände genommen. Aus diesem Grunde soll im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, wie systematische Fehler korrigiert werden können und so eine hohe Präzision der Multiparameter-Fluoreszenzdetektion erreicht werden kann. Die Korrektur der Meßdaten in

Aussicht auf die Abstandsbestimmung soll ausgeweitet und schließlich Strukturen in drei Dimensionen bestimmt werden.

1.2 Einführung in das Untersuchungsobjekt: Oligonukleotide

Neben den Proteinen sind die Oligonukleotide die wichtigsten Polymere in bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Organismen. Sie werden aus Nukleotiden aufgebaut, welche sich in einem Zuckerphosphatrückgrat in 5'→3'-Richtung ein-dimensional aneinanderreihen. Im Falle der DNA (engl. *desoxyribonucleic acid*; Desoxyribonukleinsäure) bestehen die Nukleotide aus einer der vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), einer Desoxyribose und Phosphat. Die RNA (engl. *ribonucleic acid*; Ribonukleinsäure) unterscheidet sich von der DNA durch die hydroxylierte Form der Ribose an der 2'-Position und den Austausch von Thymin durch das syntheses technisch weniger energieaufwendige Uracil (U).

1.2.1 DNA

Die DNA ist der Träger genetischer Information, welche in der Abfolge der Basen gespeichert wird. Diese Sequenz spielt eine tragende Rolle im Aufbau von funktionellen Proteinen, doch hat sie auch Auswirkungen auf die Struktur der DNA-Helix selbst. Im Folgenden soll aufgezeigt werden, warum die DNA sich hervorragend als *molecular ruler* (engl.; molekulares Lineal) eignet und sich als solche etabliert hat, aber auch auf welche Eigenheiten geachtet werden muß.

1.2.1.1 Struktur

Die Watson-Crick-DNA (Watson & Crick 1953), auch B-DNA genannt, stellt die am häufigsten vorkommende Struktur der DNA dar. Die antiparallele Doppelhelix ist rechtsgängig und enthält zehn Nukleotide pro Windung. Ein Modell ist in Abbildung 1-1A zu sehen. Die Lage und Orientierung der Basen resultiert aus der C2'-*endo*-Konformation der Ribose und einer *anti*-Konformation der glykosidischen Bindung zwischen Zucker und Base. Daraus folgen eine Ganghöhe (*Rise*) von 3.38 Å und ein Torsionswinkel (*Twist*) von 36° zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basen. Des weiteren liegen die Basen im Inneren der Helix und sind

annähernd senkrecht zur Helixachse orientiert. Damit können die beiden Winkel, welche die Neigung der Basen beschreiben (*Roll* und *Tilt*) vereinfacht gleich Null gesetzt werden (siehe auch Abbildung 1-1B).

Die regelmäßige Geometrie der B-DNA und die Steifheit der Helix bis zu einer gewissen Länge hat sie zu einem beliebten Objekt auf dem Bereich der FRET-Messungen avancieren lassen. Während Hochstrasser *et al.* (Hochstrasser *et al.* 1992) noch lediglich die Abstandsverteilung von an DNA gebundenen Fluorophoren analysiert haben, stand bei Clegg *et al.* (Clegg *et al.* 1993) und Jares-Erijman und Jovin (Jares-Erijman & Jovin 1996) bereits die Demonstration der Helix-Händigkeit im Vordergrund. Die Vorhersagbarkeit der Abstände ermöglicht eine Überprüfung der Präzision der FRET-Technik und kann eventuelle Probleme aufzeigen.

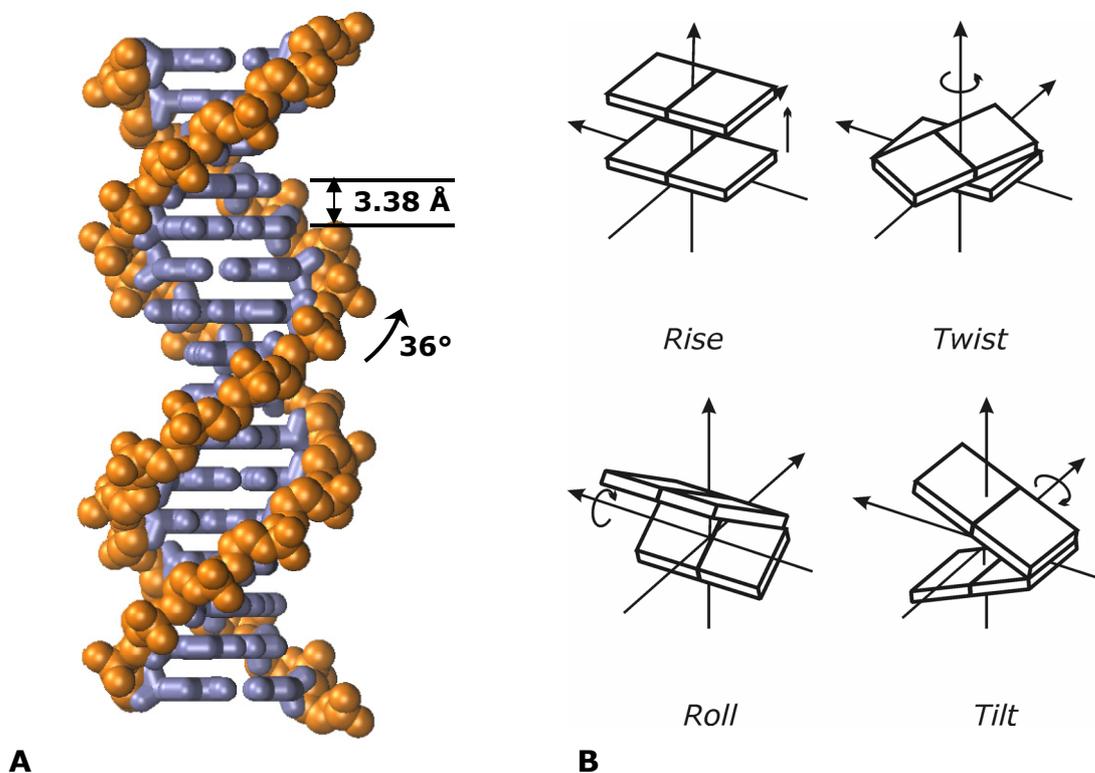


Abbildung 1-1: Modelle zu DNA-Strukturen **A)** Zylinderförmiges Modellschema einer B-DNA. Darstellung von 1,5 Windungen. Die Nucleoside sind blau, das Rückgrat orange gekennzeichnet. Der Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basen entspricht dem Torsionswinkel (*Twist*) und der Abstand zwischen den Basen dem Höhenversatz (*Rise*). **B)** Translative (*Rise*) und rotative (*Twist*, *Roll* und *Tilt*) Parameter zur Beschreibung von DNA-Konformationen (nach (Dickerson 1989)).

Diese regelmäßige Geometrie der DNA stellt jedoch einen Grenzfall dar. Die Parameter, die sie beschreiben, sind aus Röntgenkristallographiedaten gewon-

nene Mittelwerte. Die Nukleotidabfolge wirkt sich aufgrund der verschiedenen Struktur der vier Basen jedoch auf die Helix-Parameter *Rise*, *Twist*, *Roll* und *Tilt* unterschiedlich aus. Diese Parameter, die in Abbildung 1-1B schematisch dargestellt sind, können dazu benutzt werden, um die Heterogenität der DNA- und RNA-Strukturen zu beschreiben.

Wie man sich vorstellen kann, wirken sich diese Parameter nicht nur auf die Orientierung der in der Abbildung 1-1B dargestellten Basenpaare aus, sondern auch auf das Zuckerphosphorsäure-Rückgrat der DNA. Dieses wird mit Hilfe von fünf Torsionswinkeln beschrieben, die in der folgenden Abbildung 1-2 dargestellt sind.

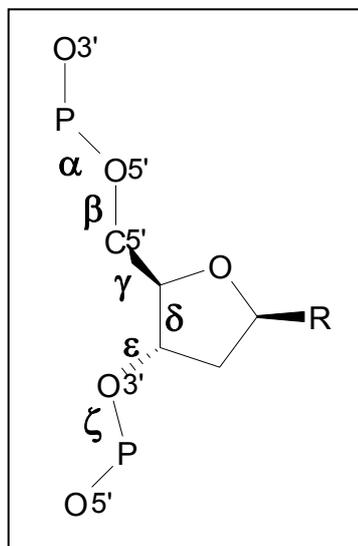


Abbildung 1-2: Definition von Torsionswinkeln im DNA-Rückgrat Die Torsionswinkel sind in 5'→3'-Richtung entlang des Phosphorsäure-Rückgrates von α nach ζ benannt.

1.2.1.2 Funktion

Da die DNA als Träger genetischer Information dient, ist ihre Primärsequenz von besonders hohem Interesse. Dabei wird zwischen Genen, regulierenden Sequenzen und nicht-kodierenden, meist repetitiven Abschnitten unterschieden. Ihre Funktion nehmen die kodierenden DNA-Sequenzen hierbei in Form von Bindestellen für Proteine der Replikation, Transkription sowie deren Regulierung (Operatoren, Promotoren) ein und dienen schließlich als Matrize für die Transkription.

Aufgrund der Interaktion der DNA mit anderen Molekülen ist neben ihrer Sequenz auch die Struktur und dabei vor allem auch die Sequenzabhängigkeit letzterer von Belang. Denn schließlich übt die DNA ihre Funktion einzig und allein durch ihre sequentielle Variabilität aus. Die Konformationen der Protein-

bindungsstellen sind hierbei von besonderem Interesse, sowohl für sich alleine gesehen als auch im Komplex mit dem jeweiligen Protein.

Durch Mutationen hervorgerufene Veränderungen in der DNA-Sequenz resultieren häufig in Störungen der regulären Struktur. Es ist die Aufgabe von Reparaturproteinen, jene zu erkennen und zu beseitigen. Zu den charakteristischen Mutationsarten zählen unter anderem Fehlpaarungen (engl. *mismatch*) und herausstehende Basen (engl. *bulge*). Mit der Konformation letzterer befaßt sich ein Teil der vorliegenden Arbeit.

1.2.2 RNA

Während die DNA rein als Träger der genetischen Information dient, übernimmt die RNA neben ihrer Funktion als Matrize für die Proteinsynthese (mRNA, engl. *messenger RNA*) auch katalytische (rRNA, *ribosomale RNA*; snRNA, engl. *small nuclear RNA*) und dirigierende (tRNA; *transfer RNA*) Aufgaben. Sie liegt für gewöhnlich als Einzelstrang vor, mit Ausnahme von einigen Viren. Nichtsdestotrotz enthalten RNA-Moleküle doppelhelikale Regionen durch die Ausbildung von Haarnadelschleifen (engl. *hairpin loops*) und seltene abschnittsweise Paarung mit anderen RNA-Strängen. Der Anteil an helikalen Regionen variiert in den verschiedenen Arten der RNA; ein typischer Wert ist 50% (Stryer 1996).

1.2.2.1 Struktur

Die 2'-OH Gruppe der Ribose hält die RNA durch sterische Hinderung davon ab, eine klassische Watson-Crick B-Helix auszubilden. Das Problem wird durch die Formation einer breiteren und gestauchteren Helix-Form gelöst, der A-Helix. Unter dehydrierenden Bedingungen findet man diese Form auch bei der DNA.

Die A-Helix ist ebenso wie die B-Helix eine rechtsgängige Helix bestehend aus zwei antiparallelen Strängen. Die unterschiedliche Packform entsteht vor allem aus dem andersartigen Puckering (engl. *pucker*; Faltung) der Ribose, welche in der B-Helix in der 2'-*endo* und in der A-Helix in der 3'-*endo* Konformation vorliegt. Ein weiteres Charakteristikum der A-Helix, welches aus dieser Zucker-Konformation resultiert, ist die Neigung der Basen relativ zur Helix-Achse. Die Helixparameter für die A-RNA im Vergleich zu der B-DNA sind in Tabelle 1-1 zusammengefaßt.

Tabelle 1-1: Vergleich der Helixparameter von A-RNA und B-DNA

<i>Helixparameter</i>	<i>Helix-Typ</i>	
	A-RNA	B-DNA
<i>Rise</i>	2.81 Å	3.38 Å
<i>Twist</i>	32.7°	36°
<i>Roll</i>	6.3°	0.6°
<i>Tilt</i>	16-19°	0°

(Institute of Molecular Biotechnology 2005)

Neben der doppelhelikalen A-Helix Struktur sind weitere individuelle Strukturen der RNA, wie sie in der humanen Zelle vorliegen, Bestandteil dieser Arbeit. Die RNA bietet durch die Ausbildung von mehr oder weniger langen *hairpin-loops* (engl.; Haarnadelschleifen), *stem-loops* (engl.; Stammschleifen), unterschiedlich großen *bulges* (engl.; Beule) eine hohe Variabilität an Strukturen, welche ähnlich wie Proteine katalytische Aufgaben übernehmen können. Durch das Zusammenwirken von mehreren Einzelsträngen können des weiteren *three-way junctions* (engl.; Dreiwegkreuzungen) und *four-way junctions* (engl.; Vierwegkreuzungen) generiert werden.

1.2.2.2 Funktion

Wie bereits aufgeführt, übernimmt die RNA in der Zelle Aufgaben, die von der Speicherung (Viren) und Transmission von genetischen Informationen bis hin zu ihrer Expression in Form von Proteinen rangieren. Das informationstragende Intermediat für die Proteinsynthese ist hierbei die mRNA, deren Sequenz und weniger die Struktur die tragende Rolle spielt. An der Prozessierung des primären mRNA-Transkripts bis hin zur reifen mRNA sind die spleißosomalen Komplexe beteiligt. Letztere bestehen selbst neben Proteinen aus kurzen RNA-Stücken, den snRNAs (engl. *small nuclear ribonucleic acids*). Da die Strukturbestimmung einiger dieser RNAs Bestandteil dieser Arbeit ist, wird auf diese Komplexe im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Im Laufe der Translation – der Übersetzung des genetischen Codes in eine Aminosäuresequenz – sind mehrere Arten der RNA beteiligt. Zum einen die rRNA, welche Bestandteil der Ribosomen – einer weiteren Form eines enzymatischen

RNA-Protein-Komplexes – ist. Die Ribosomen benutzen die mRNA als Matrize, um Proteine zu synthetisieren. Die Codons der mRNA werden mit Hilfe von tRNAs abgelesen, welche die ihnen zugewiesenen Aminosäuren tragen. Letztere werden schließlich von den Ribosomen zu einer Kette – der Proteinprimärstruktur – verknüpft.

Neben diesen Hauptformen der RNA gibt es noch weitere Gruppen (z.B. *small nucleolar RNA*), welche in einer nicht so großen Quantität in der Zelle vorliegen. Ihre Omnipräsenz ist jedoch ein Hinweis dafür, daß die RNA evolutionstechnisch vor der DNA und den Proteinen entstanden ist.

1.2.3 Strukturbestimmung von Oligonukleotiden

Die antiparallele doppelhelikale Struktur der DNA mit den sich treppenartig stapelnden Basen im Inneren der Helix und dem äußeren Ribosephosphatrückgrat ist bereits 1953 bestimmt worden (Watson & Crick 1953). Die DNA und die RNA bieten jedoch durch die Ausbildung von beispielsweise *four-way junctions*, *loops* oder durch die Bindung von Proteinen eine Fülle von Strukturen, die von den regulären helikalen Konformationen abweichen. Die Röntgenkristallographie und die NMR-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*) waren dabei die maßgeblichen Techniken, die in den 70er und vor allem 80er Jahren die Strukturbestimmung vorantrieben. Während sie immer noch den Großteil der neuen Strukturen liefern und theoretisch eine atomare Auflösung ermöglichen, haben auch diese Techniken ihre Nachteile und gewisse Grenzen. Sie sind meist mit einem sehr hohen Aufwand verbunden, liefern nur mittlere Werte von Ensembles und sind im Falle der Röntgenkristallographie relativ weit von *in vivo*-Bedingungen entfernt. Signifikante Krümmungen in DNAs, wie sie aus ungepaarten Basen oder sequenzspezifischen Helixparametern resultieren, sind weiterhin durch Vergleiche der elektrophoretischen Beweglichkeit in Polyacrylamid-Gelen nachgewiesen worden (Bhattacharyya & Lilley 1989; Rice & Crothers 1989; Wang & Griffith 1991). Diese Messungen liefern aber meist recht ungenaue Werte.

Eine Alternative bietet hier die optische Spektroskopie in Form von absorptions- und fluoreszenzspektroskopischen Methoden. Die ersten FRET-Ensemblemessungen zur Charakterisierung von Nukleinsäurestrukturen sind Anfang der 90er Jahre durchgeführt worden (Hochstrasser *et al.* 1992; Jares-Erijman & Jovin 1996). Die unterschiedliche Gängigkeit von B- und Z-DNA ist 1993 von R.M. Clegg mittels FRET aufgezeigt worden (Clegg *et al.* 1993). Die

Einführung von Knicken in die DNA durch herausstehende Basen und deren anschließender Nachweis ist an mehreren Stellen gezeigt worden (Gohlke *et al.* 1994; Lorenz *et al.* 1999; Stühmeier *et al.* 1997).

Die FRET-Einzelmolekülspektroskopie an B-DNA in Lösung ist schließlich Ende der 90er Jahre eingeläutet worden (Deniz *et al.* 1999; Ha *et al.* 1996; Klostermeier & Millar 2001; Lee *et al.* 2005). Im Falle der RNA sind Konformationsänderungen in Ribozymen aufgezeigt worden (Zhuang *et al.* 2000). Lange Beobachtungszeiten lieferten Messungen von auf Oberflächen immobilisierten Molekülen (Ha *et al.* 1999b; Sabanayagam *et al.* 2005). Die im Zuge dieser Arbeit aufgeführten Messungen reihen sich in die in Lösung durchgeführten Einzelmolekülexperimente an Oligonukleotiden ein. B-DNA und A-RNA werden dabei abermals als molekulares Lineal benutzt, jedoch wird die Fragestellung über die des Aufzeigens der Helizität erweitert. Im Laufe der Arbeit werden unterschiedlich lange chemische Verknüpfungen, im weiteren Verlauf der Arbeit Linker genannt, zum Anbinden der Fluorophore an die Helices benutzt, um Aussagen über ihre Auswirkung auf die Beweglichkeit und den Orientierungsfaktor κ^2 zu treffen. Für die Bestimmung von absoluten Abständen werden daraus Korrekturen für die experimentellen Daten hergeleitet, um schließlich dreidimensionale Strukturen der DNA in Form von Biegungen und Knicken zu charakterisieren.

1.3 Das humane U12-abhängige Spleißosom

Die Gene der Eukaryonten setzen sich aus kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzen zusammen. Aus dem Primärtranskript der DNA - der prä-mRNA - müssen die Introns (nicht-kodierende Sequenzen) herausgeschnitten und die kodierenden Exons exakt zusammengefügt werden. Das sogenannte Spleißen findet im Kern der Zelle statt, wo an die modifizierte prä-mRNA an bestimmte Konsensussequenzen Komplexe aus Ribonukleinsäuren und Proteinen binden - die Spleißosomen.

Die Hauptbestandteile der Spleißosomen sind Uracil-reiche Ribonukleoprotein-Partikel U snRNPs (engl. *uridine-rich small nuclear ribonucleo-protein particles*). Im Falle des in dieser Arbeit behandelten humanen U2-abhängigen Spleißosoms handelt es sich dabei um die snRNP-Partikel U1, U2, U5 und U4/U6, die jeweils eine snRNA der entsprechenden Bezeichnung enthalten. Zusammen mit den

nicht-snRNP-Spleißfaktoren schneiden sie die Introns mittels einer definierten sukzessiven Assemblierung, Katalyse und letztlich Dissoziation aus der prä-mRNA heraus. Die reife mRNA kann dann schließlich aus dem Zellkern transportiert werden und als Matrize für die Translation zur Proteinsynthese dienen (zusammengefaßt in (Burge *et al.* 1999; Green 1991; Moore *et al.* 1993; Moore & Sharp 1993; Nilsen 1998))

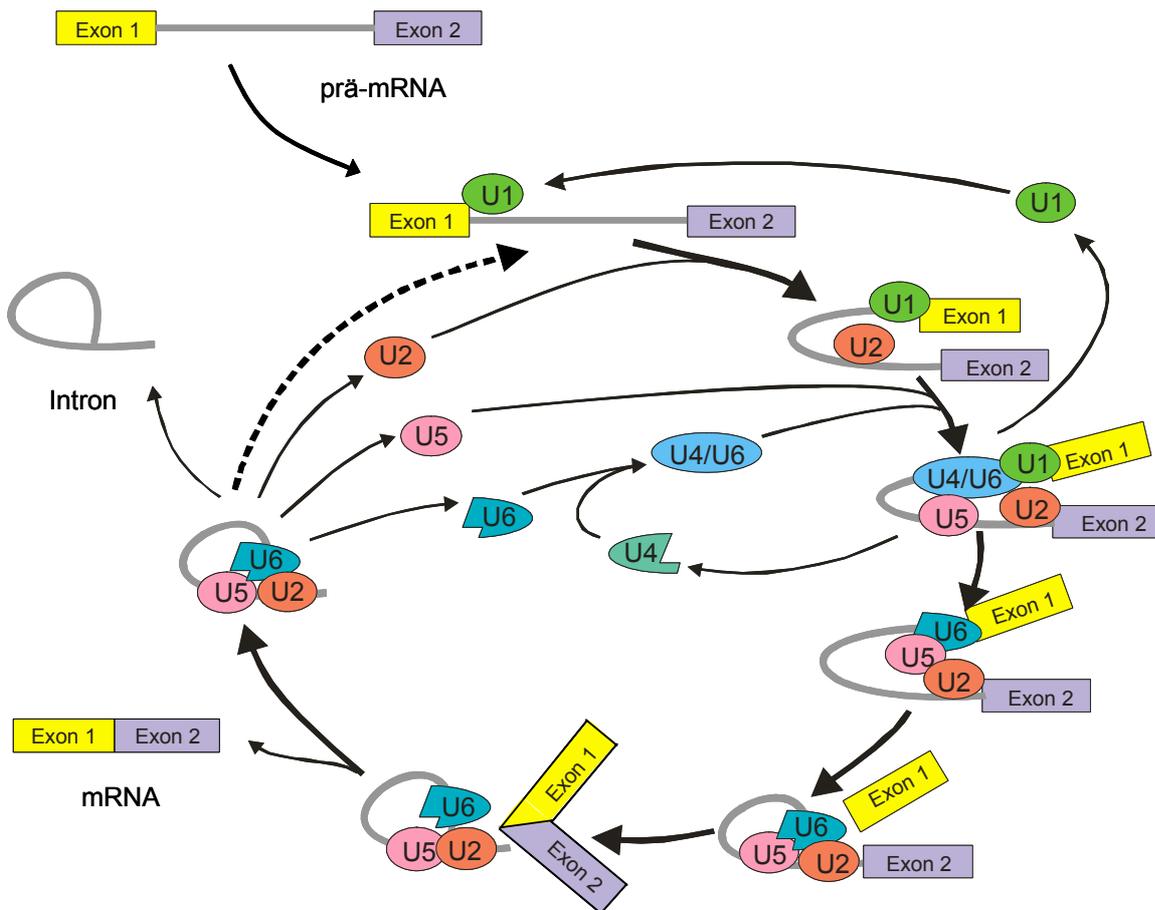


Abbildung 1-3: Spleißosomen-Zyklus der menschlichen Zelle Das Spleißen wird durch das Erkennen der 5'-Spleißstelle mittels des U1 snRNP initiiert. Das U2 snRNP bindet dabei locker an die prä-mRNA; die Bindung wird erst durch die Spaltung von ATP verstärkt. Durch die Assoziierung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs und die darauf folgende Dissoziation der U1 und U4 snRNPs wird das Spleißosom aktiviert. Es findet die erste Transesterifizierungsreaktion zwischen der 5'-Spleißstelle und dem Verzweigungspunkt statt. Mit der zweiten Reaktion werden die beiden Exons miteinander verknüpft. Schließlich wird das Intron in Form eines Lariats zum Abbau freigelassen und die mRNA von Proteinen des *Exon-Exon-Junction* Komplexes aus dem Zellkern begleitet.

Die Spleißreaktion findet in einem sich wiederholenden Zyklus statt, wie er in Abbildung 1-3 skizziert ist (Burge *et al.* 1999; Nilsen 1998):

Das Spleißen wird durch die Bindung vom U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle initiiert. Dies geschieht über komplementäre Basenpaarung mit der prä-mRNA. Das U2 snRNP assoziiert als nächstes locker an die Initiationsstelle; durch Spalten von ATP wird die Bindung an die Verzweigungsstelle fester. Im nächsten Schritt bindet der tri-snRNP [U4/U6.U5]. U4 und U6 sind dabei über eine Basenpaarung miteinander assoziiert. Die Komplexierung von U5 geschieht wiederum über die Proteine 61K und 102K (Makarova *et al.* 2002). Das Spleißosom wird durch die Dissoziation von U1 als auch U4 snRNP aktiviert (Lamond *et al.* 1988; Yean & Lin 1991); die intermolekulare Basenpaarung zwischen U4 und U6 wird somit aufgehoben. Die U4 snRNA besitzt damit die Funktion eines negativen Regulators. Nun kann der erste Schritt der Katalyse stattfinden, nämlich das Spleißen der 5'-Stelle des Introns in einer Transesterifizierungsreaktion. An der U2-Bindungsstelle wird ein Lariat ausgebildet. Im zweiten Schritt findet dann eine Ligation der beiden das Intron einschließenden Exons statt und die reife mRNA kann aus dem Spleißosom freigelassen werden. Alle Bestandteile des Spleißosoms werden recycelt und an einem weiteren Intron von neuem assembliert.

1.3.1 Das U4/U6 snRNP

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Duplex der U4/U6 snRNA und die damit assoziierten Proteine 15.5K und 61K. Wie bereits erwähnt geschieht die Verknüpfung der beiden RNAs über komplementäre Basenpaarung in den Stämmen I und II, wie sie in Abbildung 1-4 dargestellt ist.

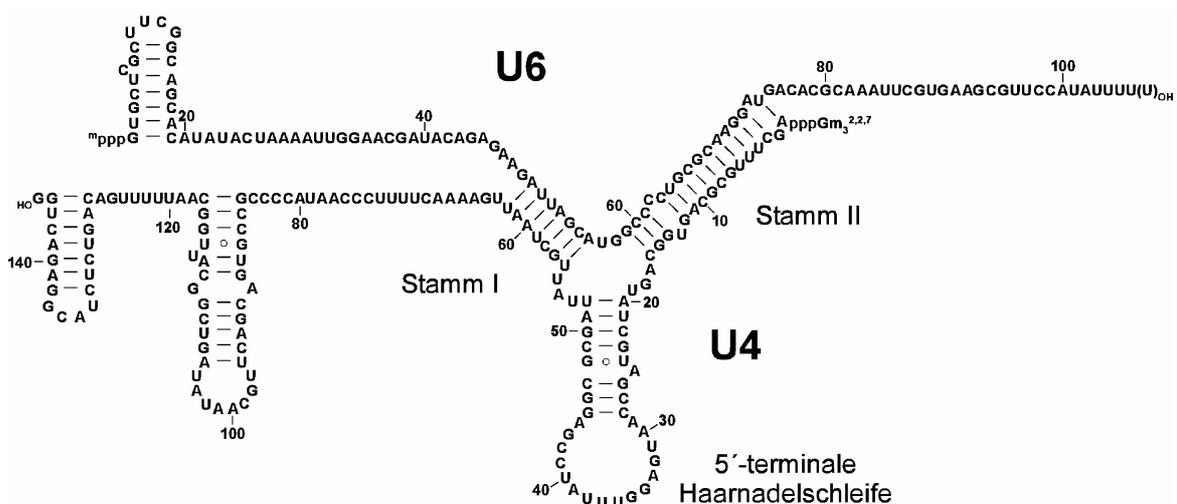


Abbildung 1-4: Primär- und Sekundärstruktur des humanen U4/U6 snRNA Duplex Die U4 snRNA bildet über intermolekulare Basenpaarung mit der U6 snRNA eine Y-förmige Interaktionsdomäne aus, bestehend aus Stamm I, Stamm II und der 5'-terminalen Haarnadelschleife von U4 snRNA (nach (Brow & Guthrie 1988; Padgett & Shukla 2002)).

Die beiden Stämme werden durch die 5'-terminale Haarnadelschleife der U4 snRNA unterbrochen, resultierend in einer Y-förmigen Interaktionsdomäne bestehend aus drei Helices. Ein Ziel der Arbeit besteht darin, die 3D-Struktur dieser *three-way junction* zu bestimmen.

Das U4/U6 snRNP weist unter anderem fünf spezifische Proteine auf, die entsprechend ihren Molekulargewichten in kDa 15.5K, 20K, 60K, 61K und 90K genannt werden. Die Proteine 61K und insbesondere 15.5K sind Inhalt dieser Arbeit, und es wird im folgenden auf sie eingegangen.

Beide Proteine binden die Duplex an der 5'-terminalen Haarnadelschleife (Nottrott *et al.* 1999). Das 15.5K Protein besteht aus 128 Aminosäuren und ist evolutionär hochkonserviert. Es finden sich Vertreter in anderen Organismen, wie das Snu13 in *Saccharomyces cerevisiae* und L7Ae in dem Archeabakterium *Haloarcula marismortui* (Klein *et al.* 2001). Das 15.5K treibt die Assemblierung der U4/U6 snRNP voran und wird für die Rekrutierung von 61K und des 20/60/90K Proteinkomplexes an die U4 snRNA benötigt. Des weiteren konnte das 15.5K Protein ebenfalls als ein integraler Bestandteil des C/D-Box snoRNPs (engl. *small nucleolar RNPs*, kleine nukleolare RNPs) charakterisiert werden (Watkins *et al.* 2000). Dabei wurden Homologien in der Sekundärstruktur der U4 snRNA 5'-terminalen Haarnadelschleife und dem C/D-Box Sequenzmotiv aufgezeigt.

Die Aufgabe des 61K besteht in der Vermittlung der Ausbildung funktionaler [U4/U6.U5] tri-snRNP Komplexe (Makarova *et al.* 2002). Dies wird auf die Wechselwirkung des Proteins mit dem U5 snRNP-spezifischen Protein 102K zurückgeführt. Hydroxylradikal-Schutzexperimente und UV-Quervernetzungsstudien (Nottrott 2002) konnten zwei Bindungsstellen des 61K Proteins an der U4/U6 snRNA festmachen: zum einen Nukleotide innerhalb der U4 snRNA 5'-terminalen Loopregion, welche in direkter Nachbarschaft zur 15.5K Proteinbindungsstelle lokalisiert sind; zum anderen Positionen rechts der *three-way junction*, in Richtung Stamm II (Nottrott *et al.* 2002). Ferner wird in der Publikation postuliert, daß das 15.5K Protein eine Konformationsänderung induziert, welche die Bindung des 61K Proteins erst ermöglicht.

Das komplette Bild der U4/U6 snRNA mit einigen spezifischen Proteinen ist in Abbildung 1-5 zusammengefaßt.

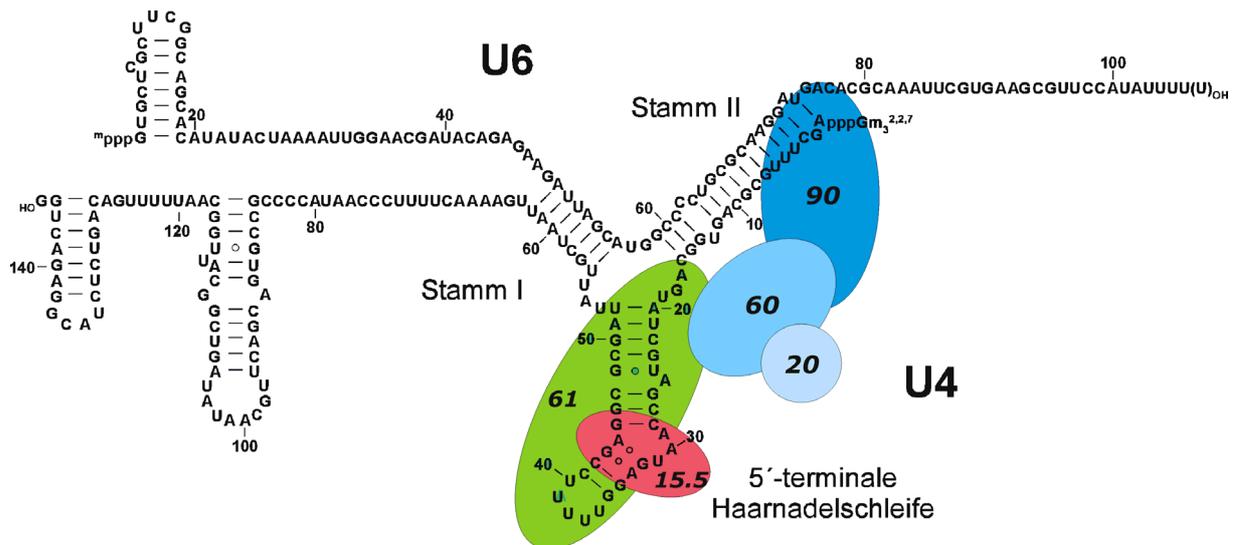


Abbildung 1-5: Sekundärstruktur des humanen U4/U6 snRNP Neben der Primär- und Sekundärstruktur des U4/U6 snRNA Duplex sind auch die duplexspezifischen Proteine entsprechend ihrer Kontaktstellen untereinander und mit der RNA aufgezeigt.

Während die Sekundärstruktur und die Proteinbindungsstellen der U4/U6 snRNA wie hier aufgeführt bereits bekannt sind, soll im Zuge der vorliegenden Arbeit die dreidimensionale Struktur der *three-way junction* mittels Triangulation ermittelt werden. Dazu wird die RNA an mehreren Positionen markiert und unterschiedliche Abstände zwischen den helikalen Armen vermessen. Diese sollen dazu herangezogen werden, um eine Strukturvorhersage über die Orientierung der drei Helices zueinander zu treffen.

1.3.1.1 Three-way junctions

In der Natur gibt es zahlreiche Fälle von *three-way junctions* (3H entsprechend der IUPAC-Nomenklatur (Lilley *et al.* 1995)), die sich v.a. in RNAs immer wieder in Form von strukturellen und funktionellen Motiven wiederfinden lassen. Zu den prominentesten gehören hierbei *three-way junctions* aus der 5S rRNA (Shen & Hagerman 1994), eine ribosomale Proteinbindungsstelle in der 16S rRNA (Orr *et al.* 1998; Serganov *et al.* 1996), das Hammerkopf-Ribozym (Forster & Symons 1987) sowie die P4-P6 Domäne des Gruppe I Intronribozyms (Cate *et al.* 1996). Sie spielen somit eine große Rolle bei den zellulären Prozessen der Translation und des Spleißens, so wie die U4/U6 snRNA *three-way junction*. Obwohl die Präsenz in DNA viel schwächer ausgeprägt ist (Rekombinationsprozesse mit Phagen (Jensch & Kemper 1986), Huntington'sche Krankheit (Sinden 2001)), sind die meisten systematischen Untersuchungen an DNAs durchgeführt worden.

Es ist aber anzunehmen, daß sich die dabei definierten stereochemischen Eigenschaften auf die RNA übertragen lassen. Eine ausführliche Beschreibung der bisher gewonnenen Erkenntnisse über *three-way* und *four-way junctions* findet sich im *Quarterly Review of Biophysics* (Lilley 2000). Die wichtigsten Punkte sollen hier kurz vorgestellt werden.

Die *three-way junction* kann aus drei vollständig gepaarten Helices bestehen (3H), oder kann aber zusätzliche ungepaarte Basen in einer (3HS_n) oder mehreren (2HS_nHS_m oder HS_nHS_mHS_p) Strängen an der Stelle der Kreuzung enthalten. Helices sind auch in Kreuzungen tendenziell danach bestrebt, eine Stapelung der Basen zu erreichen. Bei einer 3H *junction* führt die vollständige Basenpaarung jedoch zu einer steifen Konformation, bei welcher die drei Helixarme voneinander wegzeigen (Stühmeier *et al.* 1997). Jedoch sollte man dabei nicht von einer Koplanarität und einem Winkel von 120° der Helices zueinander ausgehen (Lu *et al.* 1991). Untersuchungen, bei welchen sogenannte *bulges* in eine der Helices an der Kreuzung eingeführt wurden, haben aufgezeigt, daß sich zwei der Helices mit steigender Anzahl an ungepaarten Basen einander annähern (Stühmeier *et al.* 1997; Yang & Millar 1996). Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Helices ist diese Faltung ionenabhängig. Es wird dabei angenommen, daß sie von der coaxialen Stapelung zweier Helices thermodynamisch angetrieben wird. Infolge der möglichen Stapelung der nicht-*bulge*-enthaltenden Helix mit den beiden anderen Helices sind zwei unterschiedliche Konformere bei der Faltung möglich. Sie sind in Abbildung 1-6B dargestellt.

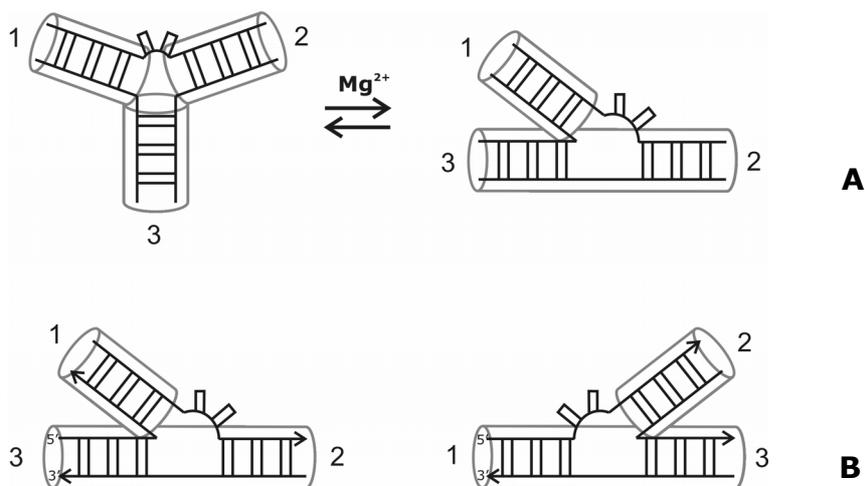


Abbildung 1-6: Schema der koaxialen Helixstapelungen in *three-way junctions* (A) Einfluß von Magnesium auf die Stapelung. Die Ionen ermöglichen eine Annäherung von den Helices aneinander und damit erst die Stapelung. (B) Zwei mögliche Konformationen bei ungepaarten Basen in einem Strang (nach (Lilley 2000)).

Ein Ziel der Arbeit ist es, über die gemessenen Abstände eine Aussage über eine eventuelle Faltung der U4/U6 snRNA *three-way junction* treffen zu können. Es soll bestimmt werden, welche Helices koaxial aufeinander stapeln und welche Orientierung die dritte Helix einnimmt.

1.3.2 Der *Kink-turn*

Durch eine Reihe von Mutationsstudien konnte aufgezeigt werden, daß die 5'-terminale Haarnadelschleife der U4 snRNA eine essentielle Rolle beim Spleißen der prä-mRNA spielt (Bordonne *et al.* 1990; Hu *et al.* 1994; Vankan *et al.* 1992; Wersig & Bindereif 1992). Die RNA Struktur der 5'-terminalen Haarnadelschleife der humanen U4 snRNA ließ sich der neuartigen Familie der *Kink-turns* bzw. *K-turns* zuordnen, wie sie in Klein *et al.* (Klein *et al.* 2001) beschrieben sind. Es handelt sich dabei um ein zweisträngiges Helix – interne Schleife/*bulge* – Helix Motiv, welches etwa 15 Nukleotide enthält. Die Struktur hat eine charakteristische Krümmung des Zuckerphosphatrückgrats zufolge. Die Konsensusstruktur ist in Abbildung 1-7 dargestellt. Homolog läßt sich die Struktur für die U4 snRNA darstellen. Essentiell für die Ausbildung des *K-turns* und das daraus resultierende Vermögen, das 15.5K Protein zu binden, ist dabei die Fähigkeit von vier Nukleotiden der Schleifenregion, Basenpaarungen einzugehen (G34-C42 und G35-C41) (Nottrott *et al.* 2002).

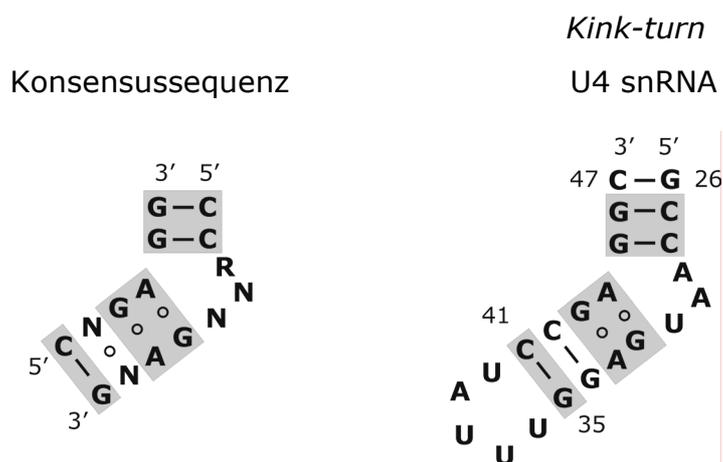


Abbildung 1-7: Sekundärstrukturmotiv des *Kink-turns* Die Konsensussequenz resultiert aus dem Vergleich von acht verschiedenen *K-turns* (nach (Klein *et al.* 2001)), wobei es sich um ein Proteinbindemotiv handelt. Im Falle der 5'-terminalen Haarnadelschleife der U4 snRNA wird der *K-turn* durch die Bindung des 15.5K Proteins induziert (Vidovic *et al.* 2000). N: beliebiges Nukleotid; R: Purinbase

Neben der Bestimmung der Konsensussequenz konnte zudem aufgezeigt werden, daß homologe Proteine mit dem *K-turn* Motiv auf analoge Weise wechselwirken (Ban *et al.* 2000; Klein *et al.* 2001).

Biochemische Studien als auch die Röntgenstrukturanalyse konnten essentielle Nukleotide für die Ausbildung des 15.5K Protein-U4 snRNA Komplexes nachweisen: U31, G32 und G43 (Nottrott *et al.* 1999; Vidovic *et al.* 2000). Die Kristallstruktur des Komplexes bestehend aus der 5'-terminalen Haarnadelschleife und 15.5K ist in Abbildung 1-8 dargestellt.

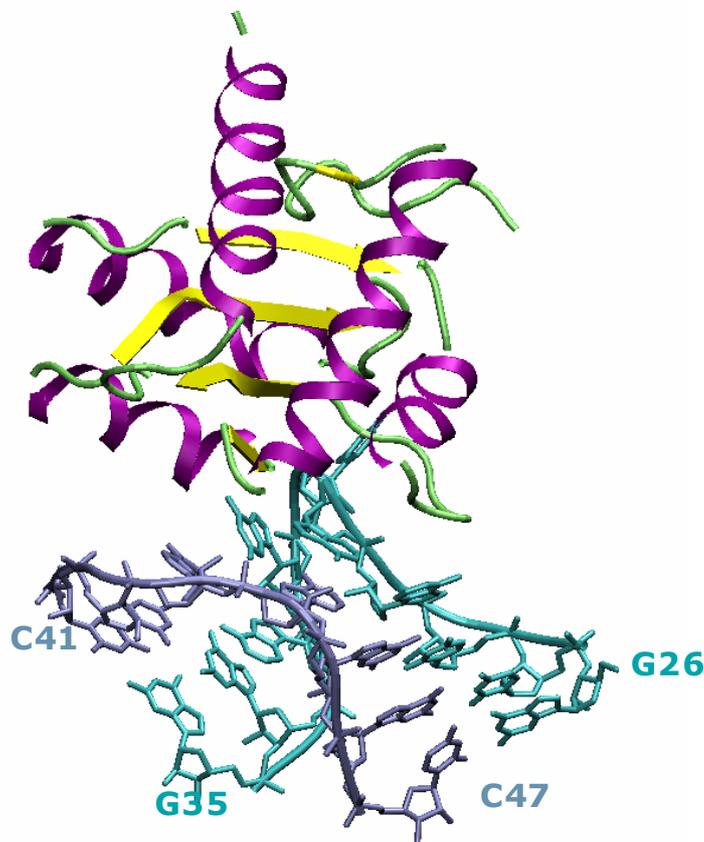


Abbildung 1-8: Kristallstruktur des U4 snRNA/15.5K Protein-Komplexes Atomare Struktur der humanen U4 snRNA 5'-Haarnadelschleife (G26-C47) im Komplex mit dem 15.5K Protein nach (Vidovic *et al.* 2000). Die Schleifennukleotide sind aufgrund einer schlechten Ortsauflösung nicht dargestellt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung des *K-turns* in Anwesenheit und Abwesenheit des 15.5K Proteins mittels MFD-FRET Messungen und der Vergleich der in Lösung bestimmten Struktur mit derjenigen im Kristall. Des weiteren soll die Abhängigkeit der Struktur von mono- und bivalenten Ionen untersucht werden. Frühere Studien haben gezeigt, daß die Faltung vieler RNA-

Strukturen ionenabhängig ist. Ionen können in spezifischer Weise an RNA-*junctions* binden und Faltung induzieren, oder über unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen die RNA-Struktur beeinflussen (Auffinger *et al.* 2004). Um dies zu untersuchen, wurden hier intramolekulare Abstände bei variierenden Mg^{2+} - und Na^{+} -Konzentrationen gemessen.

2 GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind mit Hilfe von unterschiedlichen Fluoreszenztechniken erschlossen worden. Dabei dienten extrinsische Fluorophore als Reporter, die Aufschluß gaben über Struktur und Dynamik. In dem folgenden Kapitel soll aus diesem Grunde zunächst auf die grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften der Fluoreszenz eingegangen werden, bevor im speziellen der fluoreszenzresonante Energietransfer, die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie sowie die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion im experimentellen Zusammenhang beschrieben werden.

2.1 Absorption

Chromophore (gr. *chromos*: farbtragend) sind in der Lage, Licht im UV/VIS-Bereich (ultraviolett (UV) und sichtbar (VIS, engl. *visible*): 180 bis 800 nm) zu absorbieren. Dabei werden die Valenzelektronen dieser (Makro-)Moleküle in höhere elektronische Zustände versetzt. Neben Auswahlregeln, die bestimmen, ob ein Übergang überhaupt erlaubt ist (Spinverbot, Symmetrieverbot, Paritätsverbot), muß vor allem die Bohr'sche Frequenzbedingung erfüllt sein. Demnach muß die Energie einer Wellenlänge λ des elektromagnetischen Spektrums der Energiedifferenz ΔE zwischen zwei Energieniveaus entsprechen. Die Energie des Photons ergibt sich aus der Frequenz der elektromagnetischen Welle

ν und dem Planck'schen Wirkungsquantum h ($h=6,63 \cdot 10^{-34}$ Js), bzw. durch Zuhilfenahme der Lichtgeschwindigkeit c' auch aus der Wellenlänge.

$$\Delta E = h\nu = h \cdot \frac{c'}{\lambda} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

Wie stark ein Molekül Licht absorbiert, ist wiederum durch den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ festgelegt. Es handelt sich dabei um eine molekül- und wellenlängenspezifische Größe, welche mit der Extinktion E das Verhältnis – genauer gesagt den Logarithmus – eingestrahelter Lichtintensität I_{ein} zur transmittierten Lichtintensität I_{trans} beschreibt. Die Extinktion ist zudem von der Konzentration c [M] und der Schichtdicke d [cm] der Probe im Lichtstrahl abhängig. Damit erhält ε die Einheit [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]. Bei einer Schichtdicke von 1 cm wird die Extinktion auch als optische Dichte $o.D.$ bezeichnet.

$$E = \log \frac{I_{ein}}{I_{trans}} = \varepsilon(\lambda_{Ex})cd \quad (\text{Gl. 2-2})$$

Dieser Zusammenhang ist als das Lambert-Beer'sche Gesetz bekannt.

Neben der Extinktion, die unter anderem zur Konzentrationsbestimmung benutzt werden kann, ist bei der Absorption die Geschwindigkeitskonstante k_{Abs} für den Übergang vom elektronischen Grundzustand in den höher angeregten Zustand von Interesse. Dieser Prozeß ist proportional zur Leistungsdichte des eingestrahelten Lichtes I , dem Absorptionsquerschnitt des Moleküls $\sigma(\lambda_{Ex})$ und der inversen Photonenenergie γ .

$$k_{Abs} = I\sigma(\lambda_{Ex})\gamma \quad \text{mit} \quad \gamma = \frac{\lambda}{hc} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

Dabei berechnet sich der Absorptionsquerschnitt aus dem Extinktionskoeffizienten nach

$$\sigma(\lambda_{Ex}) = 0,385 \cdot 10^{-20} \varepsilon(\lambda_{Ex}) \quad (\text{Gl. 2-4}).$$

2.2 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein optisches Phänomen. Es soll im folgenden auf die Ursachen der Fluoreszenz wie auch auf die photophysikalischen Charakteristika der Fluorophore eingegangen werden, welche in der vorliegenden Arbeit als Reporter genutzt werden.

Fluoreszenz ist neben der Phosphoreszenz die zweite Art der Lumineszenz. Letztere beschreibt allgemein die Emission von Photonen aus angeregten elektro-

nischen Zuständen von Molekülen. Die Zuordnung in Fluoreszenz und Phosphoreszenz geschieht über die Natur des Grund- und des angeregten Zustandes. Im Allgemeinen besitzen Elektronenpaare im Grundzustand eine gegensätzliche Spinorientierung, d.h. sie liegen in der Singulett-Multiplizität vor (Pauli Prinzip). Bei der Anregung wird die Multiplizität für gewöhnlich aufgrund von quantenmechanischen Auswahlregeln bewahrt, die Spinorientierung wird nicht geändert. Geschieht die Emission eines Photons aus dieser Konstellation, handelt es sich um Fluoreszenz. Der Übergang vom angeregten Singulettzustand zum nicht angeregten Singulettzustand ist quantenmechanisch erlaubt, und so sind die typischen Emissionsraten mit $\geq 10^8 \text{ sec}^{-1}$ recht groß. Vollzieht das Elektron jedoch im angeregten Zustand einen – quantenmechanisch „verbotenen“ – Spinwechsel, geht es damit in den Triplett-Zustand über. Die Deaktivierung aus diesem Zustand dauert – da verboten – länger und die Lebensdauer dieses Zustandes kann somit im Bereich von Millisekunden über Minuten und gar Stunden liegen.

Fluoreszenz ist durch ihre Lebensdauer im Nanosekunden-Bereich und ihre meist recht hohe Quantenausbeute im Vergleich zu anderen Deaktivierungsprozessen von hohem Interesse für Strukturuntersuchungen. Viele biologische Moleküle besitzen intrinsische Fluoreszenz; so z. B. die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin in Proteinen und Cofaktoren wie NADH und Riboflavin. Ihre Leuchtkraft ist jedoch nicht sehr groß und die Anregung liegt im Falle von Proteinen im UV-Bereich, was die Anregung mit herkömmlichen Lichtquellen erschwert. Folglich sind Fluorophore entwickelt worden, die diese Eigenschaften erfüllen. Diese Substanzen enthalten im allgemeinen ein konjugiertes Elektronensystem, welches delokalisiert ist. Die Größe des Systems determiniert die Fluoreszenzwellenlänge. Die extrinsischen Fluorophore erlauben eine Modifizierung der Biomoleküle an der erwünschten Position. Sie weisen hohe Photostabilität und Quantenausbeute auf und ermöglichen somit eine lange Beobachtungszeit bzw. ergeben ein günstiges Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Die folgenden Grundlagen der Fluoreszenz werden am Beispiel der in den vorliegenden Untersuchungen genutzten Fluorophore vorgestellt, welche zu der Familie der Rhodamine und Cyanine gehören.

2.2.1 Grundlagen

Das Prinzip der Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung läßt sich am einfachsten an dem von Aleksander Jabłoński entwickelten Energiediagramm erklären (Abbildung 2-1). Der Grund- und der erste angeregte elektronische Singulett-Zustand sind mit S_0 und S_1 deklariert. Jeder dieser Zustände wird durch Schwingungen in weitere Vibrationsniveaus aufgespalten, die in Abbildung 2-1 von 0 bis 3 durchgezählt sind. Bei Anregung geht das Molekül vom untersten vibronischen Zustand S_0 in einen der vibronischen Zustände von S_1 oder in ein höheres Energieniveau über. Die Anregung erfolgt nahezu instantan ($\sim 10^{-16}$ s), so daß die Atomkerne dabei keine räumliche Verschiebung erfahren. Dies ist als das Franck-Condon-Prinzip bekannt. Die Überschneidung der Wellenfunktionen des Grund- und des angeregten Zustandes ergibt die Wahrscheinlichkeit für den jeweiligen Übergang und somit entsprechend die Intensität der Absorptionsbande. Bei Messungen in Lösung sind die Vibrationszustände jedoch häufig nicht aufgelöst, es kommt zur inhomogenen Verbreiterung der Spektrallinien.

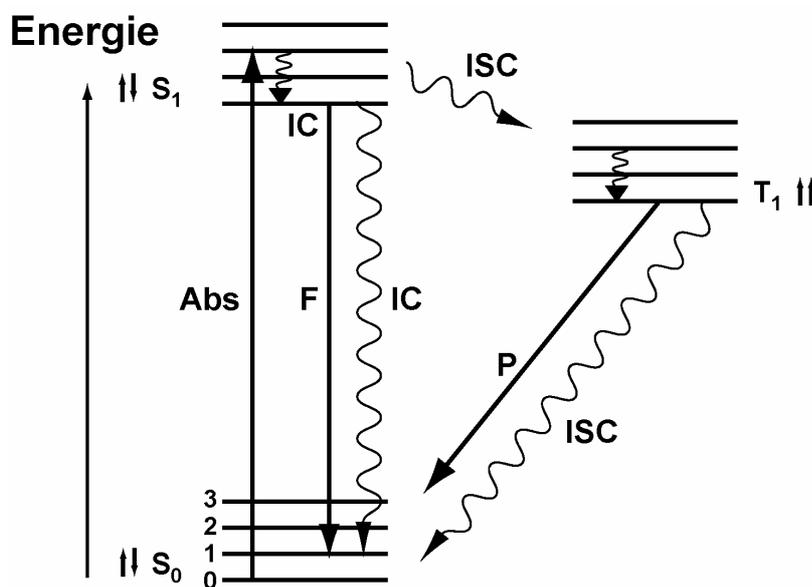


Abbildung 2-1: Jabłoński-Diagramm Schematische Darstellung der elektronischen und Vibrationszustände eines Fluorophors mit den möglichen Übergängen. S_0 : Singulettgrundzustand, S_1 : erster angeregter Singulettzustand; T_1 : erster angeregter Triplettzustand. Höhere mögliche Zustände sind nicht aufgezeigt. Die kurzen geraden Pfeile zeigen die Orientierung des Elektronenspins an. Zu den möglichen Übergängen gehören: **Abs**: Absorption; **IC**: *Internal conversion*; **F**: Fluoreszenz; **ISC**: *Intersystem Crossing*; **P**: Phosphoreszenz. Die durch gerade Pfeile dargestellten Übergänge sind an elektromagnetische Strahlung gekoppelt, die wellenartigen repräsentieren strahlungslose Übergänge.

Nach erfolgter Absorption relaxiert das Molekül sehr schnell in den untersten Schwingungszustand des angeregten Zustandes S_1 (Regel von Kasha). Dies geschieht strahlungslos und wird *Internal Conversion IC* (engl.; interne Umwandlung) genannt. Aus dem S_1 -Zustand führen nun verschiedene Prozesse zur Depopulation. Neben einer abermaligen internen Konversion kann das Molekül auch wie erwünscht über Fluoreszenz direkt in den Grundzustand zurückkehren. Wie im Jabłoński-Diagramm dargestellt, erfolgen Absorption und Emission meist aus unterschiedlichen Vibrationsniveaus heraus: Die Emission ist folglich energieärmer und führt zu einer bathochromen Verschiebung des Fluoreszenzspektrums (Stokes-Shift) (vgl. Spektren im Angang). Ein weiteres Charakteristikum von Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors ist die Spiegelbildlichkeit beider. Das Absorptionsspektrum ist durch die Schwingungszustände des angeregten Zustands S_1 charakterisiert; beim Fluoreszenzspektrum sind es die von S_0 ; im Allgemeinen liegen die Franck-Condon-Faktoren der Schwingungsniveaus in beiden Zuständen in der selben Größenordnung.

Befinden sich Moleküle im ersten angeregten Zustand, können diese des weiteren über *Intersystem Crossing ISC* (engl.; Systemwechsel) in den ersten angeregten Tripletzustand wechseln, was wie bereits erwähnt quantenmechanisch an sich verboten ist, aber durch Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht werden kann. Eine Emission von Photonen aus T_1 heraus wird Phosphoreszenz genannt; sie ist langlebiger und meist bathochromer als Fluoreszenz. Auch hier erfolgt der strahlungsaktive Prozeß nach der Regel von Kasha, die besagt, daß Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz aus dem niedrigsten Vibrationsniveau des ersten angeregten Zustandes erfolgt. Daraus folgt auch, daß Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge sind.

In den nachstehenden Ausführungen sind die folgenden Ratenkonstanten k_i aus dem Jabłoński-Diagramm von Bedeutung:

Tabelle 2-1: Raten aus dem Jabłoński-Diagramm

Rate k_i	Übergang i	
k_{Abs}	Absorption	$h\nu + S_0 \rightarrow S_1$
k_{IC}	Internal Conversion	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$
k_{F}	Fluoreszenz	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$
k_{ISC}	Intersystem Crossing	$S_1 \rightarrow T_1 + \text{Wärme}$
k_{T}	Phosphoreszenz + ISC	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu/\text{Wärme}$

Wie im weiteren Verlauf noch erläutert wird, hängt die Zeit, die ein Molekül in T_1 verbringt, von der Anregungsleistungsdichte ab. Weitere, nicht in dem Schema aufgeführte Relaxationsprozesse sind Lösungseffekte und *quenching* (engl.; Löschung). Zudem sind Moleküle im angeregten Zustand reaktiver, so daß die Wahrscheinlichkeit einer chemischen Reaktion mit Sauerstoff oder anderen Molekülen erhöht ist. Um der Photozerstörung vorzubeugen, werden die Anregungsleistungen und der Puffer im Experiment entsprechend darauf optimiert.

2.2.2 Fluoreszenzquantenausbeute und –lebensdauer

Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl von Fluorophoren ist die Quantenausbeute. Sie beschreibt das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen; folglich liegt der Maximalwert der Quantenausbeute bei eins:

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} \leq 1 \quad (\text{Gl. 2-5})$$

Anders ausgedrückt handelt es sich dabei um den Anteil des Fluoreszenzprozesses an der Summe aller beschriebenen Zerfallsprozesse aus S_1 .

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} (+ k_Q [Q])} \quad (\text{Gl. 2-6})$$

Hier kommt zu den Raten aus dem Jabłoński-Schema eine eventuelle Löschrates k_Q mit der Konzentration des Löschmoleküls $[Q]$ hinzu. Aus der Gleichung ist zu ersehen, daß sich die Quantenausbeute ändert, sobald ein zusätzlicher Zerfallsprozeß aus S_1 möglich wird.

Die oben beschriebenen Raten dienen auch dazu, eine weitere physikalische Größe der Fluoreszenz zu beschreiben: die Fluoreszenzlebensdauer. Sie ist definiert als die mittlere Depopulationszeit des ersten angeregten Zustandes S_1 .

$$\tau_0 = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} (+ k_Q [Q])} =: \frac{1}{k_0} \quad (\text{Gl. 2-7})$$

Wie man der Gleichung 2-7 entnehmen kann, ist die sogenannte Strahlungslebensdauer nicht nur von der Fluoreszenzrate k_F abhängig, sondern zusätzlich auch noch von den Raten der strahlungslosen Prozesse. Diese zusätzlichen Prozesse vermindern die Wahrscheinlichkeit einer Deaktivierung durch Fluoreszenz und verlängern somit die Lebensdauer. Wie in Kapitel 2.4 gezeigt werden

wird, kann man diese Sensitivität der Lebensdauer ausnutzen, um zusätzliche Prozesse im Laufe einer Molekülcharakterisierung nicht nur zu detektieren, sondern auch zu quantifizieren.

An dieser Stelle soll die Verbindung von Gl. 2-6 und 2-7 gezogen werden.

$$\Phi_F = k_F \cdot \tau_0 \quad (\text{Gl. 2-8})$$

In dieser Gleichung wird die Möglichkeit aufgezeigt, die Quantenausbeute mit Hilfe der Lebensdauer zu bestimmen. Dabei wird im allgemeinen eine konstante Fluoreszenzrate k_F angenommen.

Die Bestimmung der Lebensdauer geschieht für gewöhnlich mit Hilfe eines kurzen Lichtpulses eines Lasers oder einer Blitzlampe in einem zeitaufgelösten Experiment. Die Abfallraten des Moleküls aus dem angeregten Zustand charakterisieren das zeitliche Abklingverhalten eines Ensembles von angeregten Fluorophoren im S_1 -Zustand.

$$F(t) = F(0) \cdot e^{-t/\tau_0} \quad (\text{Gl. 2-9})$$

$F(t)$ bezeichnet die Fluoreszenzintensität zur Zeit t bei einer Anfangsamplitude von $F(0)$ bei $t=0$.

Liegen in einer Lösung unterschiedliche Moleküle vor oder werden gleiche Moleküle unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, mag es notwendig sein, die Fluoreszenzlebensdauer mittels eines multiexponentiellen Zerfalls zu beschreiben. Es handelt sich nicht mehr um einen unimolekularen Deaktivierungsprozeß.

$$F(t) = F(0) \sum_i x_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Gl. 2-10})$$

Hier wird für jede Spezies i der Anteil an der Fluoreszenzamplitude x_i und die Lebensdauer τ_i bestimmt. Da durch x_i gleichzeitig der Anteil der i -ten Spezies an der Gesamtheit der Moleküle festgelegt ist, bezeichnet man x_i auch als molekül-gewichtete Amplitude.

Durch eine Normierung von x_i mit der Lebensdauer τ_i kann ferner eine photonengewichtete Amplitude definiert werden.

$$F(t) = F(0) \sum_i \frac{a_i}{\tau_i} \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Gl. 2-11})$$

Die Amplituden a_i geben den Anteil der Photonen der einzelnen Zerfallskomponenten an und werden als fluoreszenzgewichtete Amplituden bezeichnet.

2.2.3 Fluoreszenzanisotropie

Bei der Anregung bzw. Deaktivierung von elektronischen Zuständen in einem Molekül verändert sich dessen zugehöriges Dipolmoment; das daraus resultierende Übergangsdipolmoment ist dafür verantwortlich, ob Licht einer bestimmten Polarisationsrichtung zur Anregung führt bzw. welche Polarisationsrichtung das Emissionslicht besitzt. Wird ein Fluorophor elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt, so kann Absorption prinzipiell nur erfolgen, wenn mindestens eine Komponente des Anregungsübergangsdipolmomentes parallel zum elektrischen Feldvektor des eingestrahlten Lichtes ist. Eine isotrope Verteilung von Fluorophoren, wie sie bei den wäßrigen Meßreihen dieser Arbeit vorliegt, erlaubt die Anregung mit einer linear polarisierten Lichtquelle. Damit wird nur ein Teil der entsprechend orientierten Moleküle angeregt (PhotoSelektion). Die Emission ist relativ zur Absorption meist zu einem gewissen Grad polarisiert, da die Emissionsübergangsdipolmomente unterschiedliche Orientierungen besitzen. Der relative Winkel β zwischen den beiden Momenten definiert die größtmögliche gemessene Anisotropie, die fundamentale Anisotropie r_f .

$$r_f = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{5} \quad (\text{Gl. 2-12})$$

Der Winkel β kann Werte zwischen 0 und $\pi/4$ annehmen, was einen Bereich von -0,2 und 0,4 für r_f definiert. Die fundamentale Anisotropie ist ein fluorophorspezifischer Wert.

Geschieht die Emission nicht homogen in alle Richtungen, behält das Emissionslicht einen gewissen Grad an Polarisation. Quantitativ kann das Ausmaß der Polarisation mit der Anisotropie r beschrieben werden, welche über die Fluoreszenzintensitäten in der - relativ zur Anregungspolarisationsrichtung - parallel (F_p) und senkrecht (F_s) polarisierten Emission definiert ist.

$$r = \frac{F_p - F_s}{F_p + 2F_s} \quad (\text{Gl. 2-13})$$

Ist eine gleichzeitige Bestimmung der beiden Einzelkomponenten nicht möglich, kann die Fluoreszenz, die proportional zur gesamten emittierten Fluoreszenz der Probe $F_{ges} = F_p + 2F_s$ ist, auch bestimmt werden, indem das emittierte Licht in einem Winkel von $54,7^\circ$ (Magischer Winkel; engl.: *magic angle*) relativ zur Polarisation des Anregungslichtes gemessen wird (Lakowicz, 1999). Dabei wird das Licht in der parallelen und senkrechten Polarisationsrichtung in dem

erwünschten Verhältnis von 1:2 detektiert, da die Fluoreszenzintensität proportional zum Quadrat des transmittierten elektrischen Feldes ($F \propto E^2$) ist und $\sin^2 54,7^\circ = 2 \cdot \cos^2 54,7^\circ$. Praktisch wird dieses unter anderem bei Fluoreszenzspektrometern und zeitkorrelierten Einzelphotonenmessungen (engl.: *time correlated single-photon counting*, TCSPC) genutzt.

Die nach Gl. 2-13 experimentell bestimmte Anisotropie kann relativ zu der erwarteten fundamentalen Anisotropie herabgesetzt sein. Dies ist auf Depolarisationsphänomene, die innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer stattfinden, zurückzuführen. Die häufigste und am stärksten ausgeprägte Ursache ist dabei die Rotationsdiffusion (Ehrenberg & Rigler 1974). Sie führt zu einer Depolarisation, da sie zu einer zufälligen Anordnung der Emissionsübergangsdipolmomente führt. Die Anisotropie erweist sich somit als sensitives Maß für die Beweglichkeit der Fluorophore. Für kugelsymmetrische Moleküle nimmt die Anisotropie ein monoexponentielles Abklingverhalten an und es gilt für zeitaufgelöste Anisotropiemessungen:

$$r(t) = r_f \cdot e^{-t/\rho} \quad (\text{Gl. 2-14})$$

ρ ist dabei die Rotationskorrelationszeit.

Ist der Fluorophor an ein großes Molekül gebunden, läßt sich ein mehr exponentielles Verhalten beobachten. Die unterschiedlichen Zerfälle sind auf die lokale Beweglichkeit des Farbstoffs und die globale Bewegung des Gesamtmoleküls zurückzuführen (Lakowicz 1999).

$$r(t) = \sum_j r_j \cdot e^{-t/\rho_j} \quad \text{mit} \quad \sum_j r_j = r_f \quad (\text{Gl. 2-15})$$

Die globale Beweglichkeit läßt sich meist nur beobachten, wenn die lokale Bewegung eingeschränkt ist und nicht schon selbst zur vollständigen Depolarisation führt. Der Anteil der Anisotropie, welcher durch die langsamere – also globale Bewegung des Makromoleküls – abklingt, wird häufig auch residuale Anisotropie r_∞ genannt, da man diesen Wert bei einem auf einer Oberfläche fixiertem Molekül als Offset im Anisotropiezerfall messen würde.

Die für den Zerfall charakteristische Zeit ist die Rotationskorrelationszeit ρ , welche für die Näherung eines kugelförmigen Moleküls von der Viskosität des Lösungsmittels η , der absoluten Temperatur T und dem Rotationsvolumen V abhängig ist (R ist die Gaskonstante).

$$\rho = \frac{\eta V}{RT} \quad (\text{Gl. 2-16})$$

In der Perrin-Gleichung wird schließlich der Zusammenhang zwischen Anisotropie, Lebensdauer und Rotationskorrelationszeit bei einer *steady-state* (engl.; stationär) Messung aufgezeigt.

$$r = \frac{r_f}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \quad (\text{Gl. 2-17})$$

Ist die Rotationsdiffusion sehr schnell gegenüber der Fluoreszenzlebensdauer ($\tau \gg \rho$), so ist die Fluoreszenz der Probe vollständig depolarisiert ($r \approx 0$); es handelt sich dann um eine isotrope Verteilung.

Energietransferprozesse führen über eine PhotoSelektion ebenfalls zu einer Depolarisation der Fluoreszenz. Ihre Größe kann etwas über das Ausmaß der Transfereffizienz aussagen (Karolin *et al.* 1998); da dies keine Anwendung in dieser Arbeit findet, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

2.2.3.1 Das wobbling-in-a-cone Modell

Das *wobbling-in-a-cone* (engl., Taumelbewegung in einem Kegel) Modell beschreibt die eingeschränkte Bewegung des Fluorophors als eine Diffusion in einem Kegel mit dem Öffnungswinkel θ_{Kegel} (Kinosita, Jr. *et al.* 1977). Eine graphische Darstellung des Modells findet sich in der folgenden Abbildung 2-2.

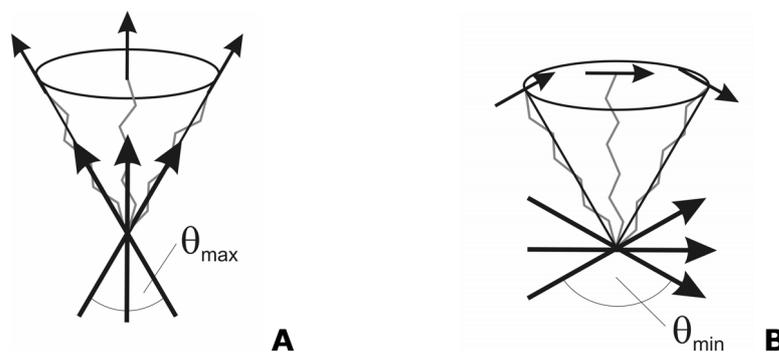


Abbildung 2-2: Graphische Darstellung des wobbling-in-a-cone-Modells Dem Modell liegt eine Taumelbewegung des an einen Linker gebundenen Fluorophors in einem Kegel zugrunde. Die resultierende Orientierungsverteilung der Übergangsdipolmomente unterscheidet sich für parallel (A) und senkrecht (B) zum Linker orientierte Momente. Im ersten Fall wird ein maximaler (θ_{max}), im zweiten ein minimaler Öffnungswinkel (θ_{min}) der Orientierung definiert.

Die Spitze des Kegels ist der Verankerungspunkt des Fluorophors an das Makromolekül über einen starren Linker, und die Bewegung geschieht somit auf der

Kugelfläche des Kegels. Der Fluorophor kann gleichzeitig um die Achse des Linkers frei rotieren. Die Taumelbewegung resultiert in einer Orientierungsverteilung des Übergangsdipolmomentes. Für Fluorophore mit parallel zum Linker orientierten Dipolmomenten liegt diese Verteilung innerhalb des Öffnungswinkels des Kegels $\theta_{max} = \theta_{Kegel}$. Ist das Übergangsdipolmoment senkrecht zum Linker orientiert, nimmt das Moment Orientierungen außerhalb eines Kegels ein, dessen Winkel sich nach $\theta_{min} = 180^\circ - \theta_{Kegel}$ berechnet.

Im Experiment läßt das biexponentielle Abklingverhalten der Anisotropie eines an ein Makromolekül befestigten Fluorophors auf eine eingeschränkte Bewegung des Fluorophors schließen. Das *wobbling-in-a-cone* Modell zieht die residuale Anisotropie r_∞ dazu heran, den Öffnungswinkel des Kegels, in welchem sich das Übergangsdipolmoment des Fluorophors bewegt, zu berechnen. Auch die mathematische Beschreibung unterscheidet zwischen den beiden grenzwertigen Winkeln, die das Übergangsdipolmoment relativ zum starren Linker besitzen kann. Liegt jenes parallel zur Symmetrieachse, also senkrecht zur Kugelfläche, gilt für den maximalen Öffnungswinkel des Kegels θ_{max}

$$\theta_{max} = \arccos \left[\frac{1}{2} \left(\sqrt{1 + 8 \sqrt{\frac{r_\infty}{r_f}}} - 1 \right) \right] \quad (\text{Gl. 2-18}).$$

Steht das Übergangsdipolmoment allerdings senkrecht zum Linker und damit parallel zu der Kugelfläche, kann der Farbstoff nur Orientierungen einnehmen, die außerhalb des Kegels liegen. In diesem Fall wird der minimale Öffnungswinkel bestimmt, der sich nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\theta_{min} = \arccos \sqrt{1 - 2 \sqrt{\frac{r_\infty}{r_f}}} \quad (\text{Gl. 2-19})$$

Für Rhodamin-Farbstoffe, die über Linker an Moleküle angebunden sind, gilt in guter Näherung der zuletzt genannte Fall. Cy5 wiederum besitzt ein annähernd parallel zum Linker ausgerichtetes Übergangsdipolmoment.

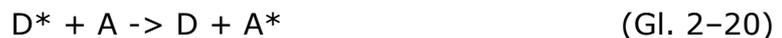
2.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der strahlungslose intermolekulare Dipol-Dipol-Energietransfer nach Förster ist bereits 1948 theoretisch abgeleitet worden (Förster 1948). Die experimentelle Quantifizierung dieses Phänomens lieferten erstmals Stryer und Haugland 1967 (Stryer & Haugland 1967), indem sie FRET (*fluorescence* oder

Förster resonance energy transfer) als spektroskopisches Lineal (engl.: *spectroscopic ruler*) einführten. Dabei präsentierten sie erstmals die Möglichkeit der Strukturbestimmung durch das Ankoppeln von Farbstoffen an interagierende biologische Moleküle. Im folgenden werden die Theorie von FRET und die Voraussetzungen für eine quantitative Abstandsbestimmung erörtert.

2.3.1 Grundlagen

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer ist ein bimolekularer Prozeß, bei dem Energie von einem elektronisch angeregten Donormolekül D^* auf ein sich im Grundzustand befindendes Akzeptormolekül A strahlungslos durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung übertragen wird. Der Donor kehrt dabei in den Grundzustand zurück, während der Akzeptor angeregt wird.



Der Energieübertrag geschieht dabei im allgemeinen zwischen den Singulett-Zuständen und wird aus diesem Grunde auch als Singulett-Singulett Transfer bezeichnet. Er ist in dem folgenden Jabłoński-Diagramm schematisch dargestellt.

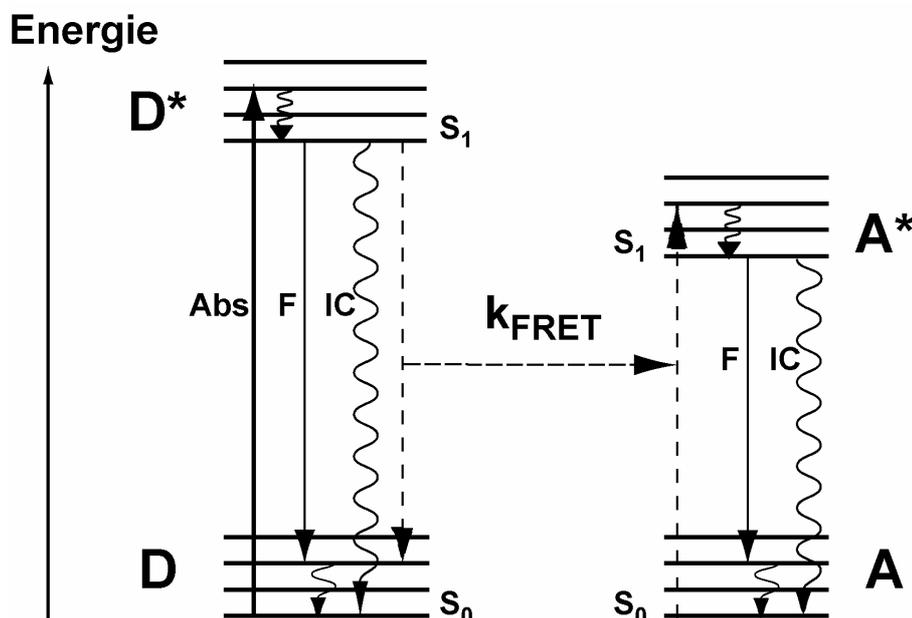


Abbildung 2-3: Jabłoński-Diagramm für den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) Schematische Darstellung des Singulett-Singulett-Transfers vom angeregten Donor D^* zum Akzeptor A . S_0 : Singulettgrundzustand, S_1 : erster angeregter Singulettzustand; höhere mögliche Zustände und Triplettzustand sind nicht aufgezeigt. Zu den möglichen Übergängen neben FRET (k_{FRET}) gehören: **Abs**: Absorption; **IC**: *Internal conversion*; **F**: Fluoreszenz. Die durch gerade Pfeile dargestellten Übergänge sind an elektromagnetische Strahlung gekoppelt, die wellenartigen repräsentieren strahlungslose Übergänge.

Der Donor wird mittels elektromagnetischer Strahlung angeregt und kann neben den in Abbildung 2-1 dargestellten Prozessen die Energie an einen geeigneten Akzeptor mit der Transferrate k_{FRET} übertragen. Dabei müssen die Energiebeträge der Donordeaktivierung und der Akzeptoranregung übereinstimmen. Dies ist der Fall, wenn das Fluoreszenzspektrum vom Donor und das Absorptionsspektrum vom Akzeptor überlappen (Überlappungsintegral > 0 , Gl. 2-27). Zusätzlich müssen die jeweiligen Übergangsdipolmomente günstig zueinander stehen. Der Akzeptor wiederum kann – vorausgesetzt, es handelt sich ebenfalls um einen Fluorophor – die Energie in Form von Fluoreszenz abgeben, welche aufgrund der vielen Zwischenschritte und der jeweiligen Energieverluste durch interne Konversion deutlich bathochrom verschoben ist. Die für den Transfer verantwortliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung besitzt eine Reichweite von etwa 10 bis 100 Å.

2.3.2 Quantifizierung der FRET-Effizienz

Bei einem gegebenen Fluorophorpaar ist der Energietransfer stark von Abstand und Orientierung abhängig. Schwankungen im Übertrag können entsprechend Rückschlüsse auf Veränderungen im Abstand liefern. Eine Quantifizierung des Energietransfers ist deshalb von hohem Interesse. Dabei liefern klassische wie quantenmechanische Betrachtungen ähnliche Ergebnisse (Cantor & Schimmel 1980). Neuere Ausführungen zur FRET-Theorie liefern R.M. Clegg (Clegg 1992) und B.W. van der Meer (van der Meer *et al.* 1994).

Die Transfereffizienz E_T läßt sich analog der Quantenausbeute durch die Transferrate k_{FRET} und die weiteren Deaktivierungsraten des Donors definiert:

$$E_T = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_F + k_{IC} + k_{ISC} (+ k_Q [Q])} = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + \tau_D^{-1}} = k_{FRET} \tau_{D(A)} \quad (\text{Gl. 2-21})$$

Dabei ist τ_D entsprechend τ_0 aus Gl. 2-7 die Lebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit eines FRET-Übertrages und $\tau_{D(A)}$ in Anwesenheit jenes.

Über Umformung der obigen Gleichung gelangt man schließlich zur Grundgleichung, auf der das erste Meßprinzip von FRET beruht: die Abhängigkeit der Donorfluoreszenzlebensdauer von der FRET-Effizienz.

$$\tau_{D(A)} = \tau_D (1 - E_T) \quad (\text{Gl. 2-22})$$

Da es sich bei FRET um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung handelt, hängt die Transferrate mit der sechsten Potenz vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor R_{DA} ab.

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad (\text{Gl. 2-23})$$

R_0 ist dabei der Försterradius; dieser bezeichnet jenen Abstand, bei welchem der Energietransfer zu 50% relativ zu allen Prozessen stattfindet. In anderen Worten bedeutet dies, daß bei diesem Abstand die Rate des Energietransfers gleich der Zerfallsrate des angeregten Zustandes vom Donor-Fluorophor in Abwesenheit des Akzeptors ist ($k_{FRET} = k_0$). Es ist eine Fluorophorpaar-spezifische Größe. Setzt man Gl. 2-23 in Gl. 2-21 erhält man schließlich den Ausdruck der Energietransfereffizienz in Abhängigkeit des Interfluorophorabstandes

$$E_T = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6}. \quad (\text{Gl. 2-24}).$$

Graphisch dargestellt ergibt Gl. 2-24 eine sigmoide Kurve.

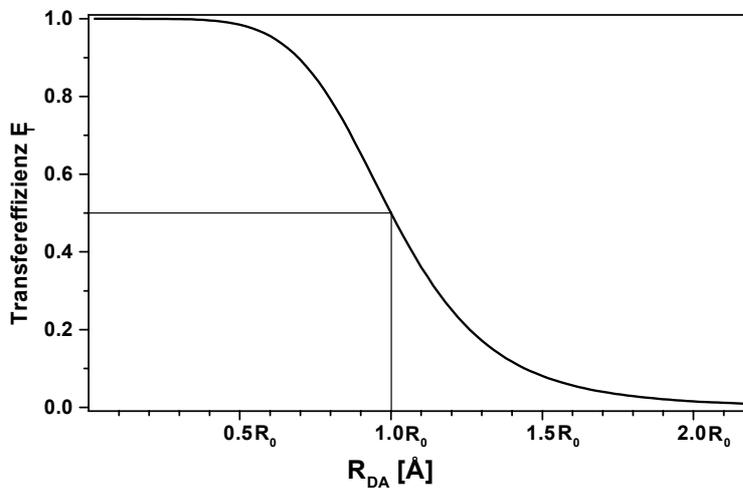


Abbildung 2-4: Försterkurve Abhängigkeit der Energietransfereffizienz E_T vom Abstand R_{DA} , dargestellt in Einheiten vom Försterradius R_0 .

Wie man der Abbildung 2-4 entnehmen kann, ändert sich die Transfereffizienz am empfindlichsten mit dem Interfluorophorabstand im Bereich von $0,5-1,5 \cdot R_0$.

2.3.2.1 Der Försterradius R_0

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 erwähnt, ist die Transfereffizienz neben dem Abstand noch von anderen Parametern abhängig. Diese werden formal im Försterradius zusammengefaßt. Es handelt sich dabei um die Quantenausbeute des Donors Φ_{FD} , welche determiniert, wie viele der angeregten Moleküle für einen Transfer zur Verfügung stehen; den Orientierungsfaktor κ^2 (Näheres siehe Kapitel 2.3.2.2), welcher die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente in Betracht zieht, sowie das Überlappungsintegral $J(\lambda)$, das die spektralen Eigenschaften der beiden Fluorophore aufzeigt. Ferner ist der Übertrag vom Brechungsindex des Mediums zwischen den Fluorophoren abhängig, welcher für wäßrige Lösungen 1,33 beträgt.

$$R_0^6 = \Phi_{FD} \kappa^2 \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda) \quad [\text{\AA}^6] \quad (\text{Gl. 2-25})$$

Mit den zusammengefaßten Konstanten (π und der Avogadro-Zahl N) ergibt sich vereinfacht

$$R_0 = 9780(J(\lambda)\kappa^2\Phi_{FD}n^{-4})^{1/6} \quad [\text{\AA}] \quad (\text{Gl. 2-26}).$$

Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ ist das normierte Flächenprodukt aus Donor-Fluoreszenzspektrum $F_D(\lambda)$ und Akzeptor-Absorptionsspektrum $\varepsilon_A(\lambda)$ nach der Wellenlänge λ und gibt somit den Grad der spektralen Überlappung wieder.

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (\text{Gl. 2-27})$$

Aus Gl. 2-23 und Gl. 2-25 ergibt sich der folgende Zusammenhang für die Transferrate k_{FRET} :

$$k_{FRET}(R_{DA}) = \frac{\Phi_{FD} \kappa^2}{\tau_D R_{DA}^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda) \quad (\text{Gl. 2-28})$$

Die größte Unsicherheit stellt dabei κ^2 dar. Nicht ganz unproblematisch ist auch die Wahl des Brechungsindex, da in manchen Fällen das betrachtete Molekül als Medium fungiert.

 2.3.2.2 Der Orientierungsfaktor κ^2

Die Übergangsdipolmomente der Fluorophore produzieren elektromagnetische Felder, deren Feldlinien für einen Energieübertrag parallele Kompo-

nenten besitzen müssen. Der Orientierungsfaktor κ^2 setzt sich entsprechend aus den Winkeln zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donor-Fluoreszenz μ_D und Akzeptor-Absorption μ_A zusammen.

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (\text{Gl. 2-29})$$

Eine Veranschaulichung zur Bedeutung der Winkel ist in Abbildung 2-5 zu sehen. θ_D und θ_A sind jeweils die Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment von Donor-Fluoreszenz μ_D bzw. Akzeptor-Absorption μ_A und dem Abstandsvektor R_{DA} von Donor und Akzeptor. θ_T stellt den Winkel zwischen den beiden Dipolen dar, und ϕ den Azimuth letzterer, d.h. den Winkel zwischen den Projektionen der Dipole auf eine Fläche senkrecht zum Abstandsvektor.

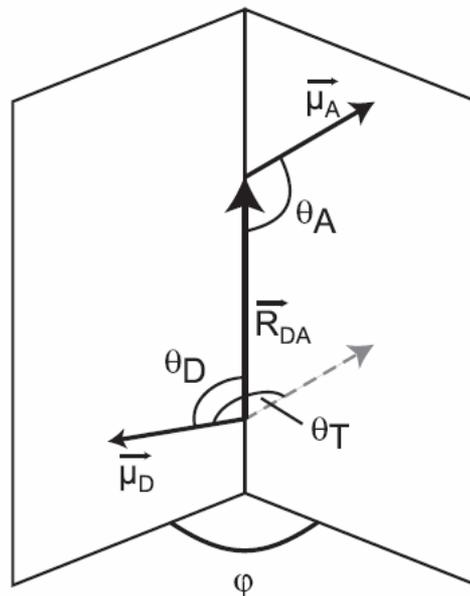


Abbildung 2-5: Winkel zur Bestimmung des Orientierungsfaktors Es sind die Winkel θ_D , θ_A , θ_T und ϕ zwischen den Übergangsdipolmomenten der Donor-Fluoreszenz μ_D und der Akzeptor-Absorption μ_A sowie dem Abstandsvektor R_{DA} dargestellt.

Nach Gl. 2-29 kann κ^2 Werte zwischen null und vier annehmen. Der Maximalwert von vier kann durch eine kollineare Orientierung der beiden Übergangsdipolmomente relativ zueinander erreicht werden, eine parallele Orientierung liefert einen Wert von eins. Der minimale Wert Null kann auf vielfache Weise entstehen, so z.B. durch eine senkrechte Positionierung.

Bei der Markierung von Molekülen mit extrinsischen Fluorophoren besitzen letztere bei ausreichend langen Linkern eine hohe Bewegungsfreiheit. Ist die Orientierung von Donor und/oder Akzeptor isotrop verteilt, d.h. können die Moleküle innerhalb ihrer Lebensdauer alle Orientierungen durchprobieren, so

ergibt sich ein durchschnittlicher Orientierungsfaktor von $2/3$. Dies folgt aus der Integralbildung der in Gl. 2-30 aufgestellten Wahrscheinlichkeitsverteilung für alle Werte von κ^2 bei einer dynamischen Mittelung (van der Meer 2002).

$$p(\kappa^2) = \begin{cases} \frac{1}{2\sqrt{3}\kappa^2} \ln(2 + \sqrt{3}) & 0 \leq \kappa^2 \leq 1 \\ \frac{1}{2\sqrt{3}\kappa^2} \ln\left(\frac{2 + \sqrt{3}}{\sqrt{\kappa^2} + \sqrt{\kappa^2 - 1}}\right) & 1 \leq \kappa^2 \leq 4 \end{cases} \quad (\text{Gl. 2-30})$$

Eine graphische Darstellung der Verteilung der κ^2 -Werte in einem solchen Fall ist in Abbildung 2-6 aufgezeigt.

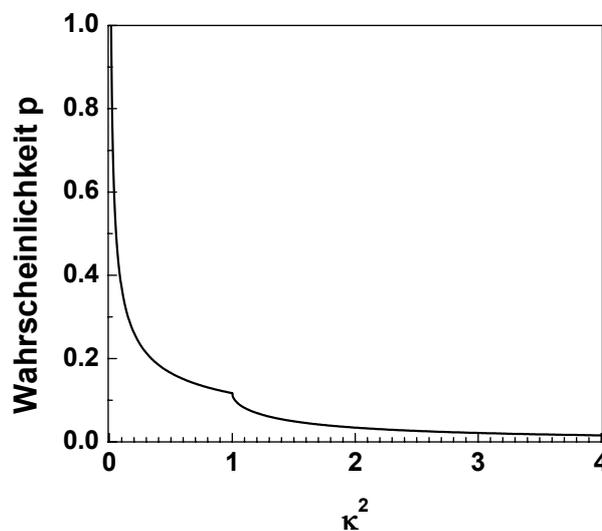


Abbildung 2-6: Verteilung von κ^2 bei einer dynamischen Mittelung Die Berechnung erfolgt nach Gl. 2-30.

Die Berechnung von κ^2 wird um einiges komplexer, wenn die Rotationskorrelationszeit der Fluorophore im Bereich der Fluoreszenzlebensdauer liegt. In diesem Regime ist κ^2 abhängig vom Abstand R_{DA} bzw. der Energietransfereffizienz (Dale & Eisinger 1974), was einer exakten Abstandsbestimmung hinderlich ist. Eine ausführliche Betrachtung des Problems findet sich in (Dale & Eisinger 1974) und (Haas *et al.* 1978).

Eine Fehlerabschätzung für den Orientierungsfaktor von $2/3$ kann über die Betrachtung des zeitaufgelösten Anisotropiezerfalls (siehe Kapitel 2.2.3) geschehen. Relaxiert die Anisotropie durch die lokale Bewegung des Fluorophors nicht vollständig, sondern existiert noch eine residuale Anisotropie r_∞ , deutet dies auf eine eingeschränkte Beweglichkeit des Fluorophors hin und damit auf eine Abwei-

chung von κ^2 von 2/3. In diesem Fall läßt sich ein minimaler und ein maximaler Wert für κ^2 berechnen (Lakowicz 1999). Für die beiden Grenzwerte gilt:

$$\kappa_{\min}^2 = \frac{2}{3} \left(1 - \frac{d_D + d_A}{2} \right) \quad (\text{Gl. 2-31})$$

$$\kappa_{\max}^2 = \frac{2}{3} (1 + d_D + d_A + 3d_D d_A) \quad (\text{Gl. 2-32})$$

wobei d_i (mit $i = D$ oder A) den Depolarisationsfaktor der fundamentalen Anisotropie von Donor bzw. Akzeptor aufgrund der lokalen Bewegung darstellt und sich nach

$$d_i = \left(\frac{r_{\infty,i}}{r_{0,i}} \right)^{1/2} \quad (\text{Gl. 2-33})$$

berechnen läßt. Alternativ kann die Kalkulation bei Kenntnis der Orientierungsverteilung der Übergangsdipolmomente auch über die Winkel zwischen den Dipolen θ_i vorgenommen werden:

$$d_i = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta_i - 1}{2} \right\rangle \quad (\text{Gl. 2-34})$$

2.3.2.3 Eigenschaften der Donor- und Akzeptorfarbstoffe

Neben den photochemischen und photophysikalischen Aspekten wie hohe Photostabilität und Fluoreszenzquantenausbeute, auf die bereits in den vorangehenden Kapiteln eingegangen wurde, sind noch weitere Punkte bei der Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen zu bedenken. In den meisten Fällen ist ein größtmöglicher Försterradius R_0 erwünscht, was durch ein großes Überlappungsintegral gewährleistet wird. Limitierend wirkt dabei die bestmögliche spektrale Separation von Donor- und Akzeptorfluoreszenz, weswegen meist ein Kompromiß zwischen Überlappungsintegral und dem sogenannten *Crosstalk* (Übersprechen von Donorfluoreszenz in Akzeptordetektionskanäle) gefunden werden muß. Hilfreich ist hierbei ein hoher Extinktionskoeffizient des Akzeptors, wie es z.B. der Farbstoff Cyanin5 bietet.

Ein weiterer Aspekt ist die chemische Beschaffenheit der Fluorophore. Zum einen sollte darauf geachtet werden, daß die Nettoladung des Fluorophors und die des zu markierenden Moleküls bzw. der Moleküldomäne gleich gerichtet ist. Die damit erreichte Coulomb-Abstoßung verhindert unerwünschte Interaktionen und ermöglicht bei einem ausreichend langen Linker eine hohe Bewegungsfrei-

heit. Dabei wird eine hohe Wasserlöslichkeit vorausgesetzt. Zum anderen sollte die Kopplung des Fluorophors an das Molekül in einer spezifischen Reaktion stattfinden, wofür das Zielmolekül meist modifiziert werden muß. Im Falle von Nukleotiden sind das meist Modifizierungen mit Amnioallylgruppen, die mit dem NHS-Ester des Fluorophors reagieren. Zum Markieren von Proteinen wird für gewöhnlich eine *single*-Cystein Mutante erstellt, welche über die Sulfhydrylgruppe dann mit einem Maleiminid-Derivat des Fluorophors eine Verbindung eingehen kann. Weitere Reaktivität sowie andere Formen des Energietransfers neben FRET (zum Molekül oder Akzeptorfluorophor) sollten natürlich ausgeschlossen sein.

2.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Methode, die eine örtlich wie auch zeitlich hochaufgelöste Untersuchung von niedrigkonzentrierten Molekülen erlaubt. Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenztechniken basiert sie jedoch nicht auf der durchschnittlichen Gesamtintensität der fluoreszierenden Moleküle, sondern auf den Abweichungen vom zeitlichen Mittelwert. Die charakteristische Zeitdauer der Fluktuationen um den Mittelwert kann mittels einer Autokorrelation des Intensitätssignals isoliert werden. Mittels FCS läßt sich damit die Kinetik beliebiger Vorgänge untersuchen, solange diese mit einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften der Moleküle einher gehen.

Die erste Anwendung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wurde bereits 1972 von Magde, Elson und Webb vorgestellt (Magde *et al.* 1972). Dabei ist die Interkalation von Medikamenten in DNA aufgezeigt worden. Der Durchbruch auf dem Gebiet kam jedoch erst mit der apparativen Entwicklung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in den 90er Jahren (Eigen & Rigler 1994; Rigler 1995; Rigler & Widengren 1990). Zum einen führt das hier eingesetzte kleine Beobachtungsvolumen zu einem hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, zum anderen ist die geringe Anzahl an gleichzeitig beobachteten Molekülen von Vorteil, da sie höhere relative Fluktuationen liefert. Dieses scheinbare Rauschen im gemessenen Signal kann in seiner Stärke und Dauer mittels einer zeitlichen Autokorrelation quantifiziert werden. Die Autokorrelations-Analyse isoliert ähnliche Komponenten von Zeitsignalen heraus und gibt damit Aufschluß über die charakteristische Dauer molekularer Dynamiken.

Bei einer konstanten Anregungsleistung ist die Fluktuation $\delta N(t)$ als Abweichung des Fluoreszenzsignals $N(t)$ vom zeitlichen Mittelwert $\langle N \rangle$ in der Meßdauer T definiert.

$$\delta N(t) = \langle N \rangle - N(t) \quad (\text{Gl. 2-35})$$

mit
$$\langle N \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T N(t) dt \quad (\text{Gl. 2-36})$$

Die Fluktuation wird in der Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ analysiert, die in der folgenden Gleichung definiert ist.

$$G(t_c) = \frac{\langle N(t) N(t+t_c) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N(t) \delta N(t+t_c) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (\text{Gl. 2-37})$$

Dabei gibt t_c die Korrelationszeit wieder.

Die Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ spiegelt das normierte Überlappungsintegral der Zeitspur mit sich selbst bei einer Verschiebung um t_c wider. Dabei entstehen zwei Arten von Termen, die entweder zu einem Anstieg in der Korrelationsfunktion führen, der Antibunchingterm (engl. *bunch*: Bündel), oder zu einem entsprechenden Abfall, der als Bunchingterm bezeichnet wird. Eine Korrelationskurve mit den charakteristischen Termen ist in Abbildung 2-7 dargestellt.

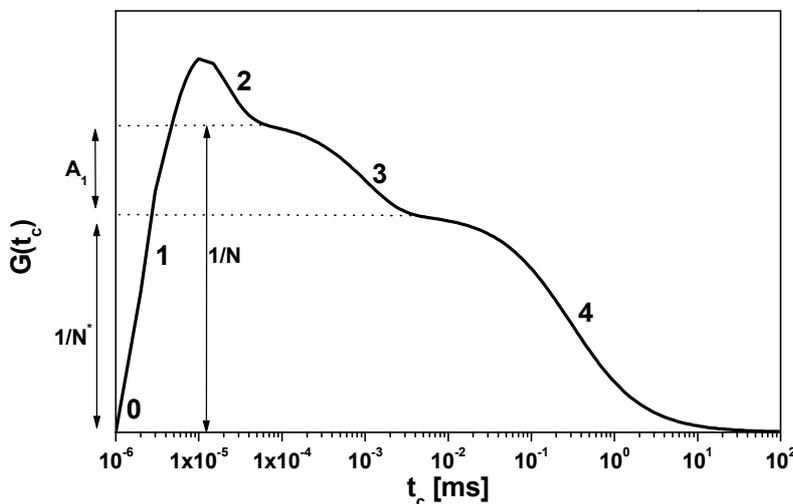


Abbildung 2-7: Schematischer Verlauf einer Autokorrelationskurve Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ zu den Korrelationszeiten t_c . **0**: Emission eines Photons, **1**: Antibunching, **2**: Rotationsdiffusion, **3**: Triplettkinetik, **4**: Translativ Diffusion. Dabei entspricht N^* der Gesamtanzahl an Fluorophoren im Beobachtungsvolumen, N der Anzahl der fluoreszierenden Moleküle, und A_1 dem Anteil der sich im Tripletts befindenden Moleküle.

Dabei sind die folgenden Prozesse zu erkennen:

0: Emission eines Photons zum Zeitpunkt $t_c=0$.

1: Antibunching. Die Zeitdauer des Anstiegs (Wendepunkt bzw. Erreichen der halben Amplitude) ist charakteristisch für die Zyklusdauer von der Emission eines Photons aus dem S_1 -Zustand heraus bis zur abermaligen Anregung. Sie stellt somit die Totzeit eines einzelnen Fluorophors zwischen zwei Photonemissionen dar und basiert auf rein quantenmechanischen Effekten. Während die Wahrscheinlichkeit, direkt nach der Aussendung eines Photons ein zweites Photon auszusenden, gleich Null ist, steigt sie mit der Zeit an und erreicht schließlich ein Plateau. Der Verlauf fällt aber aufgrund der nun folgenden Bunchingterme schnell wieder ab.

Der Antibunchingterm läßt sich aufgrund der Totzeit von Detektoren bei einer klassischen Autokorrelation nicht auflösen; das Problem wird meist damit umgangen, daß das Signal auf zwei Detektoren aufgespaltet und eine sogenannte Kreuzkorrelation der Signale gebildet wird.

Die nun aufgeführten Abfälle in der Korrelationskurve sind auf ein Sinken der Wahrscheinlichkeit, ein emittiertes Photon zu beobachten, zurückzuführen. Es handelt sich dabei um miteinander korrelierte Prozesse, deren Kinetik eine definierte Zeitdauer besitzen, welche sich wiederum in der Abfallzeit widerspiegeln. Es handelt sich dabei um chemische/photochemische Reaktionen, Dynamiken wie auch unterschiedliche Arten der Diffusion.

2: Rotationsdiffusion. Bei der Anregung mit polarisiertem Licht bzw. der Detektion von nur einer Polarisationsrichtung kann in einer Korrelationskurve die Rotationsdiffusion eines Fluorophors beobachtet werden. Die Rotation des angeregten Moleküls führt zur Drehung des Emissionsübergangsdipolmoments und damit zu einer sinkenden Wahrscheinlichkeit, Fluoreszenz mit derselben Polarisation zu detektieren. Mit anderen Worten ändert sich die Anisotropie der Lösung mit der Zeitdauer der Rotationskorrelation; bei kleinen Molekülen liegt jene im ns-Bereich.

3: Triplett-Kinetik. Ein bei hohen Anregungsleistungen dominanter Term ist jener der Triplett-Kinetik. Die Triplett-Zeit t_T charakterisiert die Dauer, die ein Molekül im Mittel benötigt, um in den dunkeln Triplett-Zustand zu gelangen. Die Amplitude dieses Terms A_1 stellt den Anteil der Moleküle dar, die sich bei den entsprechenden Bedingungen im Triplettzustand befinden. Die Abhängigkeit

dieser Größe von den im Jablonski-Schema eingeführten Raten wird im Kapitel 2.4.2.1 erörtert.

Der Cyanin-Farbstoff Cy5 zeigt eine weitere hell-dunkel Kinetik im μs -Bereich auf. Dabei handelt es sich um die Isomerisierung des angeregten Fluorophors vom fluoreszenten trans-Isomer zum nicht-fluoreszenten cis-Isomer. Auch diese Reaktion ist von der Anregungsleistung abhängig.

4: Translative Diffusion. Bei Messungen in Lösung ist die Leuchtdauer eines einzelnen Fluorophors mit seiner Aufenthaltsdauer im Fokus des Lasers korreliert. Diese wird durch die Diffusionszeit t_D durch das Detektionsvolumen bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit, ein weiteres Photon zu detektieren, sinkt beim Überschreiten der charakteristischen Diffusionszeit schließlich auf Null ab, die Korrelationskurve fällt auf ihren minimalen Wert ab. Die Diffusionszeit ist auch der maximale Zeitbereich, in dem Kinetiken anhand der FCS untersucht werden können.

2.4.1 Kreuzkorrelation

Wie bereits erwähnt begrenzt die Totzeit der Detektoren den in der FCS beobachtbaren zeitlichen Bereich. Um dieses Problem zu umgehen, wird das Fluoreszenzsignal auf zwei Detektoren aufgeteilt, um schließlich eine Kreuzkorrelation der Zeitspuren vorzunehmen (Schwille *et al.* 1997).

$$G_{AB}(t_c) = \frac{\langle N^A(t) N^B(t+t_c) \rangle}{\langle N^A(t) \rangle \langle N^B(t) \rangle} = 1 + \frac{\langle \delta N^A(t) \delta N^B(t+t_c) \rangle}{\langle N^A(t) \rangle \langle N^B(t) \rangle} \quad (\text{Gl. 2-38})$$

Diese Form der Analyse ermöglicht zudem die Betrachtung der Korrelation von sich im Spektrum oder Polarisationsrichtung unterscheidenden Signalen. So können Kinetiken, welche die Anisotropie beeinflussen, durch eine Aufspaltung des Signals in eine parallele und senkrechte Polarisationskomponente relativ zur Anregungspolarisation untersucht werden. Eine interessante Variante bei Verwendung von zwei Fluorophoren in einer FRET-Messung ist die Korrelation des Donorsignals mit dem Akzeptorsignal. Dabei können Kinetiken untersucht werden, die mit einer Änderung des Interfluorophorabstandes verbunden sind (Eggeling *et al.* 2005; Margittai *et al.* 2003).

An dieser Stelle soll noch mal kurz darauf eingegangen werden, wie sich unterschiedliche Prozesse auf die Kreuzkorrelationskurve eines FRET-Paars auswirken. Eine Veränderung des Abstandes hat eine Verstärkung des einen Signals

zur Folge, während das andere schwächer wird. Das Verhalten der Signale ist somit antikorreliert, was zu einem Anstieg der Kurve führt. Eine Verstärkung oder Löschung beider Signale gleichzeitig wiederum entspricht einer Korrelation der Signale und bewirkt folglich einen charakteristischen Abfall in der Kurve.

2.4.2 Modellfunktionen für Korrelationskurven

Entsprechend ihrem physikalischen bzw. chemischen Hintergrund können die den Bunching- bzw. Antibunchingtermen unterliegenden Prozesse mit adäquaten Modellfunktionen angepaßt werden. Zur Herleitung solcher Modelle sei hier auf Arbeiten von C. Eggeling und J. Widengren verwiesen (Eggeling *et al.* 1998; Eggeling 1999; Widengren 1996). Im weiteren soll nur auf die Ergebnisse eingegangen werden.

Der einfachste Fall ist die Beeinflussung des Fluoreszenzsignals durch die translative Diffusion, welcher alle Moleküle gleichsam unterliegen. Die Fluktuationen der Signalintensitäten basieren dabei auf zwei Effekten: zum einen auf der Intensitätsdichteverteilung der Lichtquelle im Anregungsvolumen, die mit einem dreidimensionalen Gauß'schen Detektionsprofil approximiert wird, und zum anderen auf der Fluktuation der Molekülkonzentration, die dem Fick'schen Gesetz folgt. Das Detektionsvolumen wird durch seine Ausdehnung in axialer (z-Achse) Richtung durch z_0 und in radialer (x-y-Ebene) Richtung durch ω_0 beschrieben. Die Anregungsintensität fällt dabei in allen Richtungen exponentiell ab, so daß die folgende räumliche Intensitätsverteilung resultiert (welche im übrigen auch für die Detektionseffizienz gilt):

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(\frac{-2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2}\right) \exp\left(\frac{-2z^2}{z_0^2}\right) \quad (\text{Gl. 2-39})$$

Die mittlere Anregungsleistungsdichte I_0 [kW cm⁻²] ergibt sich aus der Leistung am Objektiv P und dem Parameter ω_0 .

$$I_0 = \frac{2P}{\pi\omega_0^2} \quad (\text{Gl. 2-40})$$

Aus der Transformation der Aufenthalts- und Detektionswahrscheinlichkeit an jedem Ort zu der entsprechenden Korrelationszeit folgt das Modell für die FCS einer rein translativen Diffusion:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_D} \right)^{1/2} \quad (\text{Gl. 2-41})$$

Dabei beträgt die charakteristische Diffusionszeit $t_D = \omega_0^2 / 4D$ (Gl. 2-42), wobei D die Diffusionskonstante des beobachteten Moleküls ist. Für Rhodaminfarbstoffe liegt D in Ethanol bei $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Hansen *et al.* 1998). Mit Hilfe dieser Größe lassen sich die absoluten Ausmaße des Detektionsvolumens V_D berechnen, was aus Gl. 2-41 alleine nicht möglich ist, da sie nur das Verhältnis der zwei Ausrichtungen ω_0 und z_0 liefert.

$$V_D = \pi^{3/2} z_0 \omega_0^2 \quad (\text{Gl. 2-43})$$

Über die Gl. 2-41 läßt sich die Anzahl der fluoreszierenden Partikel im Beobachtungsvolumen N (in dem Fall der reinen Diffusion ist N ausnahmsweise auch N^*) bestimmen, was wiederum Rückschlüsse auf die Zählrate pro Molekül *cpm* (engl. *counts per molecule*) ermöglicht. Die *cpm* ist ein Justagegüteparameter, welcher vor jedem Meßtag mit einem Referenzfarbstoff (in den meisten Fällen Rhodamin 110) bestimmt wird.

Die meisten Fluorophore gehen schon bei geringfügig erhöhten Anregungsleistungen zu einem gewissen Anteil in den Triplett-Zustand über, was zu einem zusätzlichen Term in der FCS führt. Die Berücksichtigung dessen liefert die folgende Modellfunktion, die zu dem Diffusionsterm noch die charakteristische Triplettzeit t_T und den mittleren Anteil T_{1eq} der Fluorophore im Triplettzustand beinhaltet (nach (Widengren *et al.* 1995)).

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left[1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D} \right]^{-1/2} \left[1 - T_{1eq} + T_{1eq} \exp(-t_c/t_T) \right] \quad (\text{Gl. 2-44})$$

Die Amplitude der Kurve liefert hier die Anzahl der fluoreszenten Moleküle N , also der Moleküle, die sich in S_0 oder S_1 befinden. Die Gesamtanzahl an Fluorophoren in Lösung kann durch Hinzunahme von T_{1eq} bestimmt werden. Weitere Korrelations- oder Antikorrelationsphänomene können durch Anfügen von zusätzlichen Termen analog dem letzten in Gl. 2-44 berücksichtigt werden.

2.4.2.1 Mathematische Beschreibung des Triplett-Termes

Die Herleitung der den Triplett-Term beschreibenden Größen geschieht auch hier aus dem Jabłoński-Diagramm heraus. Die ausführliche Berechnung hierzu findet sich in (Widengren *et al.* 1994). An dieser Stelle sollen lediglich die Startbedingungen und die Lösung der Differenzialgleichung aufgeführt werden. Erstere sind in den folgenden Gleichungen 2-45 und 2-46 aufgestellt:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} -k_{Abs} & k_0 & k_T \\ k_{Abs} & -(k_0 + k_{ISC}) & 0 \\ 0 & k_{ISC} & -k_T \end{bmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 2-45})$$

und

$$\begin{pmatrix} S_0(0) \\ S_1(0) \\ T_1(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 2-46})$$

Dabei sind k_F und k_{IC} in k_0 zusammengefaßt.

Daraus folgt die zeitliche Entwicklung des Triplett-Termes:

$$T_1(t) = T_{1eq} - T_{1eq} \exp\left(-\frac{t}{t_T}\right) \quad (\text{Gl. 2-47})$$

T_{1eq} und t_T sind die Größen, die bereits in Gl. 2-44 für die Beschreibung des Triplett-Prozesses in der FCS dienen. Sie ergeben sich aus der Lösung des oben aufgeführten Gleichungssystems:

$$\frac{1}{t_T} = k_T + \frac{k_{Abs} k_{ISC}}{k_{Abs} + k_0} \quad (\text{Gl. 2-48a})$$

$$T_{1eq} = \frac{k_{ISC}}{k_T} S_{1eq} = \frac{k_{Abs} k_{ISC}}{k_{Abs} (k_{ISC} + k_T) + k_T k_0} \quad (\text{Gl. 2-48b})$$

$$S_{1eq} = \frac{k_{Abs} k_T}{k_{Abs} (k_{ISC} + k_T) + k_T k_0} \quad (\text{Gl. 2-48c})$$

Die charakteristische Triplett-Zeit t_T ist dabei die Dauer, die ein Molekül im Mittel benötigt, um in den Triplett-Zustand zu gelangen. S_{1eq} und T_{1eq} beschreiben den Anteil der sich in S_1 und T_1 befindenden Moleküle im Gleichgewicht.

Im Fall von FCS-Messungen bei gleichzeitigem Auftreten von FRET müssen die obigen Gleichungen insofern erweitert werden, als daß k_0 aus der Summe von k_F , k_{IC} und k_{FRET} besteht. Wie folglich leicht einzusehen ist, variiert der Triplett-Term in Dauer und Amplitude in Abhängigkeit von der FRET-Effizienz. Die Möglichkeit, den Triplett-Term für verschiedene FRET-Effizienzen bei Kenntnis des Triplett-Anteils für nur Donor-markierte Proben bestimmen zu können, wird im Laufe der Arbeit genutzt.

2.5 Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD)

Die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) basiert auf der simultanen Erfassung voneinander unabhängiger Fluoreszenzparameter. Dazu gehören die bereits beschriebenen Größen Fluoreszenzintensität, Lebensdauer, Anisotropie und spektrale Verteilung. Bei der Verwendung eines geeigneten Fluorophorpaars für FRET-Messungen erweist sich die FRET-Effizienz als ein zusätzlicher Parameter. Die Betrachtung weiterer, zeit- und intensitätsabhängiger Parameter (Burstdauer, Rotationskorrelationszeit...) kann zusätzliche Aufschlüsse über die betrachteten Moleküle liefern. Die Anwendung dieser Technik in ihrem vollen Ausmaß ist unter anderem in (Eggeling *et al.* 2001) und (Rothwell *et al.* 2003) beschrieben.

Während die MFD-Technik mit Erfolg im Ensemble angewandt wird, erreicht sie ihren Höhepunkt beim Einsatz auf Einzelmolekülebene. Dies geschieht in dieser Arbeit durch die Anwendung der Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime-Technik (BIFL, engl. signalspitzenintegrierte Fluoreszenzlebensdauer), welche die Detektion und detaillierte Analyse aller Fluoreszenzparameter von einzelnen Molekülen ermöglicht. Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen bieten den Vorteil, daß eine aufwendige Aufreinigung der Proben zum Erhalt einer einzigen Spezies in der Regel nicht nötig ist. Ferner können statische und dynamische Prozesse direkt voneinander unterschieden und die Meßdaten einzelner Spezies auf zusätzliche Details hin untersucht werden. Auch diese Technik basiert wie die FCS auf einem konfokalen Fluoreszenzmikroskopaufbau (Pawley 1995), welcher ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis liefert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer wird eine gepulste Lichtquelle eingesetzt.

2.5.1 Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime (BIFL)

Die BIFL-Technik basiert auf den Fluoreszenzsignalen einzeln detektierter Moleküle. Hierzu verdünnt man die Lösung so stark, so daß sich im Mittel 1/10 Molekül im Beobachtungsvolumen befindet. Die Identifizierung der einzelnen Durchtritte geschieht über die signalspitzenorientierte Auswertung (engl. *burst-wise analysis*), bei welcher eine Häufung von detektierten Photonen aufgespürt wird. Alle Photonen eines Einzelmoleküldurchtrittes werden schließlich einer gemeinsamen Analyse unterworfen. So lassen sich verschiedene Spezies gemäß ihrer charakteristischen Fluoreszenzparameter identifizieren.

2.5.1.1 Bestimmung der Fluoreszenzparameter

Die MFD basiert auf der sequentiellen Zählung von einzelnen Photonen, welche für die folgenden Analysen herangezogen werden. Dabei wird das Signal einzeln für alle Moleküldurchtritte durch das Detektionsvolumen in jedem Spektralbereich analysiert.

Intensität

Die Intensität – auch als Zählrate bezeichnet – wird für jeden Spektralbereich aus der Anzahl der Photonen n und der Dauer $\Delta t(n)$ des Einzelmolekülereignisses berechnet. Für gewöhnlich wird für FRET-Messungen ein Fluorophorpaar benutzt, bei denen der Donor grün und der Akzeptor rot fluoresziert. Aus diesem Grunde werden im Hinblick auf spätere Ausführungen zu FRET die Indizes des Spektralbereiches G (grün) und R (rot) definiert. Somit gilt für die Signalintensität S_G im grünen Wellenlängenbereich

$$S_G = \frac{n_G - 1}{\Delta t(n_G)} \quad (\text{Gl. 2-49a})$$

und analog im roten $S_R = \frac{n_R - 1}{\Delta t(n_R)}$ (Gl. 2-49b).

Zum Erreichen einer möglichst hohen Zählrate müssen photochemische Prozesse wie Löschung und Triplettbesetzung sowie die optische Sättigung des Fluorophors minimiert werden. Hilfreich ist dabei die Benutzung von Antioxidantien wie Vitamin C oder Mercaptoethanol.

Fluoreszenzlebensdauer

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer geschieht im Rahmen der MFD über die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl. *time-correlated single photon counting*, TCSPC) (O'Connor & Phillips 1984; Wild *et al.* 1977). Dabei werden die registrierten Photonen ihrer Ankunftszeit nach (relativ zum Anregungspuls) in einem Häufigkeitshistogramm zusammengefaßt, dessen Meßfenster durch die Repetitionsrate des Lasers vorgegeben ist. Der zeitliche Abfall des Signals $S(t)$ wird über das Anpassen einer Exponentialfunktion, welche die Entvölkerung des angeregten Zustandes beschreibt, sowie der Berücksichtigung der Gerätefunktion $g(t)$ durch eine mathematische Faltung beschrieben.

$$S(t) = g(t) \otimes \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right) \quad (\text{Gl. 2-50})$$

Aufgrund der geringen Anzahl der Photonen in einem Einzelmolekülereignis kann nur ein monoexponentieller Zerfall angepaßt werden. Praktisch wird dies über eine *Maximum-Likelihood*-Anpassung realisiert. Dabei wird zudem ein variabler Anteil an Streulicht γ als auch die Wahrscheinlichkeit berücksichtigt, daß bei hohen Repetitionsraten der Fluorophor bereits durch einen vorhergehenden Puls angeregt wurde (Brand *et al.* 1997; Brand 1998; Kullback 1959; Zander *et al.* 1996).

Bei der Benutzung einer linear polarisierten Lichtquelle und der Separation des detektierten Signals in zwei Polarisationskomponenten – parallel S_p und senkrecht S_s zur Anregungspolarisation – müssen experimentelle Korrekturparameter zur Bereinigung des Signals eingeführt werden. Der sogenannte G-Faktor korrigiert die unterschiedlichen Detektionseffizienzen der beiden Polarisationsrichtungen, welche aus der polarisationsabhängigen Transmission der Filter und der Sensitivität der Detektoren resultieren. Ferner wird die Mischung der Polarisationskomponenten für Objektive mit einer großen numerischen Apertur und die Depolarisation des Anregungslichtes durch starke Brechung mit den Faktoren l_1 und l_2 jeweils für die senkrechte und die parallele Komponente berücksichtigt (Koshioka *et al.* 1995).

In der Praxis wird bei der Datenaufnahme die Zeitachse des Meßfensters in i Kanäle endlicher Breite aufgeteilt. Das Fluoreszenzsignal $S_{ges}(i)$ wird nun korrigiert, indem die Korrektur in jedem Kanal erfolgt und auf das Gesamtsignal normiert wird (Schaffer *et al.* 1999).

$$S_{ges}(i) = \frac{(1 - 3l_2) \cdot G \cdot S_p(i) + (2 - 3l_1) \cdot S_s(i)}{\sum_{i=1}^K (1 - 3l_2) \cdot G \cdot S_p(i) + (2 - 3l_1) \cdot S_s(i)} \quad (\text{Gl. 2-51})$$

Der G-Faktor wird durch die Datenaufnahme einer vollkommen isotropen Probe, wie sie standardmäßig kleine Fluorophore mit ihrer sehr kurzen Rotationskorrelationszeit ($\rho \ll \tau_0$) darstellen, bestimmt.

$$G = \frac{\sum_{i=K-100}^K S_s(i)}{\sum_{i=K-100}^K S_p(i)} \quad (\text{Gl. 2-52})$$

Die Herleitung der Korrekturen sowie die nachstehende detaillierte Beschreibung der Modellfunktion für den Fluoreszenzzerfall finden sich in (Schaffer 2000).

Anisotropie

Um die stationäre Anisotropie bestimmen zu können, muß die Anregung der Probe mittels einer linear polarisierten Lichtquelle erfolgen und zudem in zwei Polarisationsrichtungen – parallel S_p und senkrecht S_s zur Anregungspolarisation – detektiert werden. Die Signale werden analog dem Fluoreszenzzerfall für die Lebensdauerbestimmung korrigiert. Für die experimentelle Anisotropie r_E ergibt sich dann:

$$r_E = \frac{G \cdot S_p - S_s}{(1 - 3l_2) \cdot G \cdot S_p + (2 - 3l_1) \cdot S_s} \quad (\text{Gl. 2-53}).$$

Bei einem nicht zu vernachlässigenden Hintergrund ist die Streulichtkorrigierte Anisotropie r_s der zuverlässigere Wert. Diese berücksichtigt die hohe Polarisation des Laser- und Ramanstreulichtes, welches im Untergrund-Polarisations-Verhältnis χ ausgedrückt ist (Berger 2001). γ beschreibt dabei den Streulichanteil.

$$r_s = \frac{G \cdot S_p - S_s - \gamma(1 - \frac{3}{2} \chi) \cdot S_{ges}}{(1 - 3l_2) \cdot G \cdot S_p + (2 - 3l_1) \cdot S_s - \gamma(1 - 3l_2 - \frac{3}{2} \chi(l_1 - 2l_2)) \cdot S_{ges}} \quad (\text{Gl. 2-54a})$$

mit
$$\chi = \frac{2B_s}{G \cdot B_p + 2B_s} \quad \text{und} \quad S_{ges} = G \cdot S_p + 2S_s \quad (\text{Gl. 2-54b+c})$$

B_p bzw. B_s sind die Zählraten des parallelen bzw. senkrecht polarisierten Hintergrundes. Sie beinhalten trotz Filtereinsatz einen verbleibenden Anteil an Raman- und Rayleigh-Streuung sowie die Dunkelzählraten der Detektoren. Diese werden aus einer Messung des verwendeten Puffer bestimmt.

Mittels der Perrin-Gleichung (Gl. 2-17) kann die Rotationskorrelationszeit bestimmt werden, die wiederum eine Fehlerabschätzung bei der Abstandsbestimmung ermöglicht. Lediglich eine Rotationskorrelationszeit deutlich kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer rechtfertigt das Einsetzen von $2/3$ für κ^2 . Längere Rotationskorrelationszeiten erfordern eine genauere Betrachtung des Orientierungsfaktors.

FRET-Effizienz

Die Energietransfereffizienz E_T ist die aus fluoreszenzspektroskopischen FRET-Untersuchungen am direktesten bestimmbare Größe. Trotz des starken Vormarsches der Abstandsbestimmung mittels FRET wird in der Literatur immer noch häufig nur die FRET-Effizienz aufgeführt. Zu ihrer Determinierung können

verschiedenste Parameter und Methoden herangezogen werden (Clegg 1992; Dale & Eisinger 1975; Epe *et al.* 1983; Jares-Erijman & Jovin 1996). Am weitesten verbreitet ist dabei die Berechnung über die Intensitätsverhältnisse der Donor- und Akzeptorfluoreszenz F_D und F_A (Ha *et al.* 1999a), u.a. auch in Form des sogenannten *Proximity Ratios* (engl., Näheverhältnis) (Ying *et al.* 2001).

$$E_T = \left[1 + \frac{F_D}{F_A} \frac{\Phi_{FA}}{\Phi_{FD}} \right]^{-1} \quad (\text{Gl. 2-55a})$$

Die MFD bietet aufgrund ihrer simultan erfaßten unabhängigen Parameter zudem die Möglichkeit, E_T mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit und Anwesenheit des Akzeptors zu bestimmen.

$$E_T = 1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D} \quad (\text{Gl. 2-55b})$$

Dabei erfordert die Bestimmung über das Intensitätsverhältnis zudem Kenntnis über die Fluoreszenzquantenausbeuten des Donors Φ_{FD} und des Akzeptors Φ_{FA} . Des weiteren ist das Intensitätsverhältnis nicht direkt aus den detektierten Signalen herzuleiten. Letztere müssen zunächst bereinigt werden, um das absolute Fluoreszenzsignal von Donor und Akzeptor zu erhalten.

Aus diesem Grunde wird in der Praxis zwischen der experimentell bestimmten Zählrate S_G und S_R , dem Fluoreszenzsignal F_G und F_R sowie dem korrigierten Fluoreszenzsignal F_D und F_A unterschieden. Bei ersterem handelt es sich um das an den Detektoren auftreffende Signal. Das Fluoreszenzsignal wird dadurch erhalten, indem das Hintergrundsignal B abgezogen wird.

$$F_G = S_G - B_G \quad \text{bzw.} \quad F_R = S_R - B_R \quad (\text{Gl. 2-56a+b})$$

So wie der G-Faktor unterschiedliche Detektionseffizienzen der beiden Polarisationspfade berücksichtigt, muß dies nun auch für die beiden Spektralbereiche geschehen. Dafür werden die Detektionseffizienzen der beiden spektralen Pfade g_G und g_R herangezogen, die den Anteil des detektierten Signals nach dem Objektiv darstellen. Sie berücksichtigen die Transmission der optischen Elemente als auch die Detektionseffizienzen der Detektoren. Damit ergibt sich für das Fluoreszenzsignal des Donors:

$$F_D = \frac{S_G - B_G}{g_G} = \frac{F_G}{g_G} \quad (\text{Gl. 2-57})$$

Die Korrektur des Akzeptorsignals erweist sich als noch etwas komplexer, da zwei weitere Phänomene die Akzeptorfluoreszenz verfälschen können: Zum

einen handelt es sich dabei um den Anteil der direkten Anregung DE (engl.: *direct excitation*) des Akzeptors durch das Anregungslicht, welche bei der Betrachtung von fluoreszenzresonantem Energietransfer auf den Akzeptor unerwünscht ist. Dieser läßt sich experimentell durch eine Messung der Zählrate pro Molekül des alleinigen Akzeptorfluorophors über die FCS abschätzen.

Zum anderen ist der Anteil des spektrale *Crosstalks* (engl., Übersprechen) α zu berücksichtigen, welcher aus dem Übersprechen des Donorspektrums in die Akzeptorkanäle resultiert. Experimentell läßt er sich aus der Messung einer nur den Donorfluorophor enthaltenen Probe im FRET-Aufbau bestimmen.

$$\alpha = \frac{S_{R(Donor)} - B_R}{S_{G(Donor)} - B_G} \quad (\text{Gl. 2-58})$$

Unter Einbindung dieser Korrekturgrößen ergibt sich für die Akzeptorfluoreszenz

$$F_A = \frac{(S_R - (B_R + DE)) - \alpha(S_G - B_G)}{g_R} = \frac{F_R - DE - \alpha F_G}{g_R} \quad (\text{Gl. 2-59}).$$

Ist das Akzeptor-Fluoreszenzspektrum relativ zur Donor-Anregungswellenlänge weit genug bathochrom verschoben, so kann die direkte Anregung vernachlässigt werden. Dies ist bei dem in dieser Arbeit verwendeten Donor-Akzeptor-Paar Alexa488-Cy5 bei einer Direktanregung unter 2% der Fall (Berger 2001; Schweinberger 2002). Der *Crosstalk* wiederum läßt sich in der Regel nicht vermeiden, da die meisten Fluorophore eine stark verbreiterte langwellige Flanke besitzen. Damit läßt sich das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenz folgendermaßen berechnen:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{g_R F_G}{g_G F_R} = \frac{g_R}{g_G} \frac{S_G - B_G}{(S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)} \quad (\text{Gl. 2-60})$$

Allein die Betrachtung des Verhältnisses gibt guten Aufschluß über die FRET-Effizienz, da eine Änderung der Effizienz sich in Zähler und Nenner entgegengesetzt auswirkt und in der Quotientenbildung verstärkt wird. Bei der Analyse über die Fluoreszenzlebensdauer ändert sich hingegen nur ein Parameter.

In beiden Fällen läßt sich mit dem Försterradius nach Gl 2-24 aus der Energietransfereffizienz der Interfluorophorabstand berechnen. Die direkte Berechnung des Abstandes R_{DA} aus dem Intensitätsverhältnis bietet zudem eine elegante Lösung, aus welcher ersichtlich wird, daß der Abstand von der Donor-quantenausbeute unabhängig ist:

$$R_{DA} = R_{0r} \left[\frac{F_D}{F_A} \Phi_{FA} \right]^{1/6} \quad (\text{Gl. 2-61})$$

Bei R_{0r} handelt es sich dabei um den reduzierten Försterradius.

$$R_{0r} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\Phi_{FD}}} = 9780 (J(\lambda) \kappa^2 n^{-4})^{1/6} \text{ [\AA]} \quad (\text{Gl. 2-62})$$

Die gleichzeitige Bestimmung des Energietransfers bzw. des Abstandes über die Lebensdauer und die Intensität stellt zwei komplementäre Parameter gegenüber und vergrößert somit die Sicherheit der Analyse. Die Messung von Intensitäten gestaltet sich als recht einfach, und im Gegensatz zur Lebensdauer erfordert ihre Auswertung keine Fitroutine. Dies führt zu einer niedrigeren Standardabweichung in der Bestimmung von F_D/F_A relativ zur Lebensdauer (Brand 1998; Schaffer 2000). Des weiteren stellt die im Rahmen der BIFL-Technik angewandte monoexponentielle Anpassung der Lebensdauer eine Vereinfachung dar. Die begrenzte Anzahl an detektierten Photonen führt zu einer statistischen Ungenauigkeit in der Lebensdauerbestimmung. Die Gefahr von systematischen Fehlern ist hingegen gering, da keine zusätzlichen Korrekturfaktoren wie bei den Intensitäten benötigt werden. Diese Faktoren wie Detektionseffizienz, G-Faktor und Quantenausbeute werden meist selbst aus experimentellen Daten bezogen, so daß sie eine merkliche Unsicherheit bei der Bestimmung des Intensitätsverhältnisses einführen.

2.5.1.2 Speziesselktive Spektroskopie

In einer MFD-Einzelmolekülmessung werden für gewöhnlich einige tausend Einzelmolekülereignisse detektiert, für welche die Fluoreszenzparameter einzeln bestimmt werden. Eine Darstellung in Häufigkeitshistogrammen sortiert die Signale nach ihren Eigenschaften. Diese Histogramme ermöglichen eine Selektion von Ereignissen über identische Parameter und damit die Auswahl von Subpopulationen. Dabei kann die Schnittmenge aus einer beliebigen Anzahl an Parametern gebildet werden. Neben der Auswahl von unterschiedlichen FRET-aktiven Spezies können auf diese Art und Weise vor allem die einfach-markierten Moleküle aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Eine Fusionierung aller Daten einer Spezies führt zu einer erheblichen Vergrößerung des Datensatzes und damit zu einer Verbesserung der Statistik für nachfolgende Analysen. Dadurch können zusätzliche Auswerteverfahren wie die FCS auf

die Einzelmolekülmessungen angewandt werden (Eggeling *et al.* 1999; Felekyan *et al.* 2005; Margittai *et al.* 2003) bzw. die Fitroutinen für Lebensdauer oder zeit aufgelöste Anisotropie auf zwei oder gar drei Exponenten erweitert werden (Schaffer 2000). Auf diese Weise können Heterogenitäten und Dynamiken innerhalb einer Spezies untersucht werden.

Für die Betrachtung von Dynamiken können je nach Zeitskala der Reaktion unterschiedliche Techniken herangezogen werden. Eine Reaktion, die deutlich langsamer als die Diffusionszeit des Moleküls durch das Beobachtungsvolumen ist, läßt sich bereits in einem Histogramm der Fluoreszenzparameter der MFD-Untersuchung in Form von zwei getrennten Verteilungen ausmachen. Dynamiken mit einer Reaktionszeit deutlich unterhalb der Diffusionszeit wiederum können durch eine speziesselktive Korrelationsanalyse aufgespürt werden. Dabei bietet sich bei Dynamiken, die sich auf den Interfluorophorabstand auswirken, die Kreuzkorrelation der beiden spektralen Bereiche an. Bei ausreichender Photonstatistik können auf diese Weise Dynamiken bis in den ns-Bereich detektiert werden; in den meisten Fällen geschieht die Analyse jedoch lediglich bis in den sub- μ s-Bereich. Zeitliche Fluktuationen im Rahmen der Moleküldurchtrittsdauer lassen sich nur schwer von dem Diffusionsterm trennen, so daß ihre Betrachtung mit der FCS nicht möglich ist. Des weiteren ist anzumerken, daß die Schwellenkriterien bei der Einzelmolekülanalyse Ereignisse mit kurzen Diffusionszeiten diskriminieren und insgesamt den Durchtritt an den Rändern abschneiden (siehe Kapitel 3.2.3.2). In der Summe führen die Auswahlverfahren zu einer insgesamt verlängerten Diffusionszeit bei einem steileren Abklingen der Korrelationsfunktion.

Aus diesem Grunde erfordert die intermediäre Zeitskala im Bereich des Moleküldurchtritts eine weitere Analyseform, die Zeitfensteranalyse (engl. *time window analysis*, (Margittai *et al.* 2003)). Dabei werden die bereits identifizierten Einzelmolekülereignisse in kleinere Intervalle definierter Breite unterteilt und daraufhin abermals die Fluoreszenzparameter separat bestimmt. Dynamiken in diesem Zeitbereich äußern sich in der Ausbildung von Subpopulationen. Die weitere Dezimierung der Photonen pro Ereignis führt jedoch zu einer Verschlechterung der Statistik und limitiert die Anwendung der Zeitfensteranalyse auf den Submillisekunden-Bereich.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Fluorophore

Die Succinimidylester von Alexa Fluor® 488 (im weiteren als Alexa488 bezeichnet) und Cyanin5 sind jeweils von Molecular Probes (Eugene, USA) und Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, Großbritannien) bezogen worden. Sie dienen in allen aufgeführten FRET-Experimenten als Donor-Akzeptor-Paar. Das Überlappungsintegral J dieses Paares beträgt $1,14 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1}\text{cm}^3$, resultierend in einem reduzierten Försterradius R_{0r} von $53,7 \text{ \AA}$ (Berger 2001).

Zum Zwecke von Justage- und Standardmessungen sind des weiteren Sulphorhodamin 101 (Fluka, Neu-Ulm), Rhodamin 110 (Radiant Dyes, Wermelskirchen) und Sulforhodamin B (LambdaPhysik, Göttingen) herangezogen worden. Die Spektren, photophysikalischen Eigenschaften sowie die chemische Struktur der jeweiligen Fluorophore sind im Anhang aufgeführt.

3.1.2 Chemikalien

- Aktivkohle (Merck, Darmstadt)
- Borsäure (Sigma-Aldrich, Seelze)
- L-Ascorbinsäure (Vitamin C) (Sigma-Aldrich)

- EDTA (Serva, Heidelberg)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Kaliumchlorid (Merck)
- Ludox (Sigma-Aldrich)
- Magnesiumchlorid Hexahydrat (Sigma-Aldrich)
- Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Glutathion Sepharose-Kugeln (Pharmacia, Buckinghamshire)
- Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (TRIS) (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- tRNA (Roche, Mannheim)

3.1.3 Puffer

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,6

Puffer A+: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0,4 mM Vitamin C, pH 7,6

Puffer B: 20 mM HEPES-KOH, 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7,9

Puffer C: 90 mM Tris-Borat, 0,4 mM Vitamin C, pH 8,3

PBS (*Phosphate Buffered Saline*): 10 mM Phosphat, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4

Alle Puffer sind in Reinstwasser (arium® 611 ufuv, Sartorius, Göttingen) angesetzt worden. Für Einzelmolekülexperimente sind die Puffer zusätzlich ca. 15 min über Aktivkohle gereinigt und anschließend filtriert (FP30/0,2 CA-S, Schleicher&Schuell, Dassel) worden, um fluoreszierende Verunreinigungen zu entfernen.

3.1.4 Oligonukleotide und deren Markierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind Hybride einer Reihe von Oligonukleotiden untersucht worden. Die Synthese der DNAs sowie ihre Fluoreszenzmarkierung sind von IBA (Göttingen, Germany) durchgeführt worden. Die RNA-Oligonukleotide sind allesamt bei Dharmacon (USA) erworben worden, die nachfolgende Markierung geschah abermals von IBA.

Um eine Amino-Funktionalität zum Anfügen der Fluorophore in die Oligonukleotidstränge einzuführen, sind an die Positionen der Fluorophormarkierung

5-C₆-Aminoallyl-Deoxythymidine (im Falle der DNA und der *K-turn*-Sequenzen) bzw. 5-Aminoallyl-Uracile (im Falle der restlichen RNAs) eingebaut worden. Die chemische Struktur ist in Abbildung 3-1 skizziert. Die Succinimidylester-aktivierten Fluorophore konnten im nächsten Schritt mit der entsprechenden Base reagieren, gefolgt von einer PAGE-Aufreinigung zum Entfernen der ungebundenen Fluorophore.

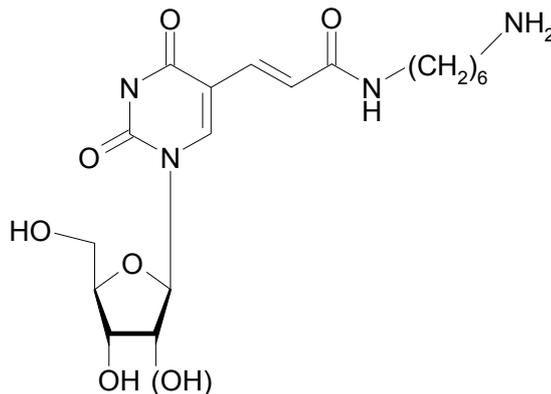


Abbildung 3-1: Struktur der zur Fluorophormarkierung verwendeten modifizierten Thymidins/Uracils Die Verknüpfungslänge kann durch Weglassen der C6-Gruppe variiert werden.

Die Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die Markierungspositionen sowie die Wahl des Fluorophors sind im Anhangsabschnitt „Oligonukleotidsequenzen“ aufgeführt. Die Sekundärstrukturen sind jeweils im Ergebnis- und Diskussionsteil schematisch dargestellt, da sie an jener Stelle maßgeblich zum Verständnis der gewonnenen Daten beitragen.

3.1.5 15.5K und 61K Protein

Die Expressierung und Aufreinigung des humanen 15.5K sowie des 61K Proteins sind in der Gruppe von Prof. Lührmann (Institut für Biochemie, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) von Dr. Stefanie Nottrott und Eva Kühn-Hülken nach (Nottrott *et al.* 1999) aufgereinigt worden.

3.1.6 Zellkultur

3.1.6.1 Zelllinie

Hela SS6, bereitgestellt von Prof. Lührmann (Institut für Biochemie, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen).

3.1.6.2 Medien und Feinchemikalien

Von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, falls nicht anders angegeben.

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco
- F-12 Nutrient Mixture (F12)
- Fötale Kälberserum (FCS) Gibco
- L-Glutamin 20 mM
- Medium 199 liquid (M199)
- Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)
- Trypsin/EDTA Gibco

3.1.6.3 Nährmedien

Medium 1: 500 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin

Medium 2: 500 ml F12, 50 ml FCS, 5,5 ml L-Glu, 5 ml Penicillin/Streptomycin

Medium 3: 500 ml M199, 50 ml FCS, 9 ml L-Glu, 5 ml Penicillin/Streptomycin

3.2 Methoden

3.2.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden sowie Proteinnanbindung

Für die Hybridisierung von zwei betreffenden Oligonukleotiden sind beide Stränge im Puffer A bei einem Donor-Akzeptor-Verhältnis von 1:3 und einer Donorkonzentration von 10 μM vereinigt worden. Die Probe ist bis 80°C erhitzt und über Nacht abgekühlt worden.

Für Experimente mit Protein sind die bereits hybridisierte RNA-Duplex (0,05 μM) gemeinsam mit dem entsprechenden rekombinanten Protein (2 μM) sowie *E.coli* tRNA (0.5 g/L) im Puffer B auf 36°C erhitzt und auf Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden abgekühlt worden.

Im Falle der Proben für die Messung der U4/U6 snRNA *three-way junction* war die Hybridisierung von drei Strängen erforderlich. Hierzu wurden zuallererst die beiden Stränge mit dem längsten doppelsträngigen Abschnitt, U4d und U4a, nach dem oben aufgeführten Schema miteinander hybridisiert. Der unmarkierte Strang wurde in einem fünffachen Überschuß relativ zum Donorstrang hinzugefügt, der Ansatz diesmal lediglich auf 45°C erwärmt und abermals abkühlen lassen.

3.2.2 Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Absorption der Fluoreszenzfarbstoffe für die Konzentrationsbestimmung ist das UV/Vis-Spektrometer Cary 300 Bio (Varian, Palo Alto, USA) im Zweistrahlmodus benutzt worden. Die Registrierung der Fluoreszenzemissionsspektren geschah entweder am FluoroMax-3 oder Fluorolog (Horiba Jobin Yvon, Edison, USA). Es sind jeweils Korrekturen bezüglich der Wellenlängenabhängigkeit der Detektoreffizienz und der Anregungsleistung vorgenommen worden. Des Weiteren wurde der vom Puffer stammende Hintergrund abgezogen.

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer ist am TCSPC-Aufbau (IBH Data Station v2.1, Jobin Yvon) durchgeführt worden. Die Anregung geschah mit Hilfe eines linear polarisierten Diodenlasers (470 oder 635 nm, Picoquant, Berlin) im gepulsten Modus (50 MHz); zur Vermeidung von Anisotropieeffekten ist im magischen Winkel detektiert worden. Die Instrumentenantwortfunktion ist im 20%igen (v/v) Ludox aufgenommen worden. Um eine gute Anpassung der Lebensdauern mit einer bis zu biexponentiellen Zerfallsfunktion zu erhalten, sind 10.000 Photonen pro Messung aufgenommen worden. Der Fit ist jeweils mit der der Apparatur mitgelieferten Software (IBH DAS6 Analysis) durchgeführt worden.

3.2.2.1 Bestimmung der Quantenausbeute

Zur Bestimmung der Quantenausbeute sind zwei Methoden zu Hilfe genommen worden: 1. Intensitätsmessungen; 2. Lebensdauermessungen.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist definiert als das Verhältnis der emittierten zur absorbierten Strahlung. Da die Bestimmung der absoluten Werte nur mit einem sehr hohen apparativen Aufbau zu realisieren ist (Kontrolle der Anregungsleistung, Sammlung aller Fluoreszenzphotonen), wird auf eine komparative Intensitätsmessung zurückgegriffen. Dabei wird die Absorption (in Form der optischen Dichte $o.D.$) und das Integral der Emission von der Probe und einer Referenz F , welche eine bekannte Quantenausbeute besitzt, bestimmt. Die Berechnung der Quantenausbeute folgt nach der Gleichung 3-1:

$$\Phi_{F,Probe} = \Phi_{F,Ref} \frac{o.D._{Ref} F_{Probe} n_{Probe}^2}{o.D._{Probe} F_{Ref} n_{Ref}^2} \quad (\text{Gl. 3-1})$$

Da Referenz und Probe meist in demselben Medium gemessen werden, fällt die Berücksichtigung des Brechungsindex n weg. Um Artefakte durch Reabsorption zu vermeiden, sollte die Absorption eine *o.D.* von 0,03 nicht übersteigen.

Die Intensitätsmessungen sind häufig von Schwankungen beeinträchtigt, so daß sich unter bestimmten Voraussetzungen als Alternative die Lebensdauer-messung anbietet. Dafür muß jedoch die strahlende Lebensdauer ($1/k_F$) für Referenz und Probe identisch sein. Diese Annahme ist für gewöhnlich für Fluorophore der gleichen Farbstoffklasse gerechtfertigt, so daß in diesem Fall die folgende Gleichung 3-2 angewandt werden kann.

$$\Phi_{F,Probe} = \Phi_{F,Ref} \frac{\tau_{Probe}}{\tau_{Ref}} \quad (\text{Gl. 3-2})$$

Die Fluoreszenzlebensdauer sollte dabei im magischen Winkel detektiert werden.

3.2.3 Multi-Parameter Fluoreszenzdetektion (MFD)

Da bereits im Theoriekapitel ausführlich auf die Prinzipien der MFD eingegangen worden ist, soll an dieser Stelle hauptsächlich der Aufbau skizziert und die Registrierung als auch Prozessierung der Daten beschrieben werden.

3.2.3.1 Konfokales Mikroskop

Das Prinzip des konfokalen Aufbaus besteht in der epi-illuminierten Anregung und der Sammlung des Emissionslichtes mittels eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur. Bei vollständiger Ausleuchtung des Objektivs bewirkt die hohe numerische Apertur eine Begrenzung des Anregungsfokus in lateraler Richtung zu 0,5-1 μm . Eine zusätzliche axiale Begrenzung wird durch das Einsetzen einer Lochblende in der Bildebene erreicht, so daß das Gesamtanregungsvolumen in lediglich wenigen Femtolitern resultiert. Dadurch erreicht man ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei der Einzelmolekülspektroskopie, da das Hintergrundsignal proportional zum Detektionsvolumen ist (Mets & Rigler 1994). Eine detaillierte Beschreibung des konfokalen Aufbaus findet sich in Lehrbüchern zur Mikroskopie (Pawley 1995).

Im weiteren soll der in dieser Arbeit benutzte Multiparameter-Fluoreszenzdetektionsaufbau, wie er in der Gruppe von Prof. Seidel (Molekulare Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) etabliert worden ist, mit

seinen Hauptkomponenten skizziert werden. Graphisch wird die Darstellung durch die Abbildung 3-2 begleitet. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in (Rothwell *et al.* 2003).

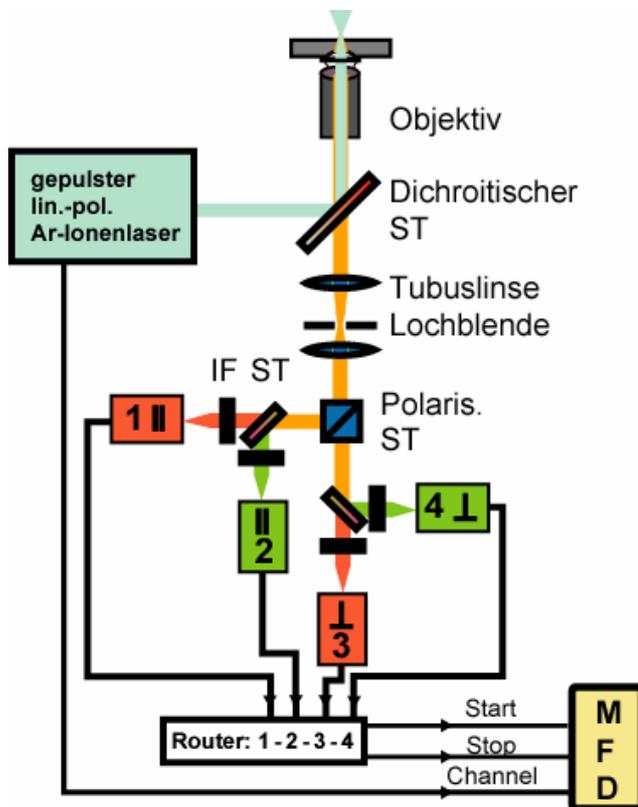


Abbildung 3-2: Schematischer Aufbau des epi-illuminierten konfokalen Mikroskops mit Detektionseinheit Die Probe wird mit einem Laser angeregt, welcher über einen dichroitischen Strahlteiler (ST) in das Objektiv eingekoppelt wird. Das Emissionlicht wird über dasselbe Objektiv gesammelt, passiert den Strahlteiler, um dann entsprechend der Polarisation und der Wellenlänge in seine Komponenten aufgeteilt zu werden. Die spektrale Auswahl in den Detektionskanälen geschieht mit Hilfe von Interferenzfiltern (IF).

Die Anregung der Probe für Einzelmolekül- sowie FCS-Messungen geschieht an einem konfokalen, epi-illuminierten Mikroskop mittels eines linear polarisierten, aktiv modengekoppelten (73 MHz) Argon-Ionen Lasers (Coherent, Santa Clara, USA), betrieben bei 496,5 nm mit einer Anregungsleistungsdichte von etwa 50 kW/cm² im Fokus. Die Fokussierung in die Lösung geschieht durch ein 60x NA 1,2 Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, Hamburg). Der Laserdurchmesser wird mittels eines Kollimators so gewählt, daß das Anregungsvolumen in 2 fl resultiert. Die Abschätzung erfolgt nach Gl. 2-42 durch Messung der Diffusionszeit von Rhodamin 110 mittels FCS (0,23 ms). Das Fluoreszenzlicht wird von dem Anregungslicht durch einen 505 LP dichroitischen Strahlteiler (AHF, Tübingen) separiert und weiter durch eine 100 µm Lochblende geschickt, um das Streulicht in axialer Richtung herauszuschneiden. Weiterhin wird die Fluoreszenz nacheinander in seine parallele und senkrechte Komponente (Polarisationsstrahlteiler VISHT11, Gsänger, Planegg) sowie den roten und grünen Spektralbereich (dichroitische Strahlteiler 620DCLX oder 595DCLP, AHF) aufgeteilt, resultierend

in vier Detektionskanälen. Die Einschränkung des detektierten Spektrums geschieht mittels Bandpaßfiltern (HQ535/46 und HQ720/150, Chroma Technology Corp., Rockingham, USA), bevor die Photonen schließlich auf die vier Avalanche-Photodioden (APD) (EG&G, Vaudeuil, Kanada bzw. SPCM-AQR, Perkin-Elmer Optoelectronics, Fremont, USA) fokussiert werden. Die Zählung der Photonen und die Speicherung der Informationen geschehen über eine oder zwei PC-Einsteckkarten (SPC 432 bzw. SPC 132, Becker&Hickl GmbH, Berlin) im MFD-Modus. Für jedes Photon werden die Ereignisnummer, die Ankunftszeit nach dem Laserpuls, die Interphotonzeit seit dem letzten Photon sowie die Kanalnummer, wie sie von dem Multiplexer zugeordnet wird, gespeichert. Daraus ergeben sich die Möglichkeiten, die Zeitspur zu rekonstruieren als auch Lebensdauerzerfallshistogramme für alle Kanäle zu generieren. Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung wird über einen Zeit-zu-Amplitude-Konverter (engl. *time-to-amplitude converter*, TAC) realisiert, welcher im umgekehrten Modus betrieben wird (Brand 1998). Das Meßfenster wird durch die Repetitionsrate des Lasers diktiert (13,6 ns); effektiv beträgt es nur 12,5 ns, was aus der Breite von 49 ps der 256 Kanäle resultiert (Kapitel 2.5.1.1). Details zur Datenaufnahme sind in einer Publikation von C. Eggeling vorgestellt worden (Eggeling *et al.* 2001).

3.2.3.2 *Burst-Integrated Fluorescence Lifetime (BIFL)*

An dieser Stelle soll die Durchführung einer Einzelmolekülmessung einschließlich der Analyse beschrieben werden. Der Messung geht im allgemeinen die Justage des Anregungs- als auch Detektionspfades voraus. Die Justage des ersteren zielt auf eine Ausleuchtung des Objektivs entlang seiner Achse mit dem gewünschten Strahldurchmesser ab. Die Detektion wird maximiert, indem der Emissionsstrahl alle optischen Komponenten optimal passiert und schließlich zentral auf den Detektor trifft. Ist dies geschehen, kann die Messung starten.

Datenerfassung

Wie in dem Theoriekapitel bereits beschrieben worden ist, sind für die korrekte Bestimmung der Energietransfereffizienz über die Lebensdauer bzw. Intensitäten aufbau- und justagespezifische Korrekturen erforderlich. Aus diesem Grunde sind vor jeder Meßreihe nach einer sorgfältigen Justage Messungen für die Bestimmung der Korrekturparameter vorzunehmen, wie sie in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 3-1: Korrekturparameter für Einzelmolekülmessungen

<i>Korrekturparameter</i>	<i>Meßprobe</i>	<i>Konzentration</i>
Gerätefunktion $g(t)$	Puffer bzw. Wasser	
G-Faktor grüne Kanäle G_g	Rh110	Ensemble, ca. 1 nM
G-Faktor rote Kanäle G_r	Rh101	Ensemble, ca. 1 nM
Crosstalk α	Alexa488 bzw. Rh110	Ensemble, ca. 1 nM

Zusätzlich wird zur Überprüfung der Güte der Justage (Lebensdauer und Anisotropie) eine Einzelmolekülmessung von Rh110 durchgeführt. Die Einzelmolekülkonzentration beträgt im Allgemeinen etwa 0,1 nM. Um der Oxidation der Fluorophore vorzubeugen, wird dem Meßpuffer 0,4 mM Vitamin C hinzugefügt.

Datenaufarbeitung und Analyse:

Im Folgenden sollen die Parameter für die Isolierung der Einzelmolekülereignisse aus den Rohdaten aufgeführt werden, sowie die weitergehenden Analyseverfahren zur Bestimmung von korrekten Lebensdauern dargestellt werden. Eine detaillierte Beschreibung der MFD-Datenregistrierung und -prozessierung findet sich in Publikationen von C. Eggeling und J. Schaffer (Eggeling *et al.* 1998; Schaffer *et al.* 1999). Die gesamte Analyse wurde mit in LabView-geschriebenen Programmen (Versionen 5.1-7.0, National Instruments) durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.3.5)

Die bei der Diffusion von Einzelmolekülen durch das offene konfokale Volumen detektierten Photonen – im weiteren als Burst bezeichnet – werden durch Anlegen von den Auswahlkriterien von einem Minimum von 160 Photonen mit einer Interphotonzeit unterhalb von 100µs vom Hintergrund differenziert. Die Photonen eines jeden Burst werden über 30 nacheinander folgende Photonen gemittelt und zu Fluoreszenzzerfallshistogrammen – einen pro Detektionskanal aus Abbildung 3-2 – zusammengefaßt, wie es die Abbildung 3-3 darstellt. Die Berechnung der Fluoreszenzparameter geschieht dann weiter wie in Kapitel 2.5.1.1 aufgeführt. Neben den dort aufgeführten Korrekturen wird eine weitere Subselektion der Bursts vorgenommen, die das Ausbleichen eines Farbstoffs

während des Einzelmoleküldurchtritts in Betracht zieht und eine daraus resultierende Verfälschung der FRET-Effizienz verhindert. Dazu wird der Burst auf seinen zeitlichen Schwerpunkt T in den roten und grünen Kanälen hin untersucht; zur weiteren Analyse werden nur Moleküle mit einem Unterschied von weniger als 0,55 ms zwischen T_G und T_R herangezogen.

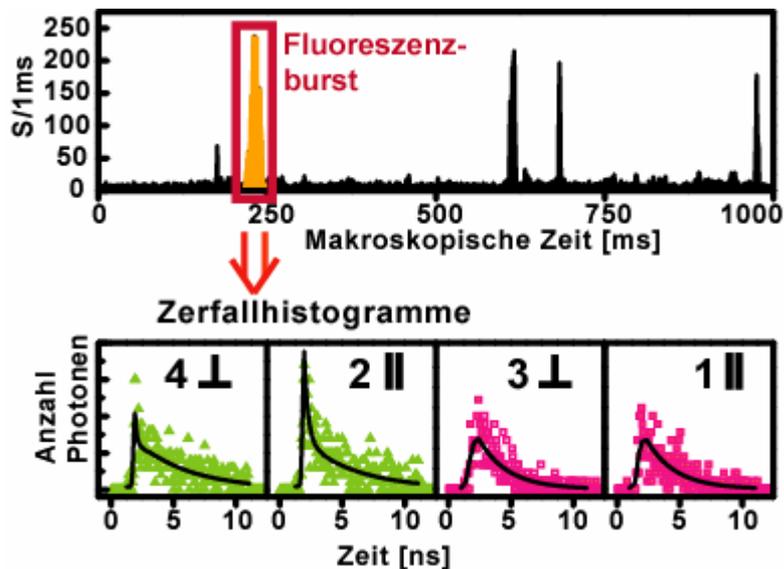


Abbildung 3-3: Auswahl von Bursts und Bildung von Zerfallshistogrammen Die Fluoreszenzbursts werden durch Anlegen eines mathematischen Filters vom Hintergrund unterschieden. Die ausgewählten Photonen werden im weiteren zu Zerfallshistogrammen zusammengefaßt und weiter bezüglich der Lebensdauer, Intensität und Anisotropie untersucht.

Im Falle der Messungen am *K-turn* hat eine detaillierte speziesselbektive Analyse des Fluoreszenzzerfalls der Donorfluoreszenz ein biexponentielles Verhalten aufgezeigt, was auf eine komplexe Löschung des Donorfluorophors schließen läßt. Der Fit, welcher einen Offset von 5% der Gesamtfluoreszenz aufgrund von Nachpulsen der APDs beinhaltete, resultierte in den Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D1} = 3.35$ ns und $\tau_{D2} = 0.63$ ns mit entsprechenden Speziesanteilen von $x_{D1} = 0.78$ und $x_{D2} = 0.22$. Die Löschung des Donorfluorophors beeinträchtigt den FRET-Prozess an sich nicht – wie es durch den reduzierten Förster-radius ausgedrückt wird – jedoch muß dieser kompetitive Prozeß bei der Berechnung der korrekten speziesgewichteten Donorfluoreszenzlebensdauer (Berger 2001; Rothwell *et al.* 2003; Schweinberger 2002) einbezogen werden.

Hierzu werden die speziesgewichtete $\tau_{D(A)}^{-X}$ und die photonengewichtete $\tau_{D(A)}^{-A}$ Lebensdauer bei Kenntnis von τ_{D1} , τ_{D2} , x_{D1} und x_{D2} für unterschiedliche FRET-Effizienzen simuliert. Die Auftragung beider Lebensdauern gegeneinander ergibt

eine Kurve, die mit einem Polynom zweiten Grades, $\tau_{D(A)}^{-X} = a \cdot \left(\tau_{D(A)}^{-A}\right)^2 + b \cdot \tau_{D(A)}^{-A} + c$, angepaßt wird und damit die Korrekturfunktion für die experimentelle Zeitachse, welche die photonengewichtete Lebensdauer darstellt, liefert. Für die Daten des *K-turns* sind die folgenden Werte ermittelt worden: $a = -0.0285$, $b = 0.9401$, und $c = 0.0121$.

Zusätzlich sind die Lebensdauern auf den Fehler, den das Nachpulsen der APDs in die Daten einbringt, hin korrigiert worden, da die Lebensdauerbestimmung ohne zusätzliche Hintergrundberücksichtigung geschah. Dafür sind alle Fluoreszenzzerfalldaten der Spezies Donor, RNA-Duplex und U4 snRNA/15.5K Komplex jeweils mit einem monoexponentiellen Zerfall mit und ohne Hintergrundberücksichtigung von 5% gefittet worden. Letztere lieferte um 0,3 ns längere Lebensdauern, so daß die Lebensdauerachse mittels Subtraktion dieses Wertes korrigiert worden ist.

Im Falle der DNA- und RNA-Messungen ist das Nachpulsen bereits bei der burstweisen Analyse mit in Betracht gezogen worden. Eine biexponentielle Anpassung der Donorfluoreszenz hat keine signifikante Löschung des Fluorophors aufzeigen können, so daß keine Korrektur der Lebensdauer vorgenommen werden mußte.

Der Großteil der U4/U6 snRNA *three-way junction* Messungen ist an APDs durchgeführt worden, die kaum Nachpulse generieren. Lediglich die Lebensdauermessungen, die an neueren APDs durchgeführt worden sind, sind mit einer Hintergrundberücksichtigung von 5% der Gesamtfluoreszenz in Form eines Offsets angepaßt worden.

Darstellung der MFD-Daten

Nachdem für jeden Burst einer Messung die einzelnen Parameter bestimmt worden sind, können sie in einem Häufigkeitshistogramm graphisch dargestellt werden. Zur besseren Auflösung von Subpopulationen in einem heterogenen System können die 1D-Histogramme von zwei Parametern einander gegenübergestellt werden, so daß sie in einem zweidimensionalen Histogramm resultieren. Das Prinzip ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

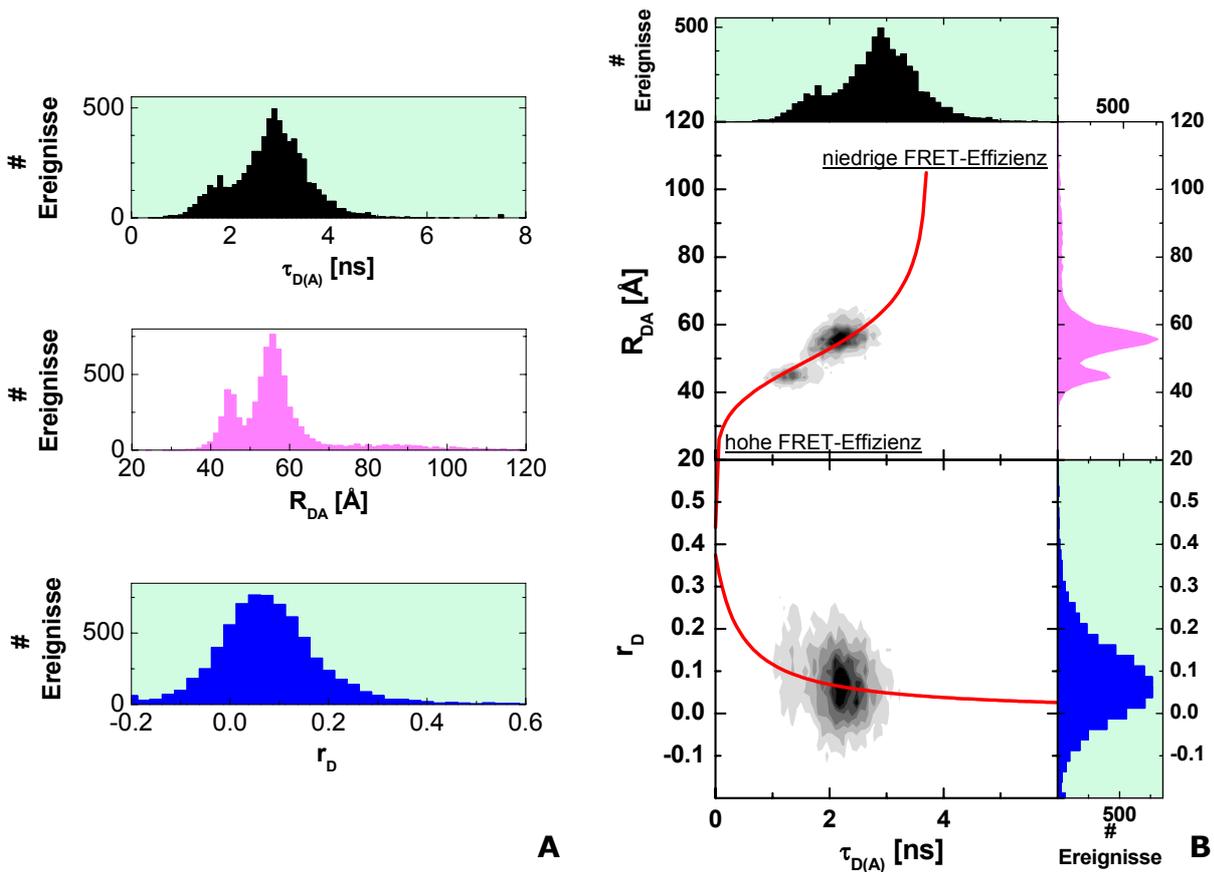


Abbildung 3-4: Ein- und zweidimensionale Darstellung von MFD-Einzelkoleküldaten
(A) Eindimensionale Häufigkeitshistogramme der Parameter Fluoreszenzlebensdauer, Interfluorophorabstand und Anisotropie. **(B)** Kombination der Parameter in zweidimensionalen Häufigkeitshistogrammen. Die obere durchgezogene Linie stellt die Gl. 3-3, die untere die Perrin-Gleichung (Gl. 2-17) dar.

In dem oberen 2D-Histogramm beschreibt die folgende Gleichung den Zusammenhang zwischen dem aus dem Intensitätsverhältnis bestimmten Abstand und der Fluoreszenzlebensdauer bei unterschiedlichen Energietransfereffizienzen.

$$R_{DA}(\tau_{D(A)}) = R_{0r} \left[\left(\frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}} - 1 \right) \cdot \Phi_{FD} \right]^{1/6} \quad (\text{Gl. 3-3})$$

Der Zusammenhang zwischen der Anisotropie und der Fluoreszenzlebensdauer in dem unteren 2D-Histogramm wird durch die Perrin-Gleichung (Gl. 2-17) beschrieben.

3.2.3.3 FCS

FCS-Ensemblemessungen werden bei einer Fluorophorkonzentration von 1 nM (5-10 Moleküle im Fokus) durchgeführt. Bei heterogenen Proben ist eine speziessensitive FCS auf die Einzelmolekülmessungen angewandt worden. Dazu sind die Bursts von Interesse exportiert und einer Softwarekorrelation unterworfen worden. Je nach Anzahl von hell-dunkel-Dynamiken sind unterschiedliche Komponenten der Gl. 2-44 herangezogen worden, um die in der FCS-Kurve vertretenen Prozesse anzupassen.

3.2.3.4 MFD-Imaging

Die MFD-Technik als bildgebendes Verfahren wird im MFD-Imaging realisiert. Hierzu wird eine Probe schrittweise mit dem Anregungsvolumen abgetastet. Die Umsetzung des sogenannten konfokalen Scannings geschieht über eine piezo-gesteuerte x-y-Scaneinheit (Physik Instrumente, Karlsruhe), wobei die Probe relativ zum Anregungsvolumen bewegt wird und das Scannen senkrecht zur optischen Achse stattfindet. Man erhält ein Bild, bei welchem die Pixelgröße von der Schrittweite des Scannens diktiert wird und die Auflösung durch die Ausmaße des konfokalen Volumens begrenzt ist. Um einen beugungsbegrenzten Fokus zu erhalten, muß das Objektiv vollständig mit dem Anregungslicht ausgeleuchtet werden. Da sich das Auflösungsvermögen eines Objektivs nach $d = 1,22\lambda / 2NA$ berechnet, spielt dabei neben der gebrauchten Wellenlänge vor allem auch die numerische Apertur NA , welche den Öffnungswinkel des Objektivs widerspiegelt, eine Rolle. Bei der Anregungswellenlänge von 496,5 nm und einer numerischen Apertur von 1,2 ergibt sich eine maximale Auflösung von 252 nm. Zum Erhalt einer zusätzlichen hohen Tiefenschärfe bei der Abbildung wird eine Lochblende verwendet, die bei den MFD-Imaging Versuchen einen Durchmesser von 60 µm beträgt.

Vor der Aufnahme eines Bildes wird die Probe mit Weitfeld ausgeleuchtet und die Positionierung des Fokus in allen drei Richtungen ausgewählt. Im Falle von Scans durch Zellen oder Sepharosekugeln ist als erstes die z-Position so eingestellt worden, daß man bei einem Scan einen Schnitt durch die Mitte des Objektes ausführt.

Die Steuerung des Scans geschieht mit dem Visual C⁺⁺-basierten Programm Gi-scan (Sandhagen 2005), die Datenaufnahme weiterhin mit den SPC-

Karten. Während des Scans generiert das Programm zum Zeitpunkt von Pixel- und Zeilensprüngen mittels eines Pulsgenerators virtuelle Photonen, die in zusätzlichen Kanälen in der SPC-Datei gespeichert werden. Auf diese Weise kann das Bild rekonstruiert werden.

3.2.3.5 Software

Die Datenregistrierung der MFD erfolgte an der mit den SPC-Karten mitgelieferten Software SPCM (Becker&Hickl GmbH, Berlin). Die gesamte Prozessierung und Analyse der Daten geschah an eigens in der Arbeitsgruppe Prof. C.A.M. Seidel geschriebenen LabView-basierten Programmen (Versionen 5.1-7.0, National Instruments).

Tabelle 3-2: Labview-Programme und ihre Anwendungsbereiche

<i>Programm</i>	<i>Anwendung</i>
ELKE	burstweise Analyse der Rohdaten (Lebensdauer, Anisotropie, Intensitäten)
MARGARITA	Generierung von anwenderspezifizierten 2D-Histogrammen aus Elke-Auswertung, Export von ausgewählten Burst-Koordinaten für weitere Analyse
KRISTINE	Softwarekorrelation von MFD-Daten (Einzelmolekül- und Ensemblemessungen)
HBC	Histogrammbildung aus Burst-Koordinaten
JORDIGIRL	Histogrammbildung aus SPC-Daten
FIT MACHINE	Multiexponentieller Lebensdauerfit von Ensemble- oder zusammengefaßten Einzelmolekülmessungen
ABID	Generierung eines zeitaufgelösten Anisotropiezerfalls aus Burst-Koordinaten
GET COUNTRATE	Bestimmung der Zählrate aus einer SPC-Datei
MARCELLE	Betrachtung und Auswertung von MFD-Imaging-Bildern

Entwickelt von: Dr. Matthew Antonik, Dr. Christian Eggeling, Dr. Suren Felekyan, Dr. Elke Hausstein, Volodymyr Kudryavtsev, Dr. Jörg Schaffer (AG Prof. Claus A.M. Seidel).

Die Hardwarekorrelation ist an der Korrelatorkarte ALV-5000 durchgeführt (Version 5,0, ALV, Langen) worden. Für weitere Berechnungen und Tabellenkalkulationen sind Excel (Version 10, Microsoft, USA) und Microcal™ Origin™ (Version 6.0, Microcal Software, Northampton, USA) herangezogen worden. Für die Anpassung von DNA-Knicken an experimentelle Daten wurden Makros in Igor Pro (WaveMetrics, Portland, USA) geschrieben (mit freundlicher Hilfe von Prof. Philipp Oesterhelt).

Der Modellierung von gekrümmten DNAs diene das Programm DIAMOD (Dlagic & Harrington 1998). Die graphische Darstellung und Bearbeitung von pdb-Dateien wurde sowohl in DS ViewerPro (Version 5.0, Accelrys Software, San Diego, USA) als auch in VMD 1.8.3 (Humphrey *et al.* 1996) vorgenommen.

3.2.4 Molekulardynamik(MD)-Simulation

Die Modellierung der Fluorophorverteilung an DNAs und RNAs ist von Dr. Gunnar Schröder aus der Gruppe von Prof. Helmut Grubmüller (Theoretische und computergestützte Biophysik, MPI für Biophysik, Göttingen) durchgeführt worden. Vakuum-MD-Simulationen der entsprechenden an das Oligonukleotid gebundenen Fluorophore sind bei erhöhter Temperatur ($T = 2000 \text{ K}$) mittels der Gromacs Simulationssoftware (Berendsen *et al.* 1995) durchgeführt worden. Während der Simulation wurde die Oligonukleotidstruktur durch ein starkes harmonisches Potential eingeschränkt, während sich die Fluorophore frei bewegen konnten. Die Kraftfeldparameter für die Farbstoffe wurden von Gruppen adaptiert, die mit analogen Gromacs Kraftfeldern arbeiten. Da bei der Betrachtung nur die sterische Hinderung von Interesse war, wurden die elektrostatischen Wechselwirkungen in die Simulation nicht mit einbezogen. Die Gesamtdauer der Simulation betrug 10 ns, wobei die Koordinaten jede Pikosekunde gespeichert wurden, was ein Ensemble von 10.000 Fluorophorkonfigurationen liefert. Die Modellstrukturen sind in VMD 1.8.2 (Humphrey *et al.* 1996) assembliert worden.

3.2.5 Zellkultur

Die Zellen sind bei 37°C und 20% CO_2 kultiviert worden. Die Splittung der Zellen geschah zweimal in der Woche. Zellen mit einer Konfluenz von 80% sind mit PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin für eine Minute behandelt und schließlich

resuspendiert worden. Ca. 1,2 ml Zellen sind in 36 ml Medium 1/2/3 verdünnt und in drei Kulturflaschen verteilt worden. Zum Messen von Zellen sind jene am Vortag nach demselben Prinzip verdünnt worden, jedoch bei einer vierfachen Konzentration, um bereits nach einem Tag eine Konfluenz von 80% zu erhalten. Die Auftragung geschah auf 24x24 mm große Glasplättchen in 6-Well Platten.

4 ERGEBNISSE

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse zu Oligonukleotidstrukturen resultieren aus FRET-Einzelmolekülmessungen, basierend auf der Multiparameter-Fluoreszenzdetektions-Technik. FRET erlaubt das Messen von Abständen im nm-Bereich. Die Einzelmoleküldetektion stellt dabei sicher, daß Mittelungsartefakte aufgrund von nicht vollständiger Doppelmarkierung oder ausgebleichten Fluorophoren ausgeschlossen werden. Das gleichzeitige Detektieren von Intensitäten und Lebensdauern erlaubt den Ausschluß von systematischen Fehlern und der eventuell auftretenden Löschung eines Fluorophors. Eine zusätzliche Trennung der Fluoreszenz nach der Polarisation ermöglicht die Bestimmung der Anisotropien. Letztere erlauben die Überprüfung der Fluorophorbeweglichkeit. All diese Parameter sollen dazu herangezogen werden, absolute Abstände zu bestimmen und hieraus molekulare Strukturen zu determinieren. Am Ende des Kapitels sind des weiteren Machbarkeitsstudien zu konfokalen Messungen im Rasterverfahren in Zellen aufgezeigt.

4.1 DNA-Helix

In den vorliegenden Messungen zur Charakterisierung der Multiparameter-Fluoreszenzdetektion dient eine B-DNA-Helix als Norm für intramolekulare Abstandsmessungen via FRET. Es werden zum einen zwölf unterschiedliche intrahelikale Abstände und deren Energietransfereffizienzen untersucht, um sie mit den Ergebnissen einer Molekulardynamik(MD)-Simulation zu vergleichen.

4.1.1.1 Experimentelle FRET-Daten

Die zwölf Proben sind im Puffer A+ bei einer Donorkonzentration von etwa 0,1 nM über die Einzelmolekül-MFD vermessen worden. Es sind Meßdaten für die Korrekturparameter der Intensitäten in den grünen und roten Kanälen aufgenommen (siehe Tabelle 4-1) worden. Die Energietransfereffizienzen und Abstände sind aus der Fluoreszenzlebensdauer berechnet worden. Die kompletten MFD-Daten in graphischer sowie numerischer Form finden sich im Anhang (Tabelle 5; Abbildung 1).

Tabelle 4-1: Typische Korrekturparameter für MFD-Daten B_G : grüner Hintergrund, B_R : roter Hintergrund, g_G : grüne Detektionseffizienz, g_R : rote Detektionseffizienz, α : spektraler Crosstalk.

	B_G	B_R	g_G	g_R	α
Gerade Helix	2,9 kHz	1,1 kHz	0,32	0,53	0,018
Geknickte Helix	3,8 kHz	1,4 kHz	0,31	0,39	0,018

In Abbildung 4-2 sind die 2D-Histogramme eines Einzelmolekülexperimentes dargestellt. Dabei sind drei Proben mit den Interfluorophorabständen von 5, 11 und 19 Basenpaaren gemischt worden. In der oberen Graphik ist der Interfluorophorabstand R_{DA} gegen die Donorfluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ aufgetragen. Beide Parameter sind zusätzlich in 1D-Histogrammen dargestellt. Es sind vier Spezies zu erkennen: eine nur den Donor tragende Spezies sowie die drei unterschiedlichen FRET-aktiven Spezies (hervorgehoben durch Pfeile). Die durch alle Proben durchgehende sigmoidale Kurve beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Abstand und der Donorlebensdauer bei unterschiedlichen Energietransfereffizienzen, wie er durch die Gl. 3-3 definiert ist. Eine Abweichung von dieser Kurve würde auf Variationen in den Quantenausbeuten hindeuten. Die Anisotropie des Donors ist in dem sich darunter befindenden 2D-Histogramm ebenfalls in Abhängigkeit von der Lebensdauer aufgezeigt. Durch das Heranziehen der Perrin-Gleichung (Gl. 2-17) kann die Rotationskorrelationszeit abgeschätzt werden (siehe durchgezogene Linie in der Graphik); in diesem Fall beträgt sie 0,5 ns. Dabei wird eine fundamentale Anisotropie für Alexa488 von 0,375 angenommen. Aus der niedrigen Anisotropie (zwischen 0,05 und 0,1) und der kurzen Rotationskorrelationszeit kann ein hoher Grad an Beweglichkeit der Fluorophore geschlossen werden. Aus diesem Grunde ist es auch gerechtfertigt, zur Berechnung der Abstände einen Wert von 2/3 für den Orientierungsfaktor κ^2 anzunehmen.

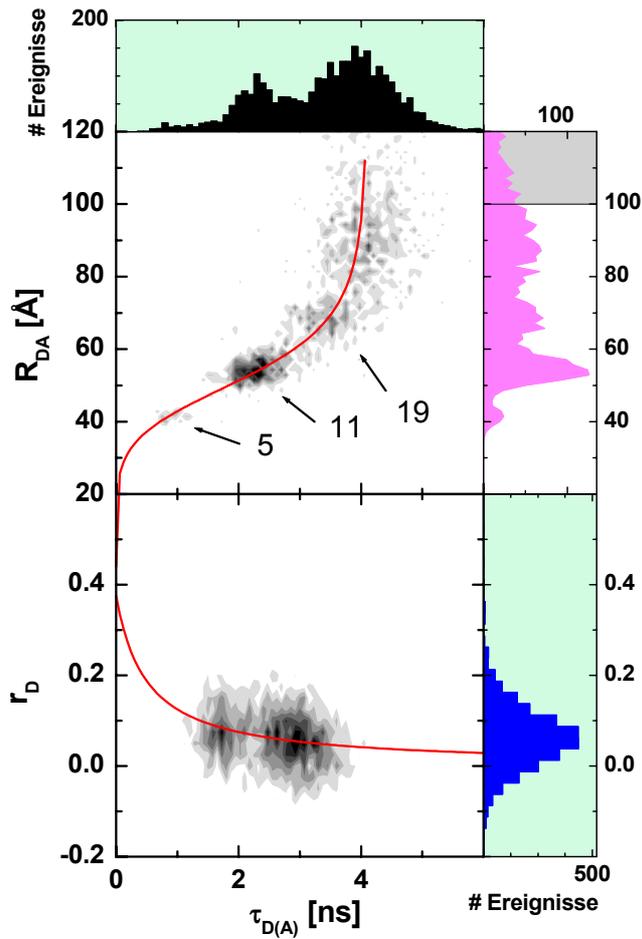


Abbildung 4-2: MFD-Einzel-molekülmessung vom Gemisch dreier Abstände Messung von Helices mit Interfluorophorabständen von 5, 11 und 19 Basenpaaren, dargestellt in 2D-Histogrammen von Interfluorophorabstand und Anisotropie gegen die Lebensdauer. Die durchgezogenen Linien stellen Gl. 3-3 (oben, mit $\tau_{D(0)}=4,1$ und $\phi_{FD}=0,8$) sowie die Perrin-Gleichung (Gl. 2-17, unten, mit $\rho=0,5$ ns) dar; jene beschreiben jeweils den Zusammenhang zwischen den aufgetragenen Parameter. Die grau unterlegte Fläche stellt die nicht auflösbaren Abstände dar. Korrekturparameter finden sich in Abbildung 1 im Anhang.

Die Ergebnisse der zwölf separat gemessenen Abstände in Form von Energietransfereffizienzen sind in Abbildung 4-3 zu sehen (■).

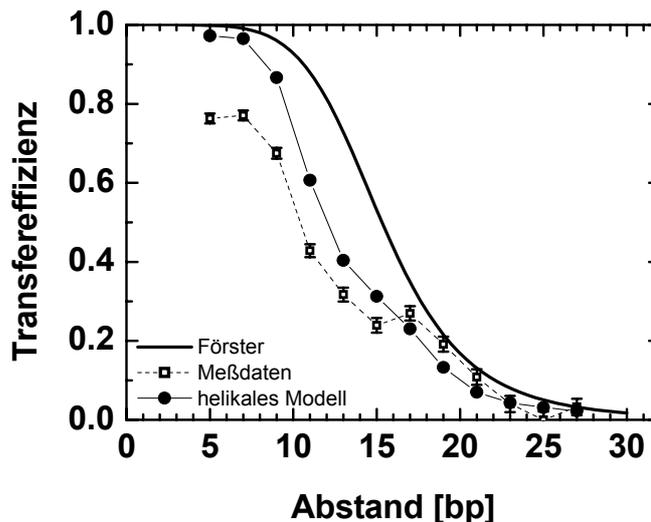


Abbildung 4-3: Veranschaulichung der Helizität der DNA anhand der MFD-Daten von zwölf Abständen Transfereffizienz der zwölf gemessenen Abstände (in Basenpaaren (bp)), bestimmt aus den Donorlebensdauern (■). Der Fehler wurde aus der normierten Standardabweichung von zehn hintereinander aufgenommenen Einzelmolekülmessungen bestimmt. Die Helizität zeigt sich im Vergleich mit dem Förstermodell (durchgezogene Linie) und dem helikalen DNA-Modell (●) auf. Werte finden sich im Anhang (Tabellen 5 und 7).

Dabei fällt auf, daß die Transfereffizienz nicht stetig mit steigender Anzahl an separierenden Basen fällt. Zum Vergleich dazu ist eine Kurve nach Förster (durchgezogene Linie) mit eingezeichnet, die aus einer linearen Abstandsmin- derung von 3,38 Å pro Base berechnet wurde. Es stellt sich in diesem Fall der erwartete sigmoidale Verlauf ein. Die experimentellen Daten zeigen hingegen eine deutliche Abweichung auf, die aus der Überlagerung mit einer weiteren Funktion resultiert: der Helizität der DNA. Die meisten anderen Arbeiten zu dem Thema nehmen für den Aufenthaltsort der Fluorophore ihre mittlere Position an, so daß für jede Anzahl an separierenden Basen ein definierter Abstand R_{bp} resultiert.

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{bp}^6} \quad (\text{Gl. 4-1})$$

Der Abstand selbst ist durch die Anzahl an separierenden Basen, der Geometrie der Helix und der Orientierung der Fluorophore relativ zu den Basen definiert (Clegg *et al.* 1993):

$$R_{bp} = f(n_{bp}) = \sqrt{(L + \Delta_{bp} \cdot z_{bp})^2 + r_A^2 + r_D^2 - 2r_A r_D \cdot \cos(\psi + \Delta_{bp} \phi_{bp})} \quad (\text{Gl. 4-2})$$

mit

L	axialer Versatz zwischen Donor und Akzeptor (6,17 Å)
Δ_{bp}	Anzahl an separierenden Basen
z_{bp}	Ganghöhe (3,38 Å)
r_A	Abstand der mittleren Position des Akzeptors von der Helixachse (12,47 Å)
r_D	Abstand der mittleren Position des Donors von der Helixachse (11,77 Å)
ψ	helikaler Versatz zwischen Donor und Akzeptor (89,8°)
ϕ_{bp}	Gangwinkel (36°)

Aus der Gleichung resultiert eine Überlagerung der Försterkurve mit einer sinusförmigen Funktion aufgrund des Wanderns der Fluorophore um die Helixachse der DNA. Die Werte der in Klammern aufgeführten relativen Fluorophorpositionen sind der im folgenden Kapitel aufgeführten Molekulardynamik-Simulation entnommen. Der Vergleich der experimentellen Daten mit der Försterkurve und dem helikalen Modell aus Abbildung 4-3 zieht eindeutig letzteres vor: die Daten zeigen Merkmale analog denen im helikalen Modell auf.

Nichtsdestotrotz gibt es trotz des analogen Verlaufs deutliche Unterschiede zwischen den beiden Effizienz-Kurven. Es läßt sich ein allgemeiner Trend feststellen, nach welchem die vorhergesagten Transfereffizienzen im helikalen Modell zu groß im Vergleich zu den experimentellen Daten sind, und zwar vor allem bei kleinen Abständen. Des weiteren ist der sinusförmige Verlauf bei den Meßdaten stärker

ausgeprägt. Insbesondere die Transfereffizienz im Abstand von 17 Basenpaaren vollführt einen starken Überschwinger. Folglich läßt sich daraus schließen, daß das helikale Modell einen zu stark vereinfachten Ansatz darstellt, denn es vernachlässigt die lokale Verteilung der Fluorophore und geht auch nicht auf feinere strukturelle Merkmale der DNA ein.

4.1.1.2 Betrachtung von Mittelungsregimes

Aufgrund der langen, flexiblen Linker, mit denen die Fluorophore an die DNA gebunden sind, befinden sich die Fluorophore nicht an einer diskreten Position, sondern sondieren den ihnen zur Verfügung stehenden Raum. Die langen Linker wiederum sind notwendig, da ein hoher Grad an Rotationsfreiheit erwünscht ist, welcher die Mittelung aller möglichen Orientierungen des Übergangsdipolmomentes erlaubt. Damit wird ein definierter Orientierungsfaktor mit einem Wert von $2/3$ erlangt (Dale *et al.* 1979; van der Meer 2002), was für die akurate Bestimmung von Abständen von hoher Bedeutung ist. Jedoch wird meist vernachlässigt, daß die langen, flexiblen Linker auch dazu führen, daß die Fluorophore eine hohe Reichweite haben und viele verschiedene Positionen einnehmen können. Dies führt weiterhin zu einer hohen Variabilität der Interfluorophorabstände. Jene sollte in die Berechnung des mittleren Abstandes mit einfließen.

Um den Effekt dieser Abstandsverteilung zu untersuchen, sind in der Gruppe von Prof. Grubmüller (Theoretische und computerunterstützte Biophysik, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) Molekulardynamik-Simulationen durchgeführt worden. Hierbei wird eine starke Wechselwirkung der Fluorophore mit der DNA, basierend auf den gemessenen Donoranisotropien und der Rotationskorrelationszeit von 0,5 ns (siehe Kapitel 4.1.1.1), ausgeschlossen. Eine starke Wechselwirkung des Akzeptors mit der DNA würde eine Löschung desselben zur Folge haben, wie sie bei den FRET-Messungen nicht sichtbar ist. Somit kann aus den Daten geschlossen werden, daß weder der Donor noch der Akzeptor wesentlich mit der DNA wechselwirken. Aus diesem Grunde sollte die Flexibilität der Fluorophore hauptsächlich durch eine sterische Hinderung eingeschränkt sein, was letztendlich in der Simulation betrachtet wird. An die DNA gebundene Wassermoleküle oder elektrostatische Abstoßung zwischen dem DNA-Rückgrat und den Fluorophoren (beide tragen negative Ladungen) können zu einer weiteren Einschränkung der Fluorophorpositionen führen, welche hier aber nicht berücksichtigt wird.

An dieser Stelle wird eine Obergrenze für die Fluorophorflexibilität durch die Ausführung von einfachen Hochtemperatur-Vakuum-Simulationen bestimmt, welche elektrostatische Wechselwirkungen außen vor läßt. Die DNA-Konformation ist durch harmonische Einschränkungen erhalten worden. Dies erlaubt ein extensives Abtasten des sterisch erlaubten Konfigurationsraumes des Farbstoffes. Es ist an dieser Stelle zu bemerken, daß nicht die Dynamik der Fluorophore untersucht wird, da diese aufgrund des fehlenden Lösungsmittels und der hohen Temperatur nicht korrekt beschrieben ist.

Abbildung 4-4 zeigt das Ergebnis der MD-Simulation für den Abstand von 21 Basenpaaren in Form von Wolken, die aus 5157 sterisch erlaubten Positionen der beiden Fluorophore Alexa488 und Cy5 resultieren. Jede Konformation wird durch die Position eines Referenzatoms repräsentiert, der Donor in hellgrau, der Akzeptor in schwarz. Die Referenzatome für Alexa488 und Cy5 sind dabei jeweils O7 und C27 (siehe chemische Strukturen im Angangskapitel „Fluorophore“). Die entsprechende mittlere Position für dieses FRET-Paar und für die restlichen Markierungspositionen wird durch große Kugeln dargestellt.

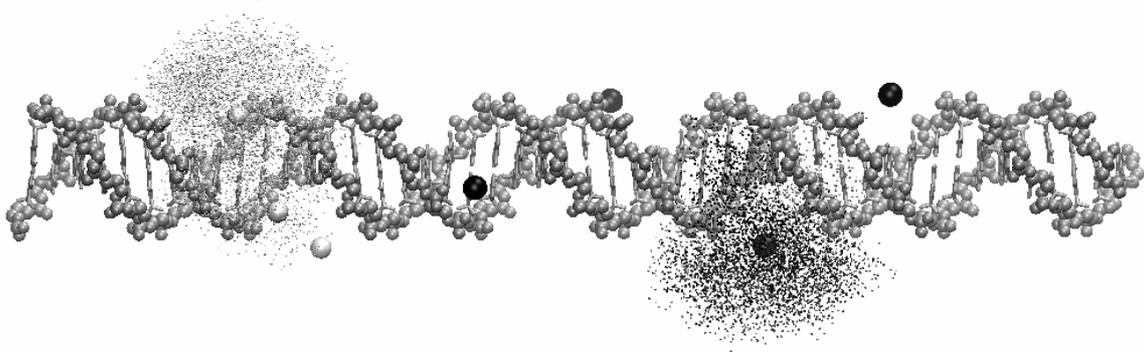


Abbildung 4-4: MD-Simulation von Fluorophoren an B-DNA Tertiärstruktur der untersuchten B-DNA und Verteilung des Donor- und Akzeptorfluorophors, jeweils in hellgrau und schwarz. Dargestellt sind je 5157 Positionen der Referenzatome (siehe Anhang) für den Abstand von 21 Basenpaaren. Die mittlere Position für alle Donoren und Akzeptoren ist durch je eine Kugel repräsentiert.

Die hier bestimmte Verteilung liefert die mittlere Position der Fluorophore und damit die Werte für die Berechnung des helikalen Modells (Gl. 4-2). Des Weiteren sind die Orientierungen der Übergansdipolmomente mit simuliert worden, und eine Berechnung der κ^2 -Werte zwischen den individuellen Positionen in den Wolken lieferte für alle Abstände einen Mittelwert nahe $2/3$, also eine isotrope Verteilung der Orientierungen der Fluorophore zueinander.

Mit der Mittelung der Positionen geht aber auch die Information über die Breite ihrer Verteilung verloren. Während der Abstand zwischen den Mittelpunkten der Donor- und Akzeptorwolke für einen Abstand von Null Basenpaaren gegen Null geht, ist das für den mittleren Abstand aller miteinander kombinierten Donor-Akzeptor-Abstände in den Wolken nicht der Fall. Dieser Effekt wurde bereits von Parkhurst und Parkhurst beschrieben (Parkhurst & Parkhurst 1995). Dies führt dazu, daß kleine Abstände unterschätzt werden.

Auf der anderen Seite ist die Transfereffizienz, und nicht der Abstand, der relevante physikalische Parameter, der gemittelt werden sollte. So beschreiben bereits B. Schuler und B.W. van der Meer (Schuler *et al.* 2005) unterschiedliche Wege, um die korrekte mittlere Effizienz zu beschreiben. Während beim dynamischen Mittelungsregime die Energietransferrate k_{FRET} aus dem mittleren Orientierungsfaktor κ^2 und R_{DA} ⁶ berechnet wird, werden bei statischen Regimes die Fluktuationen der physikalischen Parameter mit einbezogen. Bei diesen Mittelungen wird die Möglichkeit aufgeführt, entweder nur die Abstandsfluktuationen oder zusätzlich auch den individuellen Orientierungsfaktor mit in Betracht zu ziehen. Die Wahl des korrekten Mittelungsregimes zur Berechnung der Transfereffizienzen hängt von der Zeitskala der Fluorophorfluktuationen relativ zur Energietransferrate ab.

Die aus der MD-Simulation erhaltenen Daten über die lokale Verteilung der Fluorophore und der entsprechenden Orientierung des Übergangsdipolmomentes ermöglichen die Berechnung unterschiedlicher Mittelungen und den Vergleich mit den experimentellen Daten. An dieser Stelle soll die Mittelung der „schnellen Rotation“ und der „langsamen Diffusion“ vorgestellt werden. Beim Regime der „schnellen Rotation“ wird angenommen, daß die Abstände auf der Zeitskala der Fluoreszenzlebensdauer fix sind. Zusätzlich wird jedoch die Rotationsfreiheit der Fluorophore an jeder Position bewahrt, resultierend in einer Rotationskorrelationszeit viel schneller als die Lebensdauer. Dies rechtfertigt den Gebrauch eines mittleren Wertes von $2/3$ für κ^2 für jeden einzelnen Abstand. Im Falle des Regimes der „langsamen Diffusion“ (in der Literatur meist statisches Regime genannt) wird – wie es der Name schon sagt – eine langsame Bewegung der Fluorophore angenommen, so daß sich in der Zeitskala des Energietransfers weder der Abstand noch die Orientierung ändert.

Mathematisch lassen sich die beiden Fälle folgendermaßen ausdrücken:

Im allgemeinen kann die mittlere Energietransfereffizienz nach Gl. 4-3 berechnet werden.

$$\bar{E} = \int_0^1 N(E) \cdot E \cdot dE \quad (\text{Gl. 4-3})$$

Hier ist $N(E)$ die normierte Häufigkeit der Effizienz E . Mittels einer Variablentransformation kann daraus die Effizienz E in Abhängigkeit des Donor-Akzeptor-Abstandes R_{DA} für alle Abstandsverteilungen bestimmt werden. Anstatt jedoch die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Positionen aus einem abstrakten Modell zu berechnen, ermöglicht uns die Verteilung aus der MD-Simulation eine direkte Berechnung der Mittelwerte.

Die diskreten Fluorophorpositionen werden nun dazu herangezogen, die mittlere Effizienz als eine Summe aller modellierten Abstände zu berechnen.

$$\bar{E} = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^N E_n = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^N \frac{1}{1 + \left(\frac{R_n}{R_0(\kappa^2)} \right)^6} \quad (\text{Gl. 4-4})$$

Hierbei ist N die Anzahl der gemittelten Abstände R_n . Der Försterradius R_0 wird in Abhängigkeit vom Orientierungsfaktor dargestellt.

Im Falle der Mittelung der „schnellen Rotation“ wird ein Försterradius R_0 mit einem mittleren κ^2 -Wert von $2/3$ entsprechend Gl. 2-26 benutzt. Um die Mittelung der „langsamen Diffusion“ hingegen zu bestimmen, werden individuelle Försterradien mit dem für die Position geltenden Orientierungsfaktor herangezogen. Diese berechnen sich nach der folgenden Gleichung 4-5:

$$R_0(\kappa^2) = 9780 \cdot (\Phi_{FD} \kappa^2 n^{-4} J)^{1/6} = \left(\frac{3}{2} \kappa^2 \right)^{1/6} \cdot R_0(2/3) \quad (\text{Gl. 4-5})$$

Die resultierenden Energietransfereffizienzen der entsprechenden Mittelungsregimes, angewandt auf die aus der MD-Simulation resultierenden Fluorophorverteilung, sind in Abbildung 4-5 dargestellt.

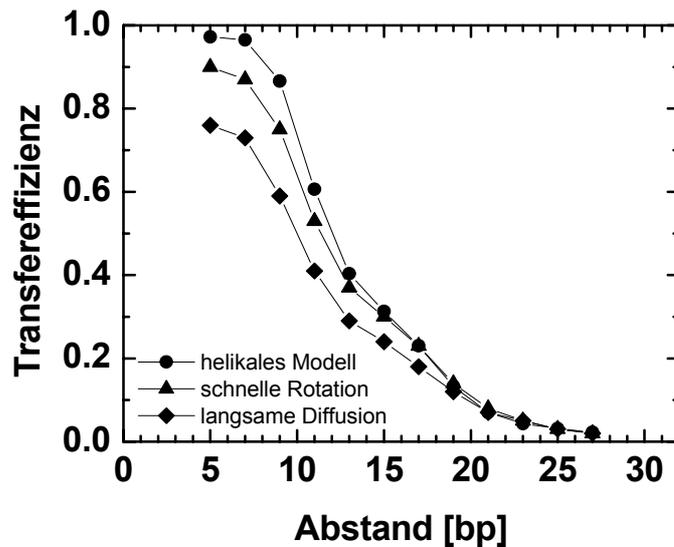


Abbildung 4-5: Auswirkung von Mittelungsregimes auf die Transfereffizienz Betrachtung der Mittelungen helikales Modell (dynamisch, Gl. 4-1 und 4-2), „schnelle Rotation“ (Gl. 4-4) und „langsame Diffusion“ (Gl. 4-5). Die Berechnungen basieren auf dem aus der MD-Simulation stammenden Datensatz. Ergebnisse in numerischer Form finden sich in Tabelle 7 im Anhang.

Dabei fällt auf, daß die mittlere Energietransfereffizienz mit zunehmend langsamerer Bewegung der Fluorophore – also für zunehmend statischere Regimes – abnimmt. Dies ist damit zu begründen, daß der Zusammenhang zwischen Abstand und Transfereffizienz nicht linear ist (Gl. 2-24) und Zustände mit besonders ungünstigen Orientierungsfaktoren ($\kappa^2 < 2/3$) am stärksten gewichtet werden.

4.1.1.3 Vergleich der Meßdaten mit Molekuldynamik-Simulationen

Der Vergleich der unterschiedlichen Mittelungen mit den experimentellen Daten zeigt auf, daß letztere sehr gut mit der Mittelung der „schnellen Rotation“ übereinstimmen (Vergleich Abbildung 4-3 (■) und 4-5 (▲)). Wie bereits die niedrige Anisotropie und die Rotationskorrelationszeit aufzeigen (Abbildung 4-2), demonstriert auch diese Übereinstimmung eine gute und schnelle Mittelung der Fluorophororientierung. Auch die Helizität der experimentellen Daten wird weiterhin gut durch das Mittel der „schnellen Rotation“ beschrieben. Lediglich die zwei kleinsten Abstände zeigen immer noch eine systematische Abweichung von den erwarteten Werten auf; die für sie bestimmte Transfereffizienz scheint zu niedrig. Aus diesem Grunde soll in einer gesonderten Untersuchung die Kreuzkorrelation zwischen den grünen und den roten Fluoreszenzkanälen untersucht werden (siehe Kapitel 4.1.1.5).

Die gute Übereinstimmung mit dem Regime der „schnellen Rotation“ bedeutet jedoch auch, daß die aus dem Experiment abgeleiteten Interfluorophorabstände falsch sind und weder den mittleren Abstand noch den Abstand zwischen den mittleren Positionen darstellen. Die meisten in der Literatur verwendeten Modelle beziehen sich aber auf die mittlere Position der Fluorophore. Um folglich die experimentellen Daten mit diesen Modellen vergleichen zu können, ist es notwendig, den hypothetischen Interfluorophorabstand für eine dynamische Mittelung wie im helikalen Modell zu bestimmen. Dazu ist im folgenden eine Korrektur für die Daten entwickelt worden, welche die Variabilität der Position mit einbezieht. Die in den Regimes helikales Modell und „schnelle Rotation“ bestimmten Transfereffizienzen sind verglichen und die Unterschiede in Form eines abstandsabhängigen Korrekturfaktors festgehalten worden. Dieser ist natürlich für die verwendeten Linker und Fluorophore spezifisch und kann nur beschränkt außerhalb des Systems DNA angewandt werden. Zur Bestimmung des Korrekturfaktors sind die Transfereffizienzen aus dem helikalen Modell gegen die der „schnellen Rotation“ für jeden Abstand aufgetragen und der Verlauf mit einem Polynom dritter Ordnung angepaßt worden (siehe Abbildung 4-6A). Die Berechnung liefert die folgenden Größen:

$$y = -1.1413 x^3 + 1.4695 x^2 + 0.6791 x + 0.0085 \quad (\text{Gl. 4-6})$$

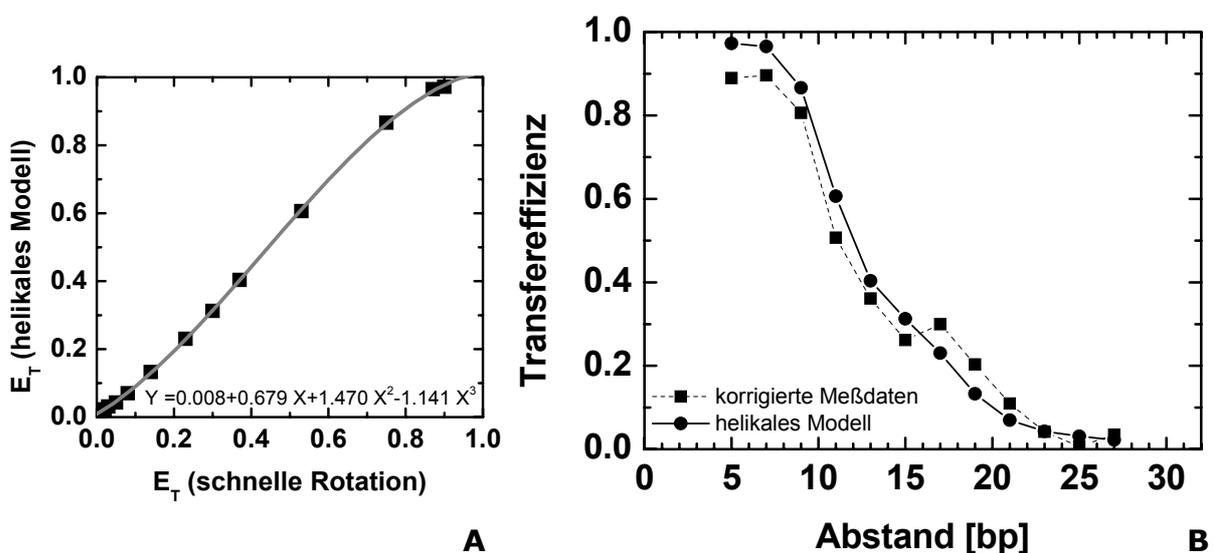


Abbildung 4-6: Korrektur der experimentellen Daten für „schnelle Rotation“ (A) Die in Abbildung 4-5 dargestellten berechneten Transfereffizienzen nach dem helikalen Modell und der „schnellen Rotation“ werden gegeneinander aufgetragen und eine Korrekturfunktion dritten Grades bestimmt. **(B)** Anwendung der Korrekturfunktion auf die experimentellen Daten und Vergleich mit dem helikalen Modell. Die korrigierten Meßdaten in numerischer Form finden sich in Tabelle 5.

Die Gleichung wird für eine Korrektur der experimentellen Daten herangezogen und letztere im folgenden mit dem helikalen Modell verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-6B aufgezeigt.

Die korrigierten Daten zeigen nun eine gute Übereinstimmung mit dem helikalen Modell der B-DNA Helix auf. Lediglich die bereits angesprochenen kleinsten Abstände von 5 und 7 Basenpaaren lassen auf zusätzliche Effekte schließen, welche die Effizienz weiter senken. Interessanterweise ist dies der Bereich, in dem die Fluorophore aufgrund der Länge der Linker in Kontakt treten können. Des Weiteren ist der Überschwinger bei dem Abstand von 17 Basenpaaren in dieser Darstellung weiterhin sichtbar. Er läßt sich nicht alleine auf die sinusförmige Überlagerung, die von der DNA-Helizität herrührt, zurückführen. Aus diesem Grunde soll im folgenden Kapitel der Einfluß der DNA-Konformation betrachtet werden.

4.1.1.4 Vergleich mit gekrümmten Helix-Modellen

Wie bereits in der Einleitung zu Oligonukleotiden aufgeführt worden ist, stellt die regelmäßige B-DNA Struktur lediglich einen Durchschnitt von sequenzabhängigen Konformationen dar. Diese Konformationen werden durch die vier Parameter *rise*, *twist*, *roll* und *tilt* zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basenpaaren determiniert (siehe Abbildung 1-1B). Die sequenzabhängige Struktur von DNA wurde intensiv untersucht und lieferte dabei unterschiedliche Modelle, die die Krümmung der DNA beschreiben (Goodsell & Dickerson 1994; Peck & Wang 1981; Sarai *et al.* 1988). Die Untersuchungen liefern die oben aufgeführten Parameter für jedes mögliche Basentriplett oder -quartett und ermöglichen damit die Generierung von individuellen DNA-Strukturen. Im folgenden werden drei solcher sequenzabhängiger Modelle zu Rate gezogen (Gabrielian & Pongor 1996; Goodsell & Dickerson 1994; Ulyanov & James 1995) um eine eventuelle Krümmung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sequenz aufzudecken. Dies geschieht mit der Hilfe des quelloffenen Programms DIAMOD, welches sequenzabhängige pdb-Strukturen von DNAs generiert. Den Satz an Parametern für die Orientierung der Basen für die unterschiedlichen Modelle liefert das Programm mit. Die Anwendung der drei Modelle von Interesse – im Folgenden Goodsell, Gabrielian und Ulyanov genannt – auf die hier verwendete DNA-Sequenz resultiert trotz leicht unterschiedlicher Parameter für die lokalen Knicke in einer

insgesamt sehr ähnlichen Krümmung. Die Überlagerung der B-DNA mit der auf den Goodsell-Parametern basierten DNA ist in Abbildung 4-7 dargestellt.

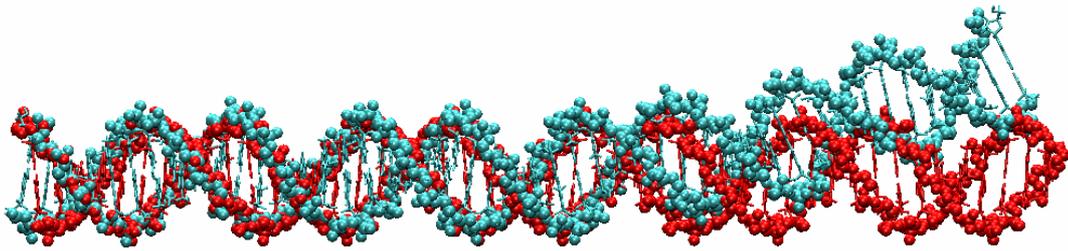


Abbildung 4-7: Überlagerung von B-DNA mit gekrümmtem Modell Die gekrümmte Struktur wurde im Programm DIAMOD mit den Parametern von Goodsell und Dickerson (Goodsell & Dickerson 1994) generiert.

Um nun die gekrümmten Modellstrukturen mit den experimentellen Daten vergleichen zu können, sind die aus der MD-Simulation stammenden mittleren Position der Fluorophore relativ zu den Basen an die Goodsell-, Gabrielian- und Ulyanov-Struktur modelliert worden. Die hypothetischen Transfereffizienzen eines FRET-Übertrages zwischen den resultierenden Positionen wurden nach Förster (Gl. 2-24) berechnet, resultierend in einem helikalen Modell der gekrümmten Strukturen. Die Auftragung jener zusammen mit den entsprechend der „schnellen Rotation“ korrigierten Meßdaten ist in Abbildung 4-8 zu sehen.

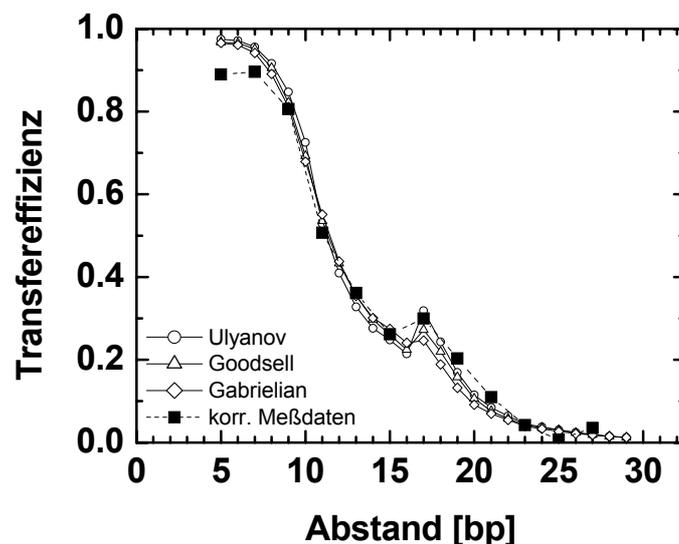


Abbildung 4-8: Gekrümmte Helix-Modelle der DNA Vergleich der entsprechend der „schnellen Rotation“ korrigierten experimentellen Daten (Gl. 4-6) mit den helikalen Modellen von Goodsell, Gabrielian und Ulyanov. Werte in numerischer Form finden sich in Tabelle 6.

Die teilweise sprunghafte Änderung in der Effizienz, die vor allem im Abstand von 17 Basenpaaren zu sehen ist, ist in der verschachtelten Generierung der Abstände begründet (siehe Abbildung 4-1): durch die Benutzung von drei unterschiedlichen Donor- und vier Akzeptorpositionen wird je nach Abstand ein anderer Helixabschnitt betrachtet.

Die Übereinstimmung der Meßdaten, welche vorher vom Modell der „schnellen Rotation“ auf das helikale Modell umgerechnet worden sind, mit den gekrümmten Helix-Modellen ist im Bereich von 9 bis 27 Basenpaaren exzellent. Sowohl der Verlauf der Transfereffizienz mit seinen für die verwendete DNA-Sequenz charakteristischen Überschwingern bei 17 Basenpaaren als auch die absoluten Werte stimmen überein. Letzteres ist ein Hinweis darauf, daß die Annahme der „schnellen Rotation“ für die Dynamik der Fluorophore korrekt ist; die Fluorophore suchen den ihnen zur Verfügung stehenden Raum relativ zur FRET-Transferrate nur langsam ab, rotieren dabei aber schnell um den Linker, was zu einer isotropen Verteilung der Dipolorientierungen führt. Auf die Abweichung der beiden kleinsten Abstände soll im nächsten Kapitel eingegangen werden.

4.1.1.5 Speziessensitive Korrelationsanalyse

Um potentielle Dynamiken zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluorophor zu detektieren, sind die Fluktuationen der Intensitätssignale mittels Korrelationsanalysen untersucht worden. Dazu sind die Photonen der FRET-aktiven Spezies zusammengefaßt sowie die Autokorrelationen und Kreuzkorrelationen der grünen und roten Fluoreszenz berechnet worden.

Die resultierenden Kreuzkorrelationskurven der sich in einem Abstand von fünf bis 25 Basenpaaren befindenden Donor- und Akzeptorfarbstoffe sind in Abbildung 4-9 aufgezeigt, wobei ihre Amplituden bei 51 μ s normiert worden sind. Dem Graphen ist deutlich zu entnehmen, daß der Triplettanteil, welcher sich auf der Zeitskala von wenigen μ s abspielt, mit sinkender Anzahl an separierenden Basen rapide fällt, um schließlich bei den beiden kleinsten Abständen in einen steigenden Korrelationsterm umzukehren. Obwohl nach Gl. 2-48b erwartet wird, daß der Triplett-Anteil bei steigender FRET-Effizienz fällt, sollte er nie vollständig verschwinden. Aus diesem Grunde liegt die Vermutung nahe, daß ein Antikorrelationsterm die Triplettkorrelationsfunktion überlagert, was bei den kleineren Abständen so stark zum Tragen kommt, daß die Antikorrelation selbst sichtbar wird.

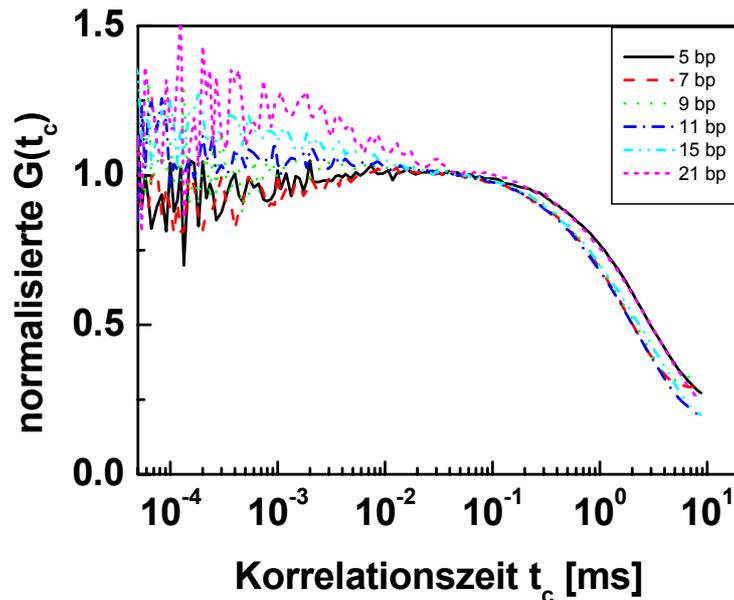


Abbildung 4-9: Kreuzkorrelationskurven ausgewählter DNA-Konstrukte Die untersuchten DNAs sind der Legende zu entnehmen. Die Diffusionszeit ist aufgrund des Schneidens der Bursts (siehe Kapitel 3.2.3.2) schlecht aufgelöst.

Um eine Quantifizierung des Antikorrelationstermes vornehmen zu können, ist eine Isolierung der Antikorrelation vom Triplettanteil notwendig. Denn unglücklicherweise spielt sich die Antikorrelation auf derselben Zeitskala wie der Triplett-Zerfall des Donor-Fluorophors Alexa488 ab, wie dem Vergleich der Korrelationskurven in Abbildung 4-9 zu entnehmen ist. Um folglich den Antikorrelationsanteil in der Kurve bestimmen zu können, müssen zuerst die genauen Werte für Amplitude und Lebensdauer des Triplettzustandes bestimmt werden.

Der direkteste Weg wäre dabei die Bestimmung des Triplett-Anteiles aus der Autokorrelation der grünen Signale. Jedoch besitzen gerade die Moleküle von Interesse – nämlich die mit einem kleinen Interfluorophorabstand und hoher FRET-Effizienz – nur ein schwaches grünes Signal, so daß die Autokorrelationskurve verrauscht und das Anpassen der Terme schwierig ist. Aus diesem Grunde mußte eine andere Herangehensweise gewählt werden, und die Theorie, welche die Herleitung des Triplett-Termes beschreibt, herangezogen werden (siehe Kapitel 2.4.2). Mit deren Hilfe ist es möglich, die Amplitude und Lebensdauer des Triplett-Zustandes in Abhängigkeit von der FRET-Effizienz, basierend auf den Werten von Alexa488 in Abwesenheit des Akzeptors, zu bestimmen. Letztere wurden aus Ensemble-FCS-Messungen von nur Donor-tragenden Proben bestimmt. Nach Gleichungen 2-48a und b ist die Rate und die Amplitude des Triplett-Termes abhängig von der Absorptionsrate (k_{Abs}), der Rate für den

Übergang zwischen dem ersten angeregten (S_1) und dem Triplett-Zustand (k_{ISC}), der Triplett- (k_T) und der Fluoreszenzzerfallsrate (k_0) des Fluorophors. Unter der Annahme, daß die ersten drei unabhängig von FRET sind, wurden sie aus nur Donor-tragenden Messungen bestimmt. Dabei läßt sich der Wert für die Absorptionsrate nach Gl. 2-3 allein mit Hilfe der Absorptionsfläche für Alexa488 σ ($2,72 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$), der konfokalen Anregungsleistungsdichte I_0 (25 kW cm^{-2}) sowie der inversen Energie des Anregungsphotons γ beschreiben. Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 496 \text{ nm}$ resultiert k_{Abs} in $8,47 \cdot 10^6 \text{ 1/s}$. Die Rate für den Übergang zwischen dem S_1 und dem Triplett-Zustand sowie die Triplett-Zerfallsrate folgen aus den Gleichungen 2-48a und b sowie der Donorzerfallsrate. Letztere beträgt $2,5 \cdot 10^8 \text{ 1/s}$, welche aus der Fluoreszenzlebensdauer der nur Donor-tragenden Proben von 4 ns resultiert. Das Ergebnis beträgt jeweils $k_{ISC} = 9,70 \cdot 10^5 \text{ 1/s}$ und $k_T = 1,27 \cdot 10^5 \text{ 1/s}$. Zur Berechnung der individuellen Triplett-Terme in Abhängigkeit von der FRET-Effizienz wird die Fluoreszenzzerfallsrate k_0 – der reziproke Wert der Fluoreszenzzerfallsszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors – herangezogen. k_0 wird aus den individuellen Einzelmolekülmessungen ermittelt. Die Ergebnisse der theoretischen Triplett-Komponenten sind in Tabelle 4-2 aufgelistet.

Tabelle 4-2: Triplett- und Antikorrelationsanteile der FCS von Helixmessungen Die Berechnung geschah nach Gl. 2-3 sowie 2-48a und b. Näheres siehe Text.

Abstand [bp]	$\tau_{D(A)}$	Theoretische Triplettkomponenten		Isolierte Anti- korrelationskomponenten	
		τ_T [μs]	Amplitude	τ_A [μs]	Amplitude
5	0,8	7,5	0,05	4,0	0,14
7	0,8	7,5	0,05	4,3	0,16
9	1,3	7,3	0,08	4,7	0,10
11	2,2	6,9	0,12	7,6	0,10
15	3,0	6,6	0,16	--	0
25	3,6	6,4	0,18	--	0
Alexa488	4	6,3	0,20		

Dabei läßt sich wie bereits vorgegriffen beobachten, daß der Triplett-Anteil mit steigender Transfereffizienz abnimmt. Gleichzeitig steigt die Triplett-Zeit.

Nun ist ein abermaliges Anpassen der FCS-Kurve mit dem in Tabelle 4-2 aufgeführten, festgehaltenem Tripletterm möglich, um so den Antikorrelationsterm zu isolieren. Auch diese Werte finden sich in Tabelle 4-2. Aus ihnen ist zu entnehmen, daß der Prozeß, der zu der Antikorrelation führt, mindestens bis zu einem Donor-Akzeptor-Abstand von 15 Basenpaaren bestehen bleibt. Die mittlere Dauer der Antikorrelation liegt im Bereich zwischen 4 und 8 μs . Eine wirklich stark ausgeprägte Antikorrelation mit hohen Amplituden ist nur bei den Abständen von 5 und 7 Basenpaaren (Abstand der Anknüpfungspunkte in der Helix: 17,4 bzw. 23,3 Å) zu sehen, bei denen direkter Kontakt zwischen den Fluorophoren möglich ist. Dies resultiert aus den langen Linkern (etwa 23 Å für Cy5 und 20 Å für Alexa488), welche die Fluorophore mit den modifizierten Thyminen der DNA-Stränge verbinden. Es ist also denkbar, daß die Antikorrelation aus dem Kontakt der beiden Fluorophore resultiert. Andere photochemische Ursachen sind aber nicht auszuschließen.

4.1.2 Geknickte Helix

Die ungewöhnlich hohe Genauigkeit der im Kapitel 4.1.1 vorgestellten FRET-Abstandsmessungen an einer DNA-Helix mit Hilfe von Korrekturen bezüglich Mittelungsregimes und sequenzabhängigen Helixkrümmungen soll nun in der Analyse von geknickten DNA-Strukturen angewendet werden. Dabei sollen Knicke, die durch das Einbauen von herausstehenden Adenosinen in die DNA eingeführt worden sind – im folgenden auch *A-bulge* genannt, mittels FRET MFD-Einzelmolekülmessungen detailliert untersucht werden. Hierbei wird dieselbe Sequenz wie bereits in Kapitel 4.1.1 herangezogen. Zusätzlich werden zwischen den Basen 27 und 28 des Donorstranges ein, drei oder fünf Adenine eingeschoben. Abermals werden zwölf Abstände betrachtet. Da die drei kleinsten Abstände durch den erwarteten Knick weiter reduziert würden und diese Abstände bereits bei der geraden Helix Probleme in der Abstandsbestimmung bereitet haben, werden sie bei der folgenden Untersuchung weggelassen. Als Ersatz dafür werden im Bereich mittlerer Effizienz durch eine unterschiedliche Anordnung der Akzeptoren drei neue Abstände eingeführt. Damit sind im Bereich von 17 bis 23 Basenpaaren alle Abstände kontinuierlich abgedeckt. In Abbildung 4-10 sind die Sequenz und die Markierungspositionen zu sehen.



Abbildung 4-10: Primärstruktur der geknickten DNA-Helix mit Markierungspositionen

Drei verschiedene Donorstränge wurden mit vier unterschiedlichen Akzeptorsträngen kombiniert, resultierend in zwölf unterschiedlichen Interfluorophorabständen. Die Markierungspositionen sind weiß markiert.

Es ist zu der Struktur zu bemerken, daß alle Donoren auf der einen Seite des Knicks und alle Akzeptoren auf der anderen Seite sitzen.

4.1.2.1 Experimentelle FRET-Daten mit 1, 3 und 5 Adenosinbasen

Jeweils zwölf unterschiedliche Abstände sind für die Konstrukte mit ein, drei und fünf ungepaarten Adenosinen mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen untersucht worden. Das Anfitten der Lebensdauer geschah abermals unter Einbeziehung von Nachpulsen im Bereich von 5%. Die Parameter für die Korrektur der Intensitätsdaten sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Die Transfereffizienzen sind sowohl aus der aus der Lebensdauer als auch den Fluoreszenzintensitätsverhältnissen berechnet und verglichen worden, um Löschung von Donor oder Akzeptor ausschließen zu können. Die kompletten MFD-Daten in graphischer sowie numerischer Form finden sich im Anhang (Tabellen 8 – 10, Abbildungen 2 – 4). Die in den Graphen a, c und e der Abbildung 4-11 gezeigten Transfereffizienzen für die drei verschiedenen Knicke sind abermals aus den Lebensdauern bestimmt worden. Dabei fällt für alle drei Knicke auf, daß die Energietransfereffizienz nicht kontinuierlich mit steigender Anzahl an separierenden Basenpaaren fällt. Dies kann dadurch erklärt werden, daß der Akzeptor an Position 32 (siehe Abbildung 4-10) im Gegensatz zum Akzeptor 26 im Inneren des Knickes liegt und somit durch den Knick dem Donorarm näher kommt.

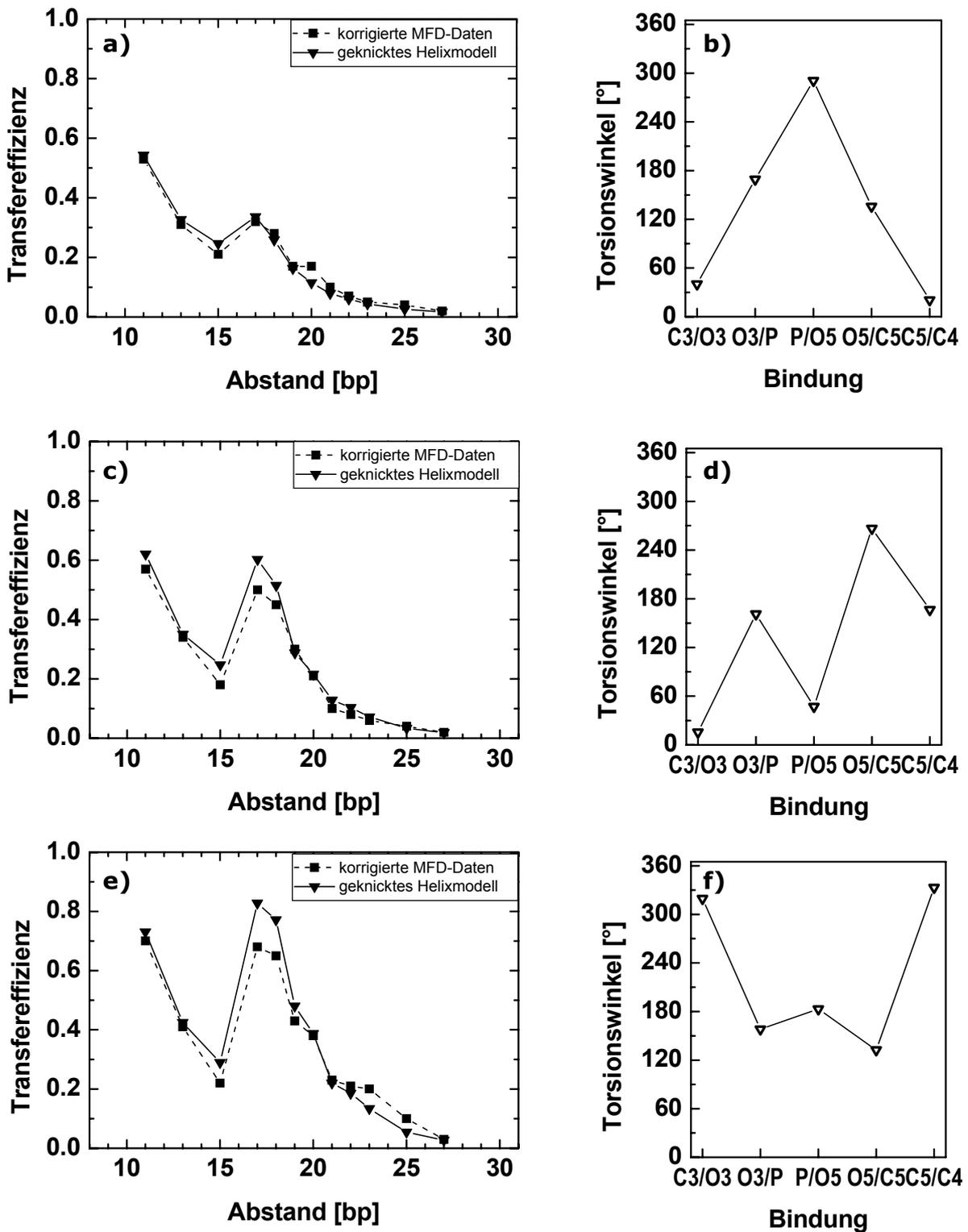


Abbildung 4-11: MFD-Daten von geknickten DNAs und Torsionswinkel im Knick Von oben nach unten sind jeweils die Daten der geknickten DNAs mit 1, 3 und 5 Adenosinen dargestellt. Links (Graph a, c und e) sind die aus den Einzelmolekül-FRET-Messungen hergeleiteten, entsprechend der „schnellen Rotation“ korrigierten Transfereffizienzen in Abhängigkeit von dem Basenabstand aufgetragen (■). Die Anpassung des Knicks geschah durch die Variation von fünf Torsionswinkeln in dem den herausstehenden Basen gegenüberliegenden Strang (Graph b, d und f). Die aus dem Fit resultierenden Transfereffizienzen sind in den Graphen a, c und e (▲) dargestellt (Näheres siehe Text). Die Daten finden sich in tabellarischer Form im Anhang (Tabellen 8 – 10).

4.1.2.2 Bestimmung des Knickwinkels

Um aus den gemessenen Abständen strukturelle Informationen zu erhalten, ist das Modell einer geknickten DNA-Helix an die Meßergebnisse angepaßt worden. Dabei sind die Annahmen getroffen worden, daß alle Basen bis auf die ungepaarten Adenine gepaart sind und die Hybridisierung nahe dem *A-bulge* nicht fluktuiert. Der Knick sollte auf die Bindungen gegenüber den herausstehenden Adeninen beschränkt sein, also auf die Bindungen im Zuckerphosphatrückgrat zwischen Base 21 und 22 des Akzeptorstranges. Die Konformation des Knickes wird folglich von der Rotation um die fünf freien Bindungen an dieser Stelle im Rückgrat determiniert: C3'-O3'(ϵ), O3'-P(ζ), P-O5'(α), O5'-C5'(β), C5'-C4'(γ). Die Definition dieser Winkel findet sich in Abbildung 1-2. Durch eine zufällige Variation dieser Winkel lassen sich alle unter den gemachten Annahmen sterisch erlaubten Konformationen austesten und mit den Meßwerten vergleichen. Die Modellierung basiert auf Vektoren, die in der folgenden Abbildung 4-12 vorgestellt werden.

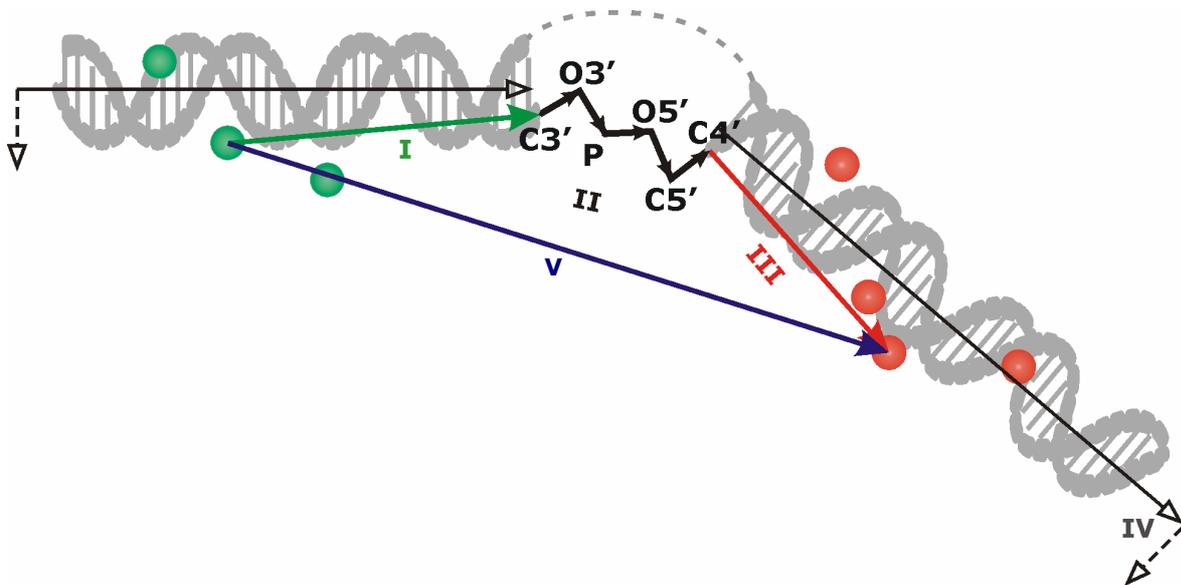


Abbildung 4-12: Vektorielle Parameter zur Anpassung des Knicks Darstellung der DNA mit den Donoren (grün) und Akzeptoren (rot). Zwischen den beiden Helixarmen sind in schwarz die fünf Bindungen skizziert, die den Knick definieren. Sie liegen zwischen Base 21 und 22 des Akzeptorstranges. Die herausstehenden Adenine sind durch die gestrichelte Linie angedeutet. Für das Anpassen des Knickwinkels werden folgende Vektoren benötigt: **I**: {C3'} – {Donor}; **II**: Bindungen C3'-O3', O3'-P, P-O5', O5'-C5', C5'-C4'; **III**: {Akzeptor} – {C4'}; **IV**: {Akzeptorhelixachse} – {C4'}; **V**: {Akzeptor} – {Donor}.

Die Modellierung der Torsionswinkel ist mit dem Datenverarbeitungsprogramm Igor von Prof. F. Oesterhelt (Institut für Molekulare Physikalische Chemie, HHU, Düsseldorf) durchgeführt worden. Zuerst wurde der Abstandsvektor zwischen dem mittleren Aufenthaltsort des Donorfluorophors und dem C3' bzw. dem mittleren Aufenthaltsort des Akzeptorfluorophors und dem C4' Atom des geknickten Rückgrates für ein Modell der gekrümmten DNA (Goodsell) bestimmt. Zusammen mit den fünf Bindungsvektoren des Rückgrates lassen sich daraus für jede Kombination der fünf Torsionswinkel die Abstände zwischen den mittleren Donor- und Akzeptorpositionen bestimmen. Zum Auffinden der Konformationen mit der kleinsten mittleren quadratischen Abweichung von den Meßdaten sind in 11 Wiederholungen jeweils unter 100.000 zufälligen Rückgrat-Konformationen die besten 1000 ausgewählt und innerhalb immer kleiner werdender Bereiche (30°, 25°, 20°, 10°, 7°, 5°, 3°, 2°, 1.5°, 1°, 0.5°) je 100 mal zufällig variiert worden. Das Schema der Modellierung findet sich in Abbildung 4-13.

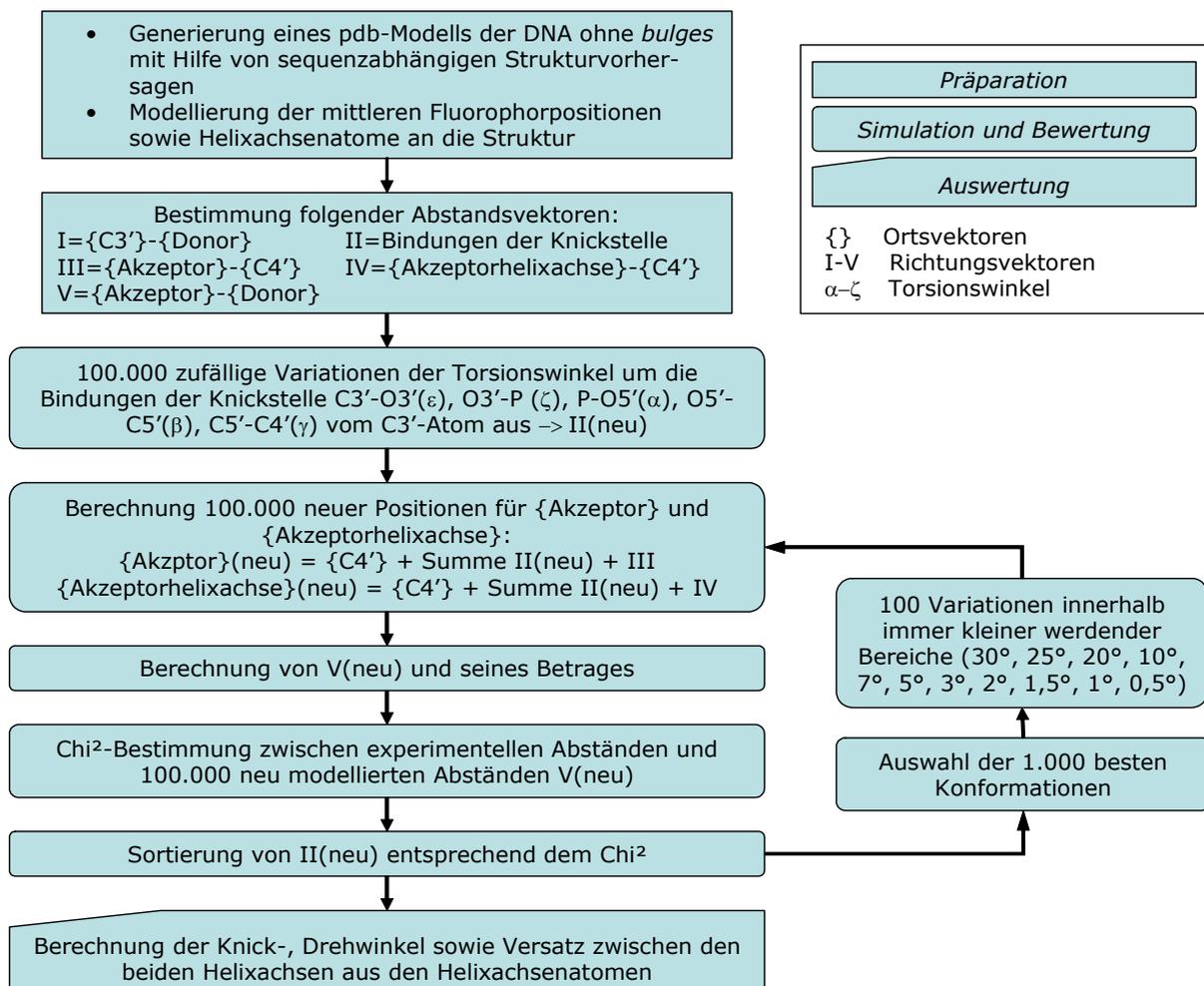


Abbildung 4-13: Flußschema zur Modellierung der Knickwinkel Die graphische Darstellung der Abstandsvektoren findet sich in Abbildung 4-12.

Der beste Fit ist für den Knick mit drei Adenosinen berechnet worden, mit einer Summe der quadratischen Abweichung im Bereich von 0,70-1,49 für die besten 100.000 Anpassungen. Für den Knick mit einem Adenosin lag der Fehler zwischen 1,58 und 2,17, für fünf Adenosine bei 7,07-8,03. Der Vergleich der angepaßten Abstände mit den korrigierten Meßdaten ist in Abbildung 4-11 in den Graphen a, c und e in Form der Transfereffizienz zu sehen. Die dazugehörigen Torsionswinkel sind in b, d und f rechts daneben graphisch dargestellt, die tabellarische Aufführung findet sich in Tabelle 4-3 im Vergleich mit der gekrümmten Helix.

Tabelle 4-3: Torsionswinkel im Bereich des Knicks der gekrümmten und geknickten DNAs

Torsionswinkel des Phosphatrückgrats zwischen Base 21 und 22 im Akzeptorstrang für die gekrümmte DNA und für die 1A-, 3A- und 5A-*bulge* Helices aus dem besten Fit. Die Definition der Winkel findet sich in Abbildung 1-2.

	<i>gekrümmte DNA</i>	<i>1A</i>	<i>3A</i>	<i>5A</i>
ε [°]	-150,2	40,2	15,6	-41,5
ζ [°]	-150,9	-169,3	-161,2	158,2
α [°]	-27	-69,3	47,2	-176,9
β [°]	136,3	135,8	-93,4	132,5
γ [°]	31,2	20,7	166,6	-26,9

Die Berechnung des Ortes der mittleren Fluorophorposition ermöglicht die Konstruktion von pdb-Dateien. Dazu sind die Helixarme der Goodsell-DNA inklusive der Fluorophormittelpunkte mit den Donor- und Akzeptorpositionen aus den Igor-Berechnungen überlagert worden (Programm DS Viewer Pro). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5-5A bis C aufgezeigt. Dabei sieht man, daß die beiden Helixarme sich nicht gegenseitig behindern und damit eine erlaubte Konformation darstellen.

Da die Torsionswinkel wenig anschaulich sind und lediglich zur Anpassung der experimentellen Daten an eine geknickte Helix herangezogen wurden, liegt eine Bestimmung der Dreh- und Knickwinkel der beiden Helixachsen nahe. Zusätzlich soll der Versatz zwischen den Achsen berechnet werden. Dazu sind für die beiden Abschnitte der gekrümmten Helix (Trennung der Segmente zwischen Base 21 und 22 des Akzeptorstranges) die Helixachsen bestimmt worden, und zwar indem gerade Helices mit den gekrümmten mit der kleinsten Abweichung überlagert worden sind (V.M.D. 1.8.3). Ein Schema der berechneten Winkel und des

Abstandes findet sich in Abbildung 4-14. Aus den Achsenvektoren (durchgezogene Pfeile, Z) und den Positionsvektoren (gestrichelte Pfeile, X), die jeweils durch Atome auf und neben der Achse festgelegt worden sind, sind der Knickwinkel φ , der Drehwinkel der Donorhelix θ sowie Drehwinkel der Akzeptorhelix ψ berechnet worden. Zudem ist der Versatz d zwischen den Helixachsen kalkuliert worden. Auch diese Werte sind im Programm Igor mit Hilfe der folgenden Gleichungen 4-7 – 4-11 bestimmt worden.

$$\varphi = \arccos \frac{\vec{Z}_D \cdot \vec{Z}_A}{|\vec{Z}_D| \cdot |\vec{Z}_A|} \quad (\text{Gl. 4-7}) \quad \theta = \arccos \left(\vec{e}_d \cdot \frac{\vec{X}_D}{|\vec{X}_D|} \right) - 90^\circ \quad (\text{Gl. 4-8})$$

$$\psi = \arccos \left(\vec{e}_d \cdot \frac{\vec{X}_A}{|\vec{X}_A|} \right) + 90^\circ + \theta \quad (\text{Gl. 4-9}) \quad d = \vec{e}_d \cdot (\vec{Z}_D - \vec{Z}_A) \quad (\text{Gl. 4-10})$$

mit dem Vektor senkrecht zu beiden Helixachsen $\vec{e}_d = \frac{\vec{Z}_D \times \vec{Z}_A}{|\vec{Z}_D \times \vec{Z}_A|}$ (Gl. 4-11)

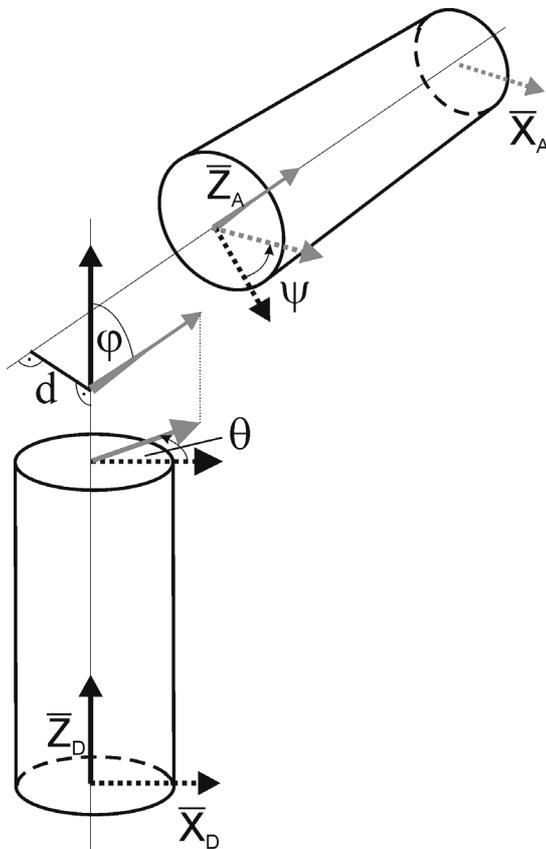


Abbildung 4-14: Modell zur Veranschaulichung der knickbeschreibenden Parameter φ stellt den Knickwinkel zwischen den beiden Helixachsen dar. θ und ψ repräsentieren jeweils die Drehrichtung des Donor- bzw. Akzeptorarmes. Der Achsenversatz wird durch d beschrieben. Die Parameter lassen sich aus den Vektoren Z und X der Donor und der Akzeptorhelixachse mittels Gl. 4-7 – 4-11 berechnen.

In Tabelle 4-4 sind die den Knick beschreibenden Parameter für die gekrümmte Helix nach Goodsell sowie die drei geknickten DNAs mit einem, drei

und fünf Adenosinen für den jeweils besten Fit dargestellt. Aus der Krümmung der Helix nach Goodsell resultiert ein Grundwinkel von 16° zwischen den Achsen.

Tabelle 4-4: Parameter zur Beschreibung der gekrümmten und geknickten DNAs Die Werte ergeben sich aus den Orientierungen der beiden Helixarme zueinander, wie sie aus der Modellierung der Torsionwinkel im Knick für die gekrümmte Goodsell-Helix sowie die Helices mit 1,3 und 5 ungepaarten Adenosinen (1A, 3A und 5A) resultieren (Tabelle 4-3). Die zugehörige graphische Darstellung der Parameter findet sich in Abbildung 4-14.

	<i>gekrümmte DNA</i>	<i>1A</i>	<i>3A</i>	<i>5A</i>
Knickwinkel φ [$^\circ$]	16	13	36	73
Drehwinkel Donorhelix θ [$^\circ$]	90	57	88	77
Drehwinkel Akzeptorhelix ψ [$^\circ$]	26	-16	3	-79
Versatz der Achse d [\AA]	1,33	1,32	1,05	9,9

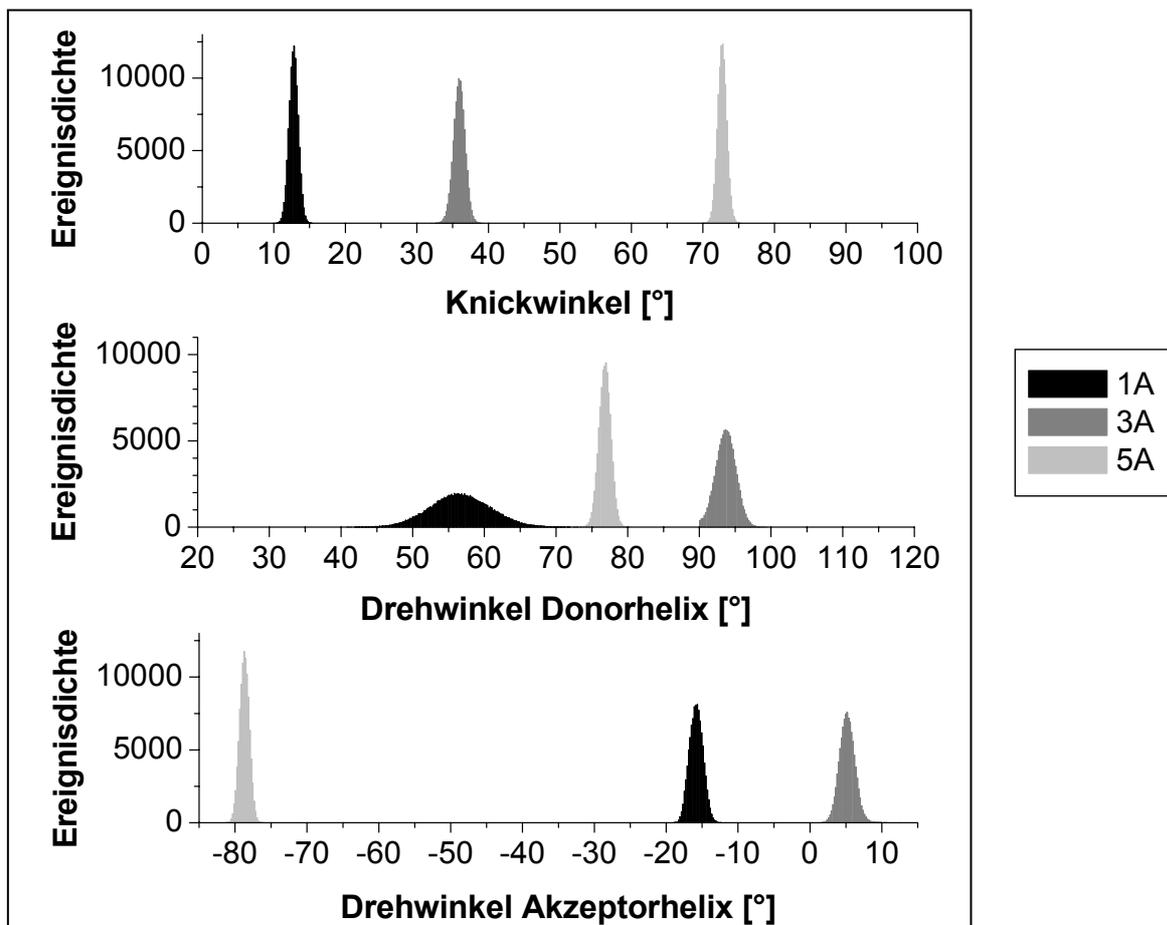


Abbildung 4-15: Verteilung der Knick- und Drehwinkel für geknickte DNAs Häufigkeits-histogramme der relativen Winkel der Donor- und Akzeptorhelix zueinander (siehe Abbildung 4-13) aus dem Ensemble der 10.000 besten Modellierungen für die Torsionswinkel in den 1A-, 3A- und 5A-*bulge* Helices bei einem Binning von $0,2^\circ$.

Obwohl die besten 10.000 Kombinationen an Torsionswinkeln mehrere Minima – also unterschiedliche Kombinationen – für die drei Knickanpassungen liefern, resultieren jene in fast identischen Orientierungen der beiden Helixarme zueinander (Abbildung 4-15). Dies bedeutet folglich, daß sich mittels der MFD-FRET-Messungen dreidimensionale Strukturen eindeutig bestimmen lassen. Bei der Betrachtung der Winkel fällt auf, daß sich der Knickwinkel durch die Einführung von einer einzelnen Base im Vergleich zur gekrümmten Helix (13° zu 16°) kaum ändert. Dies wird auch in den Energietransfereffizienzen widergespiegelt. Lediglich die Drehung der Helices ändert sich. Erst das Einsetzen von zwei weiteren Adenosinen führt zu einer Zunahme des Knickwinkels um etwa 20° , im nächsten Schritt dann um weitere 40° . Die Drehwinkel der Helices weisen keinen solchen stetigen Verlauf auf, sondern sind für die unterschiedlichen Knicke andersartig ausgeprägt.

4.2 RNA-Helix

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu biologischen Fragestellungen befassen sich mit Spleißosomen und den darin eingebauten Oligonucleotiden. Da in diesem Fall für die Strukturbestimmung RNA fluoreszenzmarkiert worden ist, soll an dieser Stelle eine ähnliche Charakterisierung, wie sie an DNA vorgenommen wurde, für RNA aufgestellt werden. Die Abstandskalibrierung, die abermals aus der Gegenüberstellung von experimentellen und Simulationsdaten hergeleitet werden soll, dient als Referenz für die Messungen an der U4/U6 snRNA *three-way junction*. Zusätzlich kann die Auswirkung von zwei leicht unterschiedlichen Probemolekülen sowie verschiedenen langen Linkern auf die Transfereffizienz miteinander verglichen werden.

Analog der DNA-Helix wurden RNAs derselben Sequenz erworben und an jeweils drei Donor- und Akzeptorpositionen pro Strang markiert, resultierend in neun unterschiedlichen Interfluorophorabständen (siehe Abbildung 4-16). An die Positionen der Fluorophormarkierung wurden 5-Aminoallyl-Uracile eingebaut, was insgesamt im Vergleich zu der DNA-Markierung (C6-5-Aminoallyl-Thymidin) zu einer kürzeren Fluorophorverknüpfung führt (siehe Abbildung 3-1).

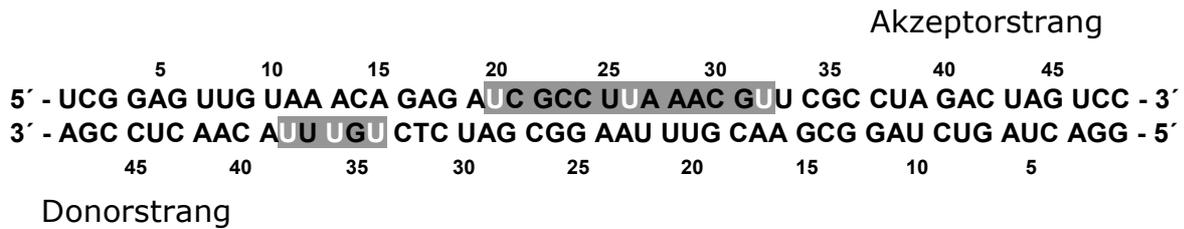


Abbildung 4-16: Primärstruktur der RNA-Helix mit Markierungspositionen Drei verschiedene Donorstränge wurden mit drei Akzeptorsträngen kombiniert, resultierend in neun unterschiedlichen Interfluorophorabständen. Die Markierungspositionen sind weiß gekennzeichnet.

4.2.1.1 Experimentelle FRET-Daten

Es sind Einzelmolekül-MFD-Messungen der neun Proben im Puffer A+ bei einer Donorkonzentration von etwa 0,1 nM durchgeführt worden. Die Korrekturparameter für die Intensitäten in den grünen und roten Kanälen sind bestimmt (grüner Hintergrund $B_G = 2,9$ kHz, roter Hintergrund $B_R = 0,9$ kHz, grüne Detektionseffizienz $g_G = 0,36$, rote Detektionseffizienz $g_R = 0,53$ und spektraler Crosstalk $\alpha = 0,019$) und zur Berechnung der Energietransfereffizienzen und Abstände aus den experimentellen Daten herangezogen worden. Die in den nachstehenden Graphen aufgezeigten Energietransfereffizienzen resultieren aus den Intensitätsmessungen. Der komplette Datensatz ist im Anhang zu finden (Tabelle 11 und Abbildung 5). Der Fit der TCSPC-Daten wurde unter Einbeziehung von Nachpulsen, die 5% des Signals ausmachen, berechnet. Die Quantenausbeuten des jeweils an die RNA gebundenen Donors ($\Phi_{FD} = 0,8$) bzw. Akzeptors ($\Phi_{FA} = 0,48$) sind separat in TCSPC-Lebensdauer-messungen im Ensemble bestimmt worden (Kapitel 3.2.2.1). Die zugehörigen Lebensdauerdaten finden sich im Anhang in den Tabellen 15 und 16.

In Abbildung 4-17 ist eine MFD-Einzelmolekülmessung an RNA am Beispiel des Interfluorophorabstandes von 13 Basenpaaren aufgezeigt. Wie bereits bei der DNA geschieht die Darstellung in 2D-Histogrammen. Dem oberen Histogramm läßt sich der experimentelle Interfluorophorabstand nach Förster (Gl. 2-61) entnehmen. Die Probe ist gut hybridisiert und zeigt kaum nur Donor-markierte Einzelstränge auf. Durch Anpassen der Perrin-Gleichung an die Daten im Anisotropie-vs.-Fluoreszenzlebensdauer-Plot läßt sich die Rotationskorrelationszeit des Donors von 2,4 ns bestimmen. Diese deutet auf eine eingeschränkte Beweglichkeit des Fluorophors hin und wird durch die hohe Anisotropie des Donors bestätigt (siehe Abbildung 4-17 unten).

nungswinkel der Fluorophororientierung von Alexa488 den Maximalwert von 90° besitzt, was einer vollständig eingeschränkten translativen Bewegung der Achse entspricht. Die Rotation um die Achse kann dabei aber weiterhin frei sein.

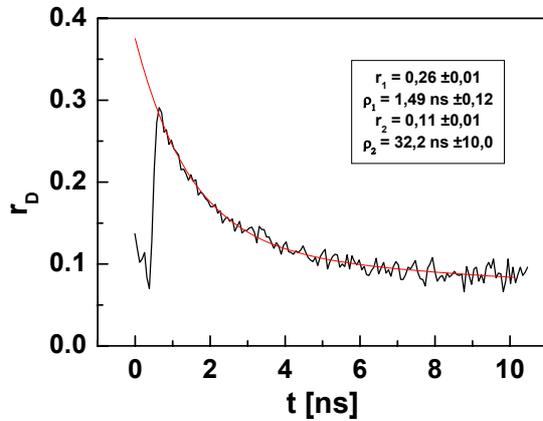


Abbildung 4-18: Zeitaufgelöste Anisotropie des Donors Speziesselektive Anisotropie-Analyse von MFD-Daten des Donors an Position 36 im Doppelstrang. Die Anpassung geschah biexponentiell nach Gl. 2-15.

Da diese Einschränkung der Fluorophorbeweglichkeit sich auf den Orientierungsfaktor und damit auch auf die bestimmten Abstände auswirken, ist ebenfalls der Akzeptor hinsichtlich seines Anisotropieabklingungsverhaltens untersucht worden. Dazu ist eine TCSPC-Anisotropiemessung des Akzeptors an Position 20 im RNA-Doppelstrang im Ensemble bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm und einer Emission von 660 nm durchgeführt worden. Das biexponentielle Anfitzen der parallelen und senkrechten Intensitätskomponente ergibt die folgenden Werte:

Tabelle 4-5: Fitparameter des Anisotropiezerfalls von Cy5 an RNA Bezogen aus TCSPC-Ensemblemessungen.

ρ_1	r_1	ρ_2	r_2	r_∞	r_f
0,279 ns	0,087	1,51 ns	0,143	0,179	0,409

Für das Cy5 resultiert die Anisotropiemessung aufgrund der zwei Fluoreszenzlebensdauern in einen komplexen Zerfall, so daß auch zwei Rotationskorrelationszeiten angepaßt werden müssen. Die mittlere Lebensdauer von Cy5 ist wiederum so kurz (etwa 1,2 ns), daß keine globale Rotationszeit bestimmt werden kann. Aus diesem Grunde sollen an dieser Stelle nur die Anisotropieamplituden betrachtet werden. Im Fall von Cy5 liegt das Übergangsdipolmoment parallel zur Kegelachse, so daß eine höhere Residualanisotropie als $\frac{1}{4} \cdot r_f$ erreicht werden kann. Bei einem r_∞ von 0,179 besitzt der Kegel der Fluorophordiffusion einen maximalen Öffnungswinkel von $40,5^\circ$. Die Beweglichkeit des Akzeptors ist also nicht ganz so stark eingeschränkt wie die des Donors, was bei dem längeren Linker auch zu erwarten ist.

Aus diesen Werten läßt sich nun auch der Fehler im κ^2 -Wert abschätzen. Hierzu wird zu allererst der Depolarisationsfaktor für beide Fluorophore nach Gleichung 2-33 bestimmt (0,54 für Donor und 0,67 für Akzeptor), um schließlich die Grenzwerte von κ^2 berechnen zu können. Der Minimalwert für κ^2 liegt bei 0,26, der maximale bei 2,20. Diese Abweichung von dem dynamischen Mittelwert von 2/3 geht mit der sechsen Wurzel in die Abstandsbestimmung ein. Die Werte können im weiteren Verlauf der Arbeit bei der Vermessung der U4/U6 snRNA *three-way junction* zur Fehlerabschätzung der Abstände herangezogen werden.

Analog der DNA-Ergebnisdarstellung sind in der folgenden Abbildung 4-19 die MFD-Meßdaten zusammen mit dem Förster- und dem dynamischen Helixmodell aufgetragen, wobei die starke Abweichung ersterer von den beiden Modellen auffällt. Dies gilt sowohl für die absoluten Werte als auch vor allem für die Form der Kurve.

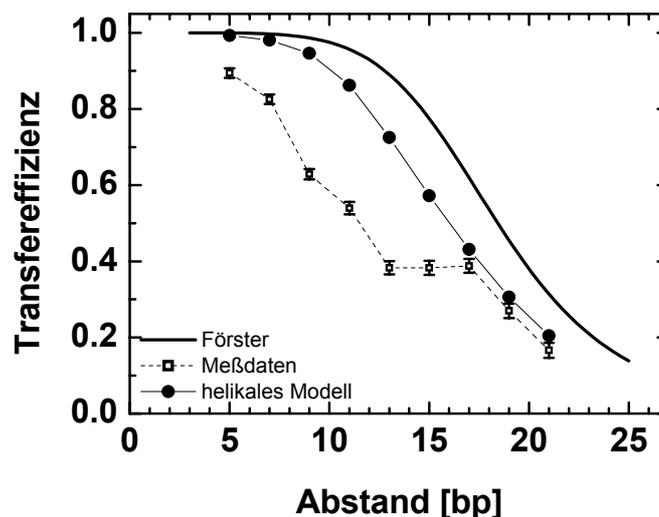


Abbildung 4-19: MFD-Daten von neun Abständen an RNA Darstellung der neun gemessenen Abstände in Form der Transfereffizienz, bestimmt aus den Donorlebensdauern (■). Der Fehler wurde aus der normierten Standardabweichung von zehn hintereinander aufgenommenen Einzelmolekülmessungen bestimmt. Die Helizität zeigt sich im Vergleich mit dem Förstermodell (durchgezogene Linie) und dem helikalen Modell (●) auf. Die Werte in tabellarischer Form finden sich im Anhang (Tabellen 11 und 12).

Ferner ist zu sehen, daß der Verlauf des Helixmodells, welches abermals nach Gl. 4-2 mit Hilfe der aus MD-Simulationen hergeleiteten mittleren Fluorophorpositionen berechnet wurde, sehr nah am einfachen Förstermodell ist. Da letzteres auf einem linearen Anstieg des Abstandes mit der Anzahl der Basenpaare basiert, und zudem das helikale Modell der RNA-Simulation die für die DNA-Simulation charakteristische sinusförmige Überlagerung nicht aufweist, folgt der Schluß, daß

im Falle der RNA-Untersuchungen die Helizität aufgrund einer zu großen Nähe der Fluorophore zur Helixachse in der MD-Simulation nicht sichtbar wird. Dies zeigt sich im mittleren Abstand der Fluorophore von der Achse, welcher für den Donor 7,1 Å und den Akzeptor 8,5 Å beträgt.

Da das helikale Modell mit den aus der MD-Simulation stammenden Fluorophorpositionen die experimentellen Daten nur schlecht widerspiegelt, soll im folgenden näher auf die Mittelungsregimes und die Fluorophorverteilung eingegangen werden.

4.2.1.2 Betrachtung von Mittelungsregimes

Die A-RNA stellt mit ihrer tiefen und engen großen Grube (engl. *major groove*) eine stark unterschiedliche Umgebung für die Anbindung des Fluorophors als die B-DNA dar, die ihrerseits eine breite und flache großen Grube besitzt. Zudem ist im Falle der RNA-Messungen die Linkerlänge um eine C6-Einheit reduziert, was den dem Fluorophor zur Verfügung stehenden Raum reduziert. All dies deutet auf eine stärker eingeschränkte Beweglichkeit der Donors und des Akzeptors an der RNA relativ zur DNA hin. Die Ausführungen zu den Mittelungsregimes der MD-simulierten Daten für die DNA haben den Einfluß einer langsamen Diffusionsbewegung auf die Energietransfereffizienzen aufgezeigt. Da die Ergebnisse nicht direkt für die RNA übernommen werden können, ist auch hier eine MD-Simulation der Fluorophore vonnöten. Die Bedingungen der Simulation sind dieselben wie bei der DNA, d.h. es werden lediglich die Fluorophore inklusive der Linker Fluktuationen unterworfen, die RNA-Konformation selbst wird durch harmonische Einschränkungen erhalten. Die Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren und der Helix sind abermals durch Ausbildung von Van-der-Waals-Potentialen reduziert. Es wird wieder auf die Einbeziehung von Lösungsmittelmolekülen sowie elektrostatischen Wechselwirkungen verzichtet.

Analog den Berechnungen für die unterschiedlichen Mittelungsregimes aus der Fluorophoraufenthaltsverteilung für die DNA werden auch die Simulationsdaten der RNA dazu herangezogen, neben dem helikalen Modell zusätzlich die Modelle der „schnellen Rotation“ sowie der „langsamen Diffusion“ zu berechnen (siehe Kapitel 4.1.1.2). Dazu werden Transfereffizienzen aus den 10,000 simulierten Positionen sowie den jeweiligen Orientierungen des Übergangsdipolmomentes mit Hilfe der Gleichungen 4-4 und 4-5 gemittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-20 dargestellt. Im Vergleich zu den Berechnungen für die B-DNA

Helix fällt auf, daß der Unterschied zwischen dem helikalen Modell und dem Modell der „schnellen Rotation“ – welches eine langsame Diffusion des Fluorophors in der Wolke bei einer schnellen Rotation um die Linkerachse voraussetzt – bei den A-RNA-Proben nicht so groß ausfällt. Dies ist auf die kleineren Wolken der Fluorophorverteilung sowohl des Donors als auch des Akzeptors zurückzuführen, welche aus den kürzeren Linkern resultieren. Dies führt zu kleineren Schwankungen in den Abständen und damit auch in der Energietransfereffizienz, so daß die unterschiedlich gewichteten Mittelungen nicht so stark voneinander abweichen.

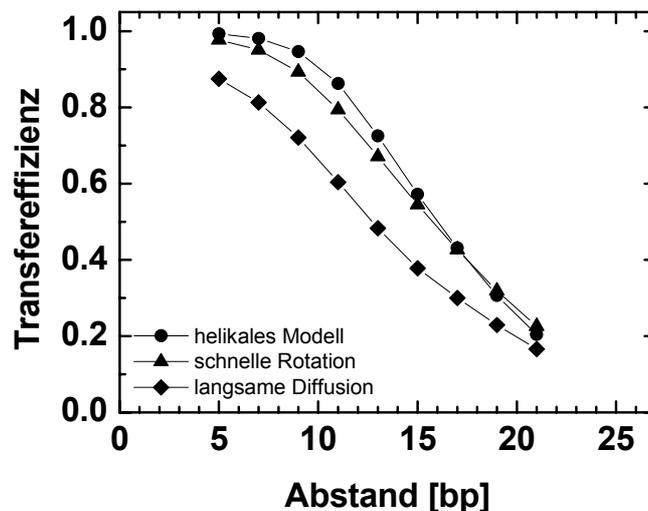


Abbildung 4-20: Auswirkung von Mittelungsregimes auf die Transfereffizienz Betrachtung der Mittelungen helikales Modell (dynamisch) (Gl. 4-1), „schnelle Rotation“ (Gl. 4-4) und „langsame Diffusion“ (Gl. 4-5). Die Berechnungen basieren auf dem Datensatz aus der MD-Simulation. Werte in tabellarischer Form finden sich im Anhang (Tabelle 12).

Erst die Einbeziehung von den individuellen Orientierungen der Dipolmomente, wie das bei dem Modell der „langsamen Diffusion“ der Fall ist, reduziert die Transfereffizienzen deutlich. Dies ist auf die stärkere Gewichtung von kleinen κ^2 -Werten zurückzuführen.

4.2.1.3 Vergleich der Meßdaten mit Molekulardynamik-Simulationen

Wie der Abbildung 4-19 zu entnehmen ist, sind die experimentell bestimmten Energietransfereffizienzen der RNA-Untersuchung viel niedriger als die des helikalen Modells. Daraus läßt sich auf eine im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer langsame Fluorophorrotation sowie -diffusion schließen, da wie im vorhergehenden Kapitel erörtert das Modell der „schnellen Rotation“ im Falle der hier vorliegenden RNA-Proben sich kaum von dem helikalen Modell unterscheidet.

Lediglich das statische Modell ist imstande, die niedrigen Transfereffizienzen zu erklären. Die relativ zur Transferrate langsame lokale Bewegung der Fluorophore ist bereits in der Messung der Rotationskorrelationszeit aus dem Anisotropiezerfall demonstriert worden. Mit 1,5 ns liegt sie deutlich über dem Wert von 0,4 ns für das an der B-DNA angebundene Alexa488. Des weiteren deutet die hohe Residualanisotropie von 0,179 des Akzeptors Cy5 auf eine eingeschränkte Beweglichkeit hin. Damit ist die Übereinstimmung der Größenordnung der experimentellen Daten (■ in Abbildung 4-19) mit der statischen Mittelung der „langsamen Diffusion“ (◆ in Abbildung 4-20) leicht einsichtlich. Der Energietransferverlauf in Abhängigkeit von der Anzahl an separierenden Basenpaaren ist aber weiterhin – wie bereits im Vergleich mit dem helikalen Modell konstatiert – sehr unterschiedlich; die MD-Simulation beschreibt in keiner Weise die in den experimentellen Daten sichtbaren Überschwinger der Transfereffizienzen bei 15 und 17 Basenpaaren.

In Anbetracht der experimentellen Hinweise auf eine eingeschränkte Beweglichkeit der Fluorophore aus den zeitaufgelösten Anisotropiemessungen, sollen die Mittelungen mit einer begrenzten Auswahl an Fluorophorpositionen wiederholt berechnet werden. Dazu wurden zuallererst die aus den MD-Simulationen stammenden Fluorophorwolken auf eine engere Verteilung reduziert. Eine Kugel mit einem Durchmesser von 0,9 Å ist in die Wolken der Referenzatome (siehe Anhang) plziert und als Schablone zum Ausschneiden einer Subpopulation benutzt worden. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-21 zu sehen.

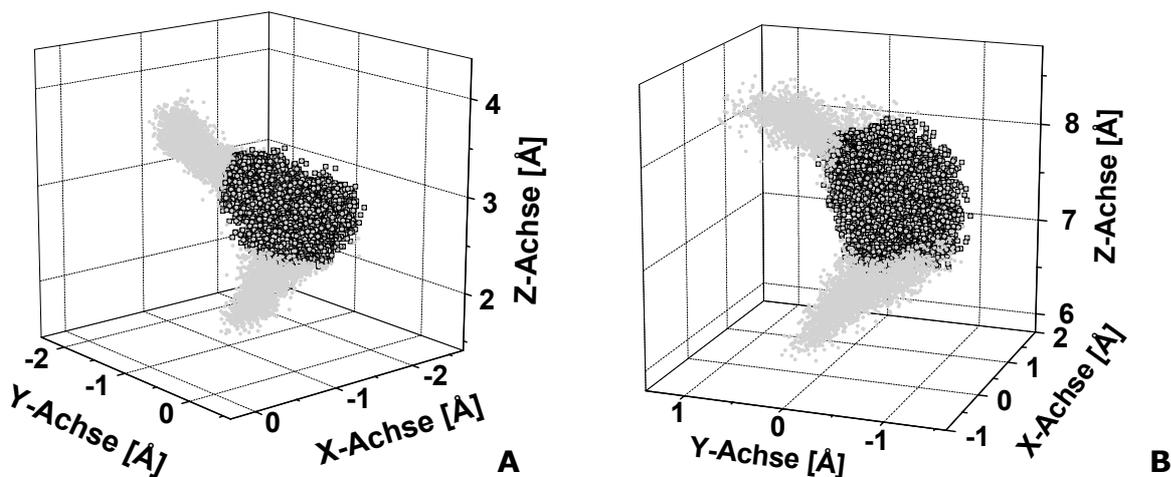


Abbildung 4-21: Auswahl einer Subpopulation aus modellierter Fluorophorverteilung Eine Kugel mit einem Durchmesser von 0,9 Å wurde in die über die MD-Simulation berechneten Wolken des Donor- (A) und Akzeptorreferenzatoms (B) (grau) plziert und als Schnittmuster benutzt. Die Auswahl der Fluorophorpositionen (inkl. der jeweiligen Dipolorientierung) ist in schwarz dargestellt.

An dieser Stelle soll kurz auf die Form der Fluorophorwolke aufmerksam gemacht werden. In beiden Fällen – dem des Donors und des Akzeptors – ist die Verteilung sichelförmig. Dies ist auf die bereits erwähnte enge und tiefe große Grube der A-RNA zurückzuführen, in der die Fluorophore aufgrund der kurzen Linker gefangen sind. Im Vergleich dazu ist die Form der an der B-DNA modellierten Fluorophorwolken nahezu kugelsymmetrisch (siehe Abbildung 4-4): die Fluorophore können aufgrund der langen Linker und der breiten, flachen großen Grube der B-DNA einen viel größeren Raum einnehmen. Der Einfluß der Linkerlänge ist auch innerhalb der RNA-Untersuchungen zu sehen: die Verteilung ist im Falle des Akzeptors, der über einen längeren Linker angebunden ist, größer und weniger dicht gepackt als im Falle des Donors (vergleiche Graph B und A in Abbildung 4-21).

In Abbildung 4-22 sind die Ergebnisse der Anwendung der drei in dieser Arbeit betrachteten Mittelungsregimes auf die in Abbildung 4-21 definierten Subpopulationen der Fluorophorverteilung aufgezeigt. Zum Vergleich sind sogleich auch die Meßdaten aufgeführt. Es fällt auf, daß der Verlauf der Transfereffizienzen im Gegensatz zu den aus den vollständigen Fluorophorwolken berechneten Werten zusätzliche zum sigmoidalen Verlauf eine helixinduzierte Sinusüberlagerung aufzeigt. Diese Änderung führt von der Tendenz in Richtung der experimentellen Daten.

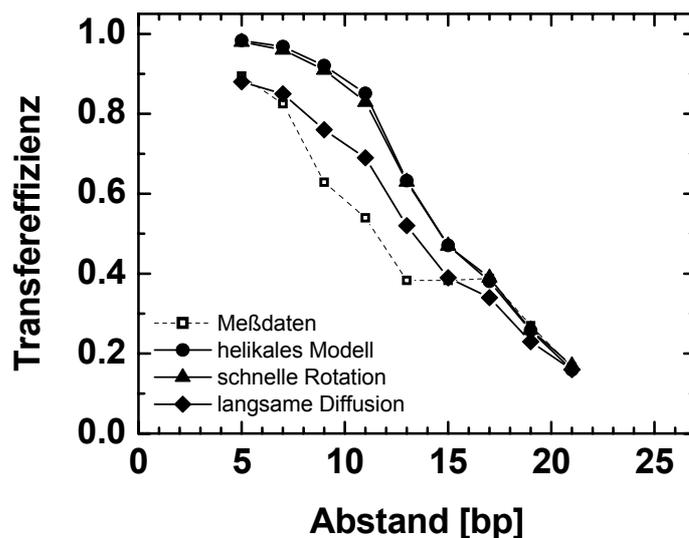


Abbildung 4-22: Anwendung der Mittelungsregimes auf die ausgeschnittene Fluorophorwolke Die Auswahl der Subpopulation ist in Abbildung 4-21 dargestellt. Gleichzeitiger Vergleich mit Meßdaten aus Abbildung 4-19. Werte in tabellarischer Form finden sich im Anhang (Tabelle 13).

Das Auswählen der Subpopulation führt zu einer zu kleineren Wolken und damit zu schwächeren Fluktuationen im Abstand, was sich in dem noch stärker dezimierten Unterschied zwischen dem helikalen Modell und der „schnellen Rotation“ niederschlägt. Auch der Unterschied zu dem statischen Modell der „langsamen Diffusion“ wird kleiner. Zum anderen führt das Vernachlässigen der beiden Enden der Sichel dazu, daß der Schwerpunkt der Fluorophorverteilung weiter außen liegt. So ist der mittlere Abstand der Fluorophore zur Helixachse von 7,1 Å im Falle des Donors und 8,5 Å im Falle des Akzeptors auf jeweils 9,4 Å gestiegen. Dies wird in der sinusförmigen Überlagerung mit dem sigmoidalen Abfall der Transfereffizienz widergespiegelt. Der Vergleich mit den Meßdaten deutet insgesamt darauf hin, daß die Fluorophore nicht nur allein wegen rein sterischen Hinderungen durch die RNA in ihrer Bewegung eingeschränkt sind, wie das in der MD-Simulation angenommen wird. Weitere die rotations- und translationsdiffusionsbegrenzende Einflüsse spielen im Falle der RNA-Proben offensichtlich eine Rolle. Eine noch stärker eingeschränkte Auswahl der Fluorophore (Kugeldurchmesser von 0,6 Å) hat jedoch zu keiner zusätzlichen Anpassung der Modelle an die Meßdaten geführt (Daten nicht aufgeführt).

Ein Grund für den weiterhin bestehenden Unterschied zwischen den experimentellen Daten und der MD-Simulation ist das noch zu starke Abtasten aller möglichen Dipolorientierungen auch in der eingeschränkten Wolke. Dies wird in der sehr niedrigen Residualanisotropie r_∞ , wie sie aus den Orientierungen der Dipolmomente in der Wolke mittels Gl. 2-33 und 2-34 berechnet wurde, widergespiegelt. Sie beträgt für den Donor 0,0022 und für den Akzeptor 0,0003 und liegt damit weit unterhalb den experimentell bestimmten Werten von jeweils 0,11 und 0,179. Dies zeigt auf, daß der Rotationsfreiraum auch durch die Auswahl der Subpopulation nicht weit genug eingeschränkt wird, um den experimentellen Bedingungen zu genügen. Um dies zu erreichen, wären wohl eine Einbeziehung der elektrostatischen Abstoßung und die Berücksichtigung von an die RNA gebundenem Wasser bei der Simulation der Fluorophorpositionen vonnöten. Die Weiterentwicklung der MD-Simulation liegt jedoch außerhalb des Rahmens dieser Arbeit. Eine Betrachtung der Beweglichkeit des Fluorophors liefert jedoch das *wobbling-in-a-cone*-Modell, auf welches nun im folgenden Kapitel eingegangen werden soll.

4.2.1.4 Anpassung eines wobbling-in-a-cone-Modells an die Meßdaten

Wie die Ergebnisse der zeitaufgelösten Anisotropiezerfallsmessungen gezeigt haben, sind sowohl Donor als auch Akzeptor in ihrer lokalen Rotationsfreiheit eingeschränkt. Eine Theorie, die den Einfluß der Bewegung des Farbstoffs auf die Anisotropie und in einer Erweiterung auf das κ^2 betrachtet, ist das *wobbling-in-a-cone*-Modell (Kapitel 2.2.3.1). Damit steht ein theoretisches Modell zur Verfügung, welches eine eventuelle Einschränkung der Fluorophorbeweglichkeit und damit einhergehend der Orientierung in Betracht zieht. Durch die Variation des Öffnungswinkels des Kegels, in welchem sich die beiden Fluorophore – Donor und Akzeptor – entlang der großen Grube der RNA bewegen, soll eine Vorhersage über die Transfereffizienzen von FRET-Messungen an A-RNA bei einer statischen Mittelung getroffen werden. Die Berechnung ist freundlicherweise von Dr. Stanislav Kalinin (AG Seidel, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt worden. Bei der Simulation sind 100.000 Positionen des an einen Linker gebundenen und sich im Kegel bewegenden Fluorophors berechnet worden (Modell siehe Abbildung 2-2). Dabei wird vorausgesetzt, daß die Dipolorientierung des Donors senkrecht und die des Akzeptors parallel zur Linkerachse ist. Um den Einfluß der großen Grube auf die Verteilung mit einzubeziehen, ist der Verankerungspunkt der Kegelspitze entlang der Helixwindung der A-RNA (Tabelle 1-1) im Bereich von 0,6 bp variiert worden ($\equiv 0,11\pi$). Die statisch gemittelte Transfereffizienz beinhaltet damit sowohl die Variation des Abstandes als auch der Orientierung und kann entsprechend mit Hilfe von Gl. 4-5 berechnet werden. Der beste Fit, welcher aus einem Öffnungswinkel von $107,5^\circ$ für die Donorbewegung (entspricht einem θ_{min} von $72,5^\circ$ im *wobbling-in-the-cone*-Modell) und von $85,9^\circ$ für die Akzeptorbewegung bei einer Linkerlänge von jeweils 8 Å und 16 Å resultiert, ist in Abbildung 4-23 (●) zu sehen. Der Verlauf der Transfereffizienz in Abhängigkeit vom Abstand in Basenpaaren ähnelt der Mittelung der „langsamen Diffusion“ aus den MD-Daten. Insgesamt sind die Effizienzen aber vor allem im Bereich der kleinen und mittleren Abstände niedriger, was aus dem großen minimalen Öffnungswinkel für die Orientierung der Donordipolmomente von $72,5^\circ$ resultiert. Letzterer spiegelt die schwach ausgeprägte Mittelung der Orientierungen des Donorfluorophors Alexa488 wider, was im Falle der hier vorliegenden RNA zu einer Reduktion des Energieübertrags führt. Die Abweichung von den Meßdaten ist kleiner als die der Ergebnisse aus der MD-Simulation (siehe Abbildung 4-23), so daß man annehmen kann, daß das *wobbling-in-a-*

cone-Modell mit den bestimmten Öffnungswinkeln die experimentellen Daten korrekter repräsentiert.

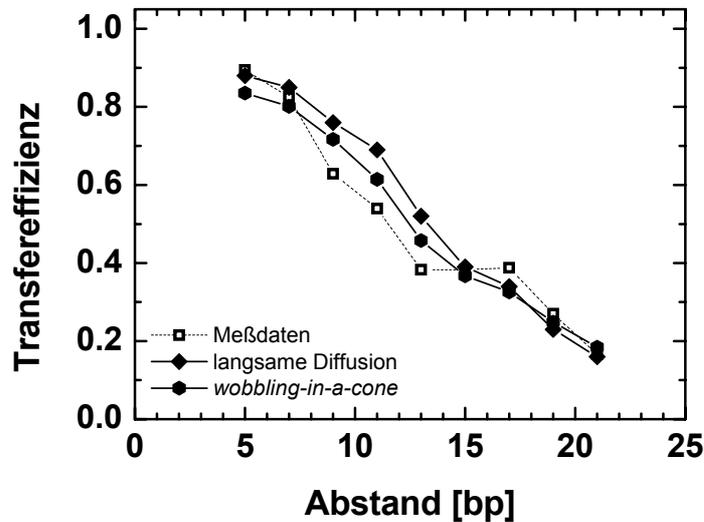


Abbildung 4-23: Vergleich der Meßdaten mit MD-Simulation sowie dem *wobbling-in-a-cone* Modell Die Berechnung der Transfereffizienzen ist von Dr. Stanislav Kalinin (HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt worden. Die Effizienzen resultieren aus dem statischen Mittel der Diffusion des Donors und des Akzeptors in Kegeln mit Öffnungswinkeln von jeweils $107,5^\circ$ und $85,9^\circ$ bei Linkerlängen von je 8 und 16 Å. Näheres siehe Text. Werte siehe Anhang (Tabelle 13).

Insgesamt kann zusammenfassend gesagt werden, daß die A-RNA-Struktur und die kurzen Linker in einer komplizierten räumlichen Einschränkung resultieren und die Dynamik der Fluorophore nicht genau bestimmt werden kann. Da die statische Mittelung der „langsamen Diffusion“ ein recht gutes Ergebnis liefert, wird sie im folgenden bei der Bestimmung der Struktur der U4/U6 snRNA *three-way junction* zur Korrektur der Meßdaten herangezogen. Des weiteren dienen die hier bestimmten minimalen und maximalen Orientierungsfaktoren zur Fehlerabschätzung in der Abstandsbestimmung.

4.3 Spleißosomen

Im folgenden sollen zwei bereits in der Einleitung dargestellte Fragestellungen bearbeitet werden. Zum einen soll die relative Orientierung der drei Helices in der U4/U6 snRNA *three-way junction* zueinander bestimmt werden, und zum anderen die Struktur des in der 5'-terminale Schleife der U4 snRNA liegenden *K-turn*-Motifs. Hierbei ist insbesondere der Einfluß des 15.5K-Proteins auf die Konformation des *K-turns* von Interesse. Dazu werden die aus den bisherigen Untersuchungen an DNAs und RNAs gewonnenen Erkenntnisse genutzt.

4.3.1 U4/U6 snRNA *three-way junction*

Die Bestimmung von Knicken in DNA-Doppelsträngen (Kapitel 4.1.2) hat das Potential der MFD-Technik aufgezeigt, durch die Anbringung von mehreren Fluorophoren die 3D-Struktur von Molekülen zu determinieren. In den hier vorliegenden Untersuchungen ist diese Fragestellung auf ein biologisches System, das Spleißosom, erweitert worden. Die Proben in den Messungen zur *three-way junction* basieren auf der Primärstruktur der humanen U4/U6 snRNA aus Abbildung 1-4, wobei die einzelsträngigen Sequenzen außer acht gelassen werden. Um die Orientierung der drei Arme der *three-way junction* mittels Triangulation zu bestimmen, werden entsprechend der Verfügbarkeit der nativen Uracile vier Donor- und vier Akzeptorstellen gewählt, wie sie in Abbildung 4-24 dargestellt sind. Das Ziel der Untersuchungen ist es herauszufinden, welche zwei der drei Helices koaxial aufeinander stapeln und welche Ausrichtung die dritte Helix relativ dazu einnimmt. Es wird auch direkt in der 5'-terminalen Haarnadelschleife an Position 40 markiert, um einen eventuellen Einfluß der 15.5K und 61K Proteine auf die Struktur und damit die Interfluorophorabstände beobachten zu können. Die Nomenklatur der untersuchten Abstände basiert auf der Numerierung der Donor- und Akzeptorposition innerhalb des Duplex.

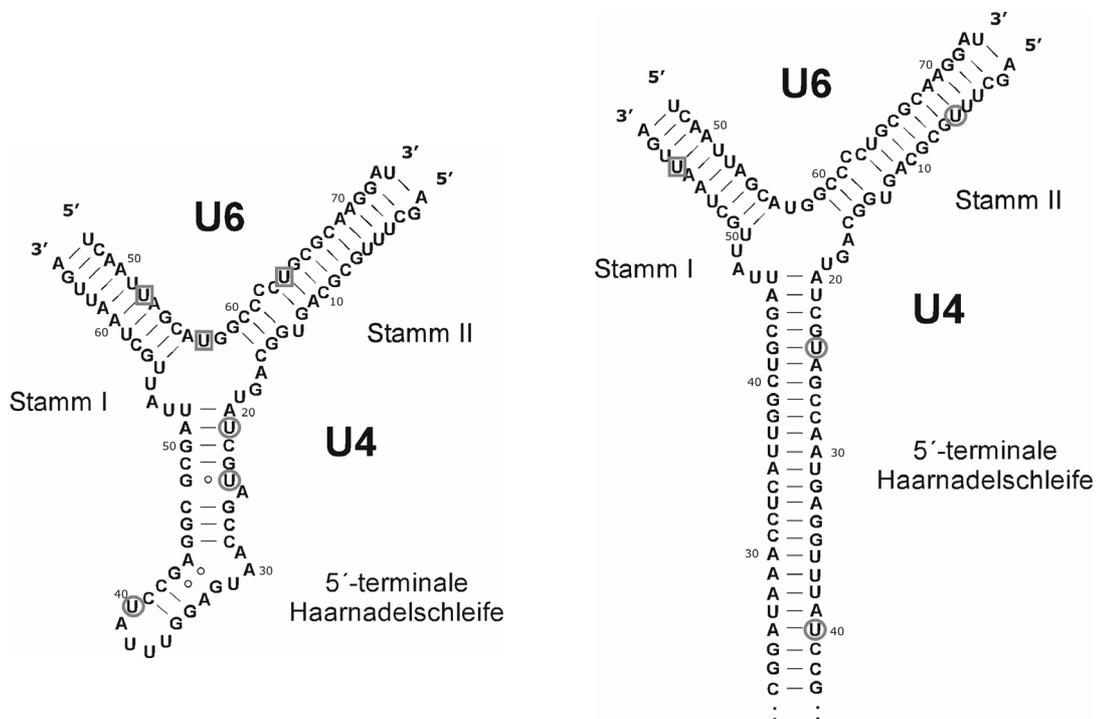


Abbildung 4-24: Sekundärstruktur des untersuchten Ausschnitts der U4/U6 snRNA mit Markierungspositionen Die *three-way junction* wird aus dem Duplex durch die Ausbildung einer Haarnadelschleife innerhalb der U4 snRNA realisiert. Die Donormarkierungspositionen sind durch Kreise, die des Akzeptors durch Quadrate gekennzeichnet.

Die Auflistung der Sequenzen und Namen findet sich im Anhang.

4.3.1.1 Experimentelle Daten

Um Aussagen über die relative Orientierung der drei die *three-way-junction* definierenden Helices Stamm I, Stamm II und 5'-terminale Haarnadelschleife treffen zu können, sind MFD-Einzelmolekülmessungen der in Abbildung 4-24 dargestellten Proben durchgeführt worden. Die Meßbedingungen entsprechen denen der vorhergehenden Untersuchungen: die Proben sind im Puffer A+ bei einer Donorkonzentration von etwa 0,1 nM vermessen worden. Vor jeder Messung sind die Korrekturparameter für die Intensitäten in den grünen und roten Kanälen bestimmt worden (grüner Hintergrund $B_G = 2,0-2,5$ kHz, roter Hintergrund $B_R = 0,7$ kHz, grüne Detektionseffizienz $g_G = 0,36-0,40$, rote Detektionseffizienz $g_R = 0,54$ und spektraler *Crosstalk* $\alpha = 0,019$). Diese sind zur Berechnung der Energietransfereffizienzen und Abstände aus den experimentellen Daten herangezogen worden. Die in Tabelle 4-7 aufgeführten Abstände resultieren aus den Intensitätsmessungen und wurden nach Gl. 2-61 berechnet.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden über TCSPC-Ensemble-Lebensdauer-messungen bezogen. Aufgrund der Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur durch das U4/U6 snRNA Duplex ist die Umgebung der Fluorophore je nach Markierungsposition unterschiedlich, was sich in einer Variation der Quantenausbeute widerspiegelt (siehe Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffmarkierungen an der U4/U6 snRNA Bestimmt über Ensemble-TCSPC-Messungen. Die zugehörigen Lebensdauerdaten finden sich im Anhang in den Tabellen 15 und 16.

	<i>U4_D6</i>	<i>U4_D21</i>	<i>U4_D24</i>	<i>U4_D40</i>
Quantenausbeute Donor Φ_{FD}	0,74	0,73	0,73	0,73
	<i>U4_A62</i>	<i>U6_A52</i>	<i>U6_A57</i>	<i>U6_A64</i>
Quantenausbeute Akzeptor Φ_{FA}	0,62	0,56	0,70	0,51

Die Unterschiede sind vorrangig bei dem Akzeptor recht groß. Wie aus dem Vergleich mit der Anbindung an DNA und RNA geschlossen werden kann (Kapitel 4.1 und 4.2.1.1), reagiert Cy5 sehr sensitiv auf Unterschiede in der Mirkoumgebung mit Änderungen in der Quantenausbeute.

Die zweidimensionalen Histogramme der Probe U4_D24 – U6_A57 aus den Parametern Interfluorophorabstand, Anisotropie und Fluoreszenzlebensdauer des Donors sind in Abbildung 4-25 dargestellt. Die Messung besitzt einen recht hohen Anteil an nur Donor-markierten Einzelsträngen, was vermutlich auf eine schlechte Hybridisierung der Probe zurückzuführen ist. Dies wird durch die niedrige Anisotropie eines Großteils jener langlebigen Spezies widergespiegelt, welche aus der höheren Beweglichkeit des Donors in einem RNA-Einzelstrang resultiert. Ihre Rotationskorrelationszeit liegt deutlich unterhalb derer, die für die FRET-Spezies bestimmt wurde. Für letztere beträgt diese nach der Perrin-Gleichung etwa 1,2 ns.

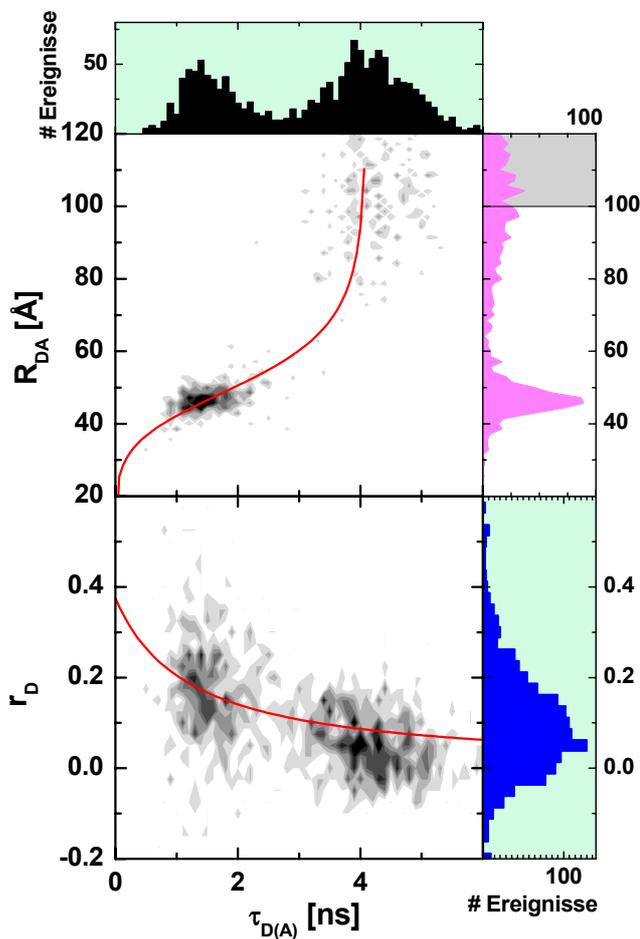


Abbildung 4-25: MFD-Einzelmolekülmessung eines Abstandes an dem U4/U6 snRNA Duplex Beispielmessung der U4_D24 – U6_A57 Probe, dargestellt in 2D-Histogrammen von Interfluorophorabstand und Anisotropie gegen die Donorlebensdauer. Die durchgezogenen Linien stellen Gl. 3-3 (oben, mit $\tau_{D(0)}=4,1$ und $\phi_{FD}=0,73$) sowie die Perrin-Gleichung (Gl. 2-17) bei einer Rotationskorrelationszeit von 1,2 ns (unten) dar. Die grau unterlegte Fläche stellt die nicht auflösbaren Abstände dar. Korrekturparameter siehe Anhang Tabelle 14.

Die Resultate aller Messungen in Form von Abständen sind in Tabelle 4-7 aufgelistet. Neben den experimentellen sind die entsprechend dem Regime der „langsamen Diffusion“ korrigierten Daten dargestellt. Auf die Umrechnung wird im folgenden Kapitel 4.3.1.2 eingegangen.

Tabelle 4-7: Mittelungskorrigierte Abstände aus MFD-Messungen der U4/U6 snRNA Die Korrektur der Daten geschah nach der in Abbildung 4-26 aufgeführten Gleichung. Die Rohdaten finden sich im Anhang (Tabelle 14, Abbildung 6). Der minimale und maximale Abstand resultieren aus einem maximalen Wert von 2,20 und einem minimalen von 0,26 für κ^2 entsprechend Gl. 4-8.

<i>Probe</i>	<i>Abstand [Å]</i>	<i>Abstand_{min} [Å]</i>	<i>Abstand_{max} [Å]</i>
U4_D21 – U6_A52	24,2	19,9	28,1
U4_D21 – U6_A57	26,6	21,9	30,9
U4_D21 – U6_A64	35,7	29,4	41,5
U4_D24 – U6_A52	29,0	23,8	33,7
U4_D24 – U6_A57	33,3	27,4	38,7
U4_D24 – U6_A64	46,9	38,6	54,5
U4_D40 – U6_A52	53,9	44,3	62,6
U4_D40 – U6_A57	55,3	45,5	64,3
U4_D40 – U6_A64	63,9	52,6	74,3
U4_D6 – U4_A62	58,2	47,9	67,7
U4_D40 – U4_A62	98,4	81,0	114,4
U4_D24 – U4_A62	47,1	38,8	54,8

Um einen eventuellen Einfluß der U4/U6 snRNA-spezifischen Proteine 15.5K und 61K auf die betrachteten Abstände zu untersuchen, sind die Messungen in Gegenwart von den beiden Proteinen einzeln und zusammen wiederholt worden. Die bereits mit dem Protein hybridisierten RNAs sind bis auf 0,1 nM Donorkonzentration in Puffer A+ runter verdünnt worden. Um einer Dissoziation des RNA/Protein-Komplexes vorzubeugen, ist bei den entsprechenden Messungen das 15.5K Protein in einer Endkonzentration von 180 nM und das 61K Protein 600 nM hinzugefügt worden. Zusätzlich wurde bei allen Messungen, die Protein beinhalteten, die tragende Glasoberfläche mit 0,1 g/l tRNA 15 min lang passiviert, um einen Verlust des Proteins durch Adsorption an der Oberfläche vorzubeugen.

Bei den Messungen inklusive der Proteine konnte bei keiner der Proben eine zusätzliche FRET-Spezies nachgewiesen werden. Bei der Bindung des 15.5K Proteins alleine ist eine Konformationsänderung zu erwarten (siehe Kapitel 4.3.2 und (Wozniak *et al.* 2005)), die sich aber lediglich auf die Proben mit dem Donor an Position 40 auswirkten sollten. Da sich diese Markierungsposition jedoch recht

nah an der *K-turn*-Bindestelle befindet, mag der Einfluß auf die Abstände innerhalb der *three-way junction* vernachlässigbar sein. Eine durch die Bindung des 61K Proteins bedingte Konformationsänderung wurde bisher nicht postuliert und konnte in den hiesigen Untersuchungen auch nicht nachgewiesen werden. Neben der fehlenden Induktion einer Konformationsänderung kann als Grund für das Fehlen neuer Spezies auch ein schwacher Einfluß des Proteins auf die teilweise sehr kleinen Interfluorophorabstände sein. Von einer korrekten Anbindung der Proteine an die RNA wird hierbei ausgegangen, da jene mittels Gel-Shift-Essays (persönliche Mitteilung Dr. Stephanie Nottrott, AG Lührmann, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) nachgewiesen werden konnte.

4.3.1.2 Korrektur der Meßdaten und Aufstellung vom Modell der *three-way-junction*

Um mittels der gemessenen Abstände eine Strukturvorhersage treffen zu können, müssen erstere zu allererst Mittelungskorrekturen unterworfen werden. In einem weiteren Schritt soll der Fehler in der Abstandsbestimmung abgeschätzt werden. Beides geschieht mit Hilfe der Erkenntnisse, die aus der RNA-Helix Untersuchungen gewonnen worden sind (Kapitel 4.2). Die Bedingungen sind in beiden Fällen bezüglich der verwendeten Fluorophore und deren Anbindung an die RNA identisch, so daß von einer vergleichbaren Beweglichkeit ausgegangen werden kann. Dies spiegelt sich unter anderem in der hohen gemessenen Anisotropie wider (siehe Abbildung 4-25).

Die Messungen an der RNA-Helix haben ergeben, daß die Fluorophore eine relativ zu der FRET-Transferrate langsame rotative und translative Diffusion vollziehen, sprich daß sich die Fluorophore im Regime der „langsamen Diffusion“ befinden (Kapitel 4.1.1.3). Die experimentellen Transfereffizienzen bzw. die daraus geleiteten Abstände repräsentieren somit eine Mittelung aller Abstände und der dazugehörigen Orientierungen. Für die Strukturbestimmung müssen jedoch aus den experimentellen Daten die Abstände zwischen den mittleren Positionen der Fluorophore bestimmt werden. Aus diesem Grunde wird wie bereits bei der Strukturbestimmung der DNA-Helix der Unterschied zwischen dem helikalen Modell und dem im Experiment vorliegenden Modell für die RNA bestimmt und daraus eine Korrekturfunktion berechnet. Mit Hilfe derer können Transfereffizienzen und Abstände, die dem helikalen Modell entsprechen, aus den gemessenen Intensitäten bzw. Lebensdauern berechnet werden. Die aus der MD-Simulation

an RNAs bezogene Umrechnungsfunktion vierten Grades findet sich in Abbildung 4-26.

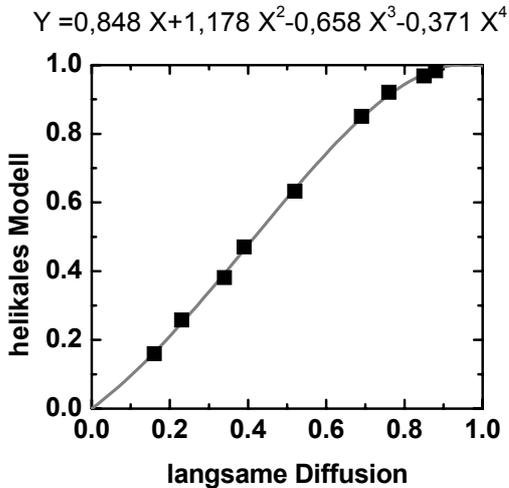


Abbildung 4-26: Korrektur der experimentellen Daten für „langsame Diffusion“ Die in Abbildung 4-22 dargestellten Transfereffizienzen nach dem helikalen Modell und der „langsamen Diffusion“ aus der MD-Simulation werden gegeneinander aufgetragen und eine Korrekturfunktion dritten Grades bestimmt.

Die Anwendung der Funktion auf die bei der Untersuchung der U4/U6 snRNA *three-way-junction* bestimmten Abstände resultieren in den in Tabelle 4-7 aufgelisteten korrigierten Abständen. Die Korrektur führt dabei im allgemeinen zu einer Reduktion der Abstände, die vor allem bei kleinen Abständen sehr deutlich ist.

Die Kenntnis der absoluten Interfluorophorabstände kann nun dazu genutzt werden, diese mit den Abständen in der geraden RNA-Helix zu vergleichen um schließlich zu ermitteln, welche zwei der drei Helices eine durchgängige Helix bilden. Die experimentellen Bedingungen (adäquate Salzkonzentration) sowie die zahlreichen ungepaarten Basen im Bereich der Kreuzung stellen günstige Voraussetzungen für die Ausbildung einer coaxialen Stapelung von Helices dar (Lilley 2001). Dafür werden für die drei möglichen Stapelungen den jeweiligen Donor-Akzeptor-Paaren die Interfluorophorabstände in Form von Basenpaaren zugeordnet, wie sie bei einer durchgehenden Helix aufträten. Diese dienen als Abszisse für die korrigierten U4/U6-Meßdaten. Als Referenz einer geraden Helix dienen nun die experimentellen sowie MD-simulierten Daten der A-RNA Untersuchung (Kapitel 4.2). Es ist hierbei in Betracht zu ziehen, daß bei den Helix-Messungen lediglich Abstände betrachtet worden sind, bei denen Donor und Akzeptor an verschiedene Stränge gebunden sind. Aufgrund der komplexen Assemblierung der *three-way junction* treten bei den hier aufgeführten Messungen jedoch auch Meßabstände auf, die einer Markierung desselben Stranges entsprechen. Da sich die in der RNA-Helix gegenüberliegenden Basen in Ganghöhe und Gangwinkel unterscheiden, sind die Abstände zwischen zwei

Fluorophoren, die beispielsweise zehn Basenpaare auseinander liegen, unterschiedlich je nachdem, ob sie sich im selben oder gegenüberliegenden Strang befinden. Eine Analyse der A-RNA-Konformation (siehe Tabelle 1-1) hat hierbei ergeben, daß dieser Unterschied durch einen Versatz um 2,73 Basen in der Helix wiedergegeben werden kann.

$$\Delta_{bp}(\text{helikales Modell}) = \Delta_{bp}(\text{selber Strang}) + 2,73 \quad (\text{Gl. 4-12})$$

Die Auftragung der korrigierten Abstände in Abhängigkeit von der Anzahl an separierenden Basenpaaren zusammen mit den Referenzdaten aus dem Kapitel 4.2 ist in Abbildung 4-27 zu sehen. Die Fehler sind über Gl. 4-8 mit Hilfe der in Kapitel 4.2.1.1 abgeschätzten κ^2_{min} - und κ^2_{max} -Werte (je 0,26 und 2,20) berechnet worden (siehe Tabelle 4-7).

$$R_{DA}(\kappa^2_{min/max}) = R_{DA}\left(\frac{2}{3}\right) \cdot \left(\frac{\kappa^2_{min/max}}{\frac{2}{3}}\right)^{1/6} \quad (\text{Gl. 4-13})$$

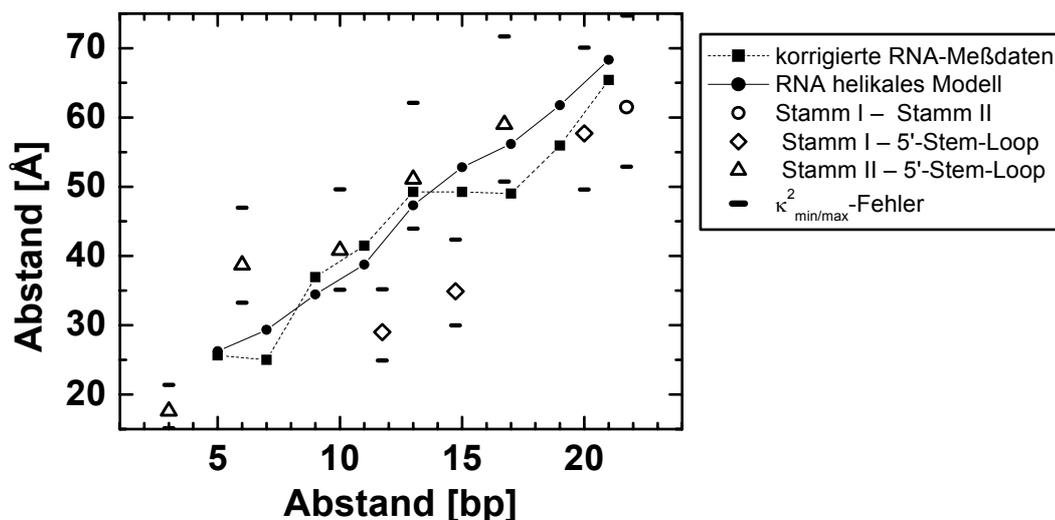


Abbildung 4-27: Vergleich der U4/U6 snRNA-Messungen mit den RNA-Helix Daten Die Zuordnung der U4/U6-Daten findet sich in Tabelle 4-8. Der Fehler berechnet sich nach Gl. 4-8 mit minimalen und maximalen Werten für κ^2 von je 0,26 und 2,20. 5'-Stem-Loop \equiv 5'-terminale Haarnadelschleife.

Das Modell der Stapelung von Stamm I und Stamm II ist mit einem Abstand deutlich unterrepräsentiert. Leider konnten auch nicht alle gemessenen Abstände in Betracht gezogen werden, da sie außerhalb des Bereiches der an der Referenzhelix gemessenen Abstände liegen. Die Auflistung der zur Bestimmung der U4/U6 snRNA *three-way junction*-Struktur mit einbezogenen Proben findet sich in Tabelle 4-8.

Tabelle 4-8: Proben für das Modell der koaxialen Helixstapelung Darstellung der U4/U6 snRNA Proben als Funktion des Abstandes in Basenpaaren. Für auf dem gleichen Strang sitzenden Donor und Akzeptor berechnet sich der Abstand nach Gl. 4-7. Die Proben sind in die drei möglichen koaxialen Stapelungen der Helixarme Stamm I, II und 5'-terminalen Haarnadelschleife aufgeteilt. Die dazugehörige graphische Aufstellung mit den Abständen in Å findet sich in Abbildung 4-27.

<i>Modell der Helixstapelung</i>	<i>Probe</i>	<i>Abstand [bp]</i>
○ Stamm I – Stamm II	U4_D6 - U4_A62	21,73
	U4_D21 - U6_A52	11,73
◇ Stamm I – 5'-term. Schleife	U4_D24 - U6_A 52	14,73
	U4_D40 - U6_A 52	20
	U4_D21 - U6_A 57	3
	U4_D21 - U6_A 64	6
△ Stamm II – 5'-term. Schleife	U4_D24 - U6_A 57	10
	U4_D24 - U6_A 64	13
	U4_D40 - U6_A 57	16,73

Wie man der Abbildung 4-27 entnehmen kann, entsprechen die Abstände zwischen Stamm II und der 5'-terminalen Haarnadelschleife am nächsten denen einer geraden A-RNA Helix. Im Gegensatz dazu sind die Abstände zwischen Stamm I und jeweils einer der beiden anderen Helices deutlich kleiner als für eine durchgängige Helix erwartet werden würde. Daraus resultiert die These, daß Stamm II und die 5'- terminale Haarnadelschleife aufeinander koaxial stapeln und der Stamm I von dieser Achse weggerichtet ist. Da ferner die Abstände zwischen Stamm I und der 5'- terminalen Haarnadelschleife besonders klein sind, kann des weiteren angenommen werden, daß sich der Stamm I in Richtung der 5'-terminale Haarnadelschleife und nicht dem Stamm II faltet.

4.3.2 *K-turn* der humanen U4 snRNA unter Einfluß vom 15.5K Protein

Die 5'-terminale Haarnadelschleife der U4/U6 snRNA enthält das *K-turn* Proteinbindemotiv. Die Konformationsänderung durch Proteinanbindung soll an dieser Stelle genauer untersucht werden. Die Faltung von RNA-Domänen, wie sie der *K-turn* darstellt, geschieht häufig in der Dimension von Subnanometern, kann sich aber in einer deutlichen Reorganisation der benachbarten Regionen auswirken. Auf diese Weise können Konformationsänderungen verstärkt werden

und somit für FRET-Messungen zugänglich gemacht werden. Bei einem sehr kleinen RNA-Motiv wie dem *K-turn* (s. Abbildung 1–6) besteht die Möglichkeit, durch Verlängerung der doppelhelikalen Arme zu beiden Seiten des Motivs jenes zu vergrößern, und die Abstandsänderungen somit zu verstärken. Durch zusätzliches Anbringen von Donor- und Akzeptorfarbstoffen an die Enden dieser Arme können Änderungen in der RNA-Struktur direkt mittels FRET detektiert werden. Die Umsetzung dieser Idee ist in dem Konstrukt Up1Down in Abbildung 4-28 zu sehen, wobei die grau unterlegten Basen die native Struktur des U4 snRNA *K-turns* (Abbildung 1–5) repräsentieren. Es wurde dabei die 5'-terminale Haarnadelschleife auf der einen Seite des Motivs durch eine Doppelhelix, bestehend aus sechs kanonischen Basenpaaren, ersetzt und die andere Seite mit drei Basenpaaren verlängert. Die Erweiterung bzw. Modifikation des *K-turn*-Motives war nicht nur zur Generierung von genügend großen Abständen für die FRET-Messungen notwendig, sondern auch um eine stabile Hybridisierung der Probe zu erreichen und die Fluktuationen auf den *K-turn* alleine zu beschränken.

Da bekannt ist, daß Wechselwirkungen der Fluorophore mit den Basen am Ende des Helixstammes zur Löschung führen können, wurden sowohl Donor als auch Akzeptor über interne Aminomodifikationen drei Basen vom 3'-Ende entfernt angebracht. Die Linkerlänge ist so gewählt worden, daß zum einen eine hohe Beweglichkeit der Fluorophore eingehalten werden konnte und zum anderen gleichzeitig weder die Faltung des *K-turns* noch die Bindung des 15.5K Proteins gestört würde (siehe Abbildung 3-1). Das Endkonstrukt ist in Abbildung 4-28 als Up1Down zu sehen.

Um den Einfluß des herausstehenden Adenins nahe des *K-turn*-Motivs auf die Faltung und Bindung zu untersuchen, wurde auch ein modifiziertes Bindungsmotiv zur Untersuchung konstruiert (Up2Down in Abbildung 4-28). Dazu wurde das Adenin entfernt und das G•U Paar durch ein G-C Watson-Crick Basenpaar ersetzt. Zusätzlich ist auch ein RNA-Duplex zu Referenzzwecken untersucht worden, in welcher das *K-turn*-Motiv vollständig seiner *bulges* und Fehlpaarungen entledigt und damit eine reine Watson-Crick Doppelhelix generiert wurde. Ihre Struktur ist ebenfalls in Abbildung 4-28 unter dem Namen Up3Down zu sehen; ihre Konformation kann mittels einer Standard-A-RNA repräsentiert werden. Die Nomenklatur bezieht sich auf die hybridisierten Formen der Oligonukleotidsequenzen, wie sie im Anhang aufgeführt sind. Daraus wird auch ersichtlich, daß

der Donorstrang in allen drei Konstrukten identisch ist und das jeweilige Motiv nur durch den Akzeptorstrang determiniert wird.

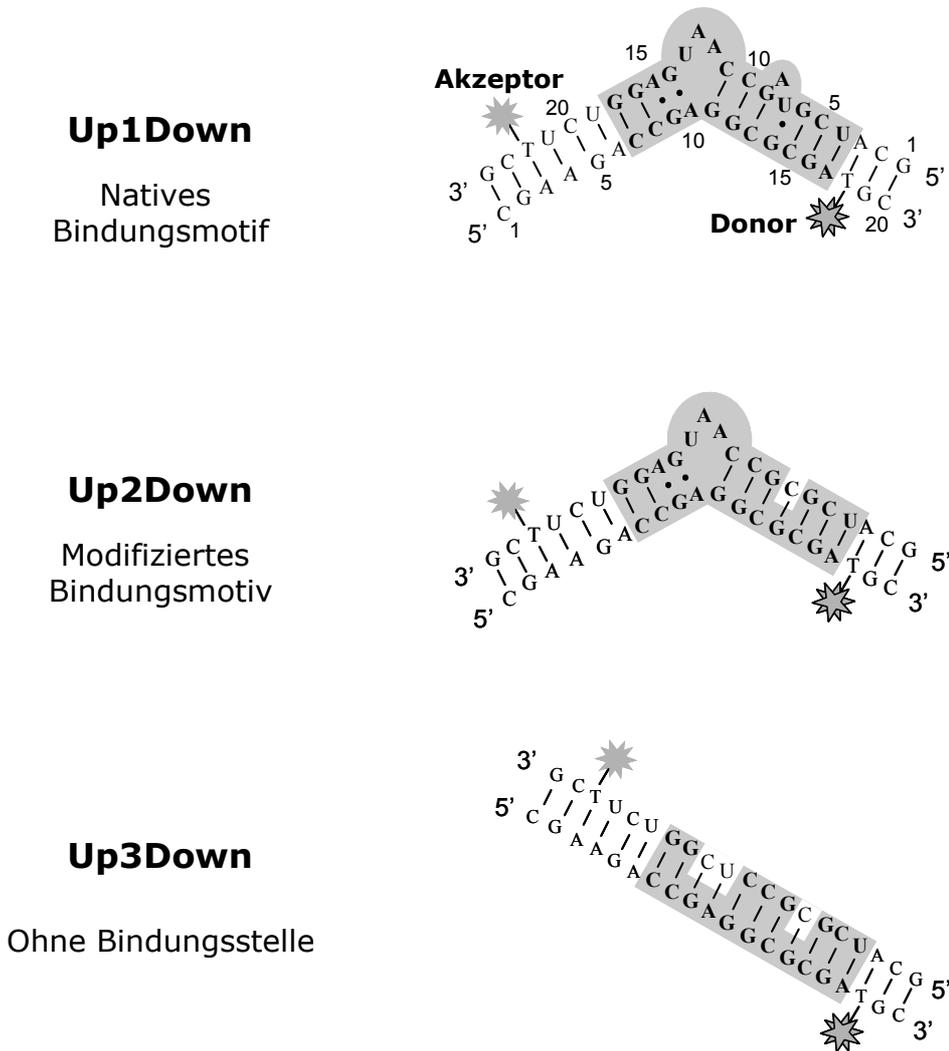


Abbildung 4-28: Konstrukte zur Untersuchung des *K-turns* Um den U4 snRNA *K-turn* FRET-Messungen zugänglich zu machen, ist die native U4 snRNA 5'-terminale Haarnadelschleifensequenz, wie sie durch die grau unterlegten Flächen indiziert ist, an beiden Seiten mit doppelhelikalen Segmenten verlängert worden (**Up1Down**). Zusätzlich zum nativen Motiv ist eine modifizierte Sequenz, in welcher das herausstehende A und die G•U Fehlpaarung deletiert bzw. ersetzt wurde, untersucht worden (**Up2Down**). Eine lineare A-RNA mit vollständig fehlendem *K-turn* Motiv wurde als Kontroll-RNA benutzt (**Up3Down**).

An den drei Konstrukten sind MFD-Einzelmolekülmessungen vorgenommen worden. Die Bestimmung der Abstände geschah hierbei über das Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenz, F_D and F_A , welche aus den grünen und roten Signalen durch Korrekturen für Hintergrund, B_G and B_R , Detektionseffizienzen, g_G and g_R , und dem spektralen Crosstalk α nach Gl. 2–53 und 2–54 berechnet worden sind; typische Werte für die hier vorliegenden Messungen sind dabei $B_G =$

2,9 kHz, $B_R = 0,9$ kHz, $g_G = 0,36$ und $g_R = 0,53$ und $\alpha = 0,019$. Die Abstände sind für Werte von 0,52 für die rote Quatenausbeute Φ_{FA} (Bestimmung mittels Intensitätsmessung, s. Kapitel 3.2.2.1) und einen reduzierten Försterradius R_{Or} von 53,7 Å berechnet worden. Die Annahme von einem Wert von 2/3 für den Orientierungsfaktor κ^2 war durch die Messung der niedrigen Donoranisotropien von 0,061, 0,068 und 0,108 für jeweils die Referenz-RNA, das Duplex mit der nativen Bindungsstelle alleine und letzterer im RNA/Protein Komplex gerechtfertigt (siehe Abbildung 4-30). Die Akzeptoranisotropien sind lediglich unter FRET-vermittelten Anregung gemessen worden, so daß aus ihnen kein direkter Rückschluß auf die Beweglichkeit zu ziehen ist. Da der für die Akzeptoranbindung benutzte Linker jedoch länger als der vom Donor ist, wird angenommen, daß die Voraussetzung der dynamischen Mittelung auch hier erfüllt ist.

4.3.2.1 FRET-Messungen ohne Protein

Die Graphen a bis c der Abbildung 4-29 zeigen jeweils die Meßergebnisse der drei RNA-Duplices – Duplex inklusive Bindungsmotiv, Duplex mit dem modifizierten Bindungsmotiv als auch die der Referenzhelix ohne Bindungsstelle. Die Messungen sind alle in Puffer A+ bei einer RNA-Konzentration von 0,1 nM durchgeführt worden. Es sind die Häufigkeitshistogramme der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors $\tau_{D(A)}$ und der Interfluorophorabstand R_{DA} gegeneinander aufgetragen, resultierend in einem 2D-Histogramm, in welchem die Ereignisdichte farbkodiert ist.

In allen drei Graphen sind zwei Spezies zu sehen. Die Spezies mit der verkürzten Lebensdauer ist dabei die FRET-Spezies, die mit der längeren ist den einzelsträngigen RNAs, welche nur den Donorfluorophor tragen, bzw. den Duplices mit einem gebleichten Akzeptor (im weiteren nur Donor-tragende-Spezies), zuzuordnen. Die Zuweisung eines Abstandes für jene lediglich einen funktionierenden Donorfluorophor tragende Moleküle liegt in der Streubreite des Hintergrundsignals begründet: Für Ereignisse mit einem überdurchschnittlich hohen roten Hintergrundsignal kann trotz Korrektur ein Abstand berechnet werden, welcher in der Regel größer gleich 90 Å ist. Entsprechend repräsentieren diese Abstände keine relevanten Werte, jedoch kann die Spezies dazu genutzt werden, die Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit des Akzeptors $\tau_{D(0)}$ als Referenzwert im Graphen zu erhalten.

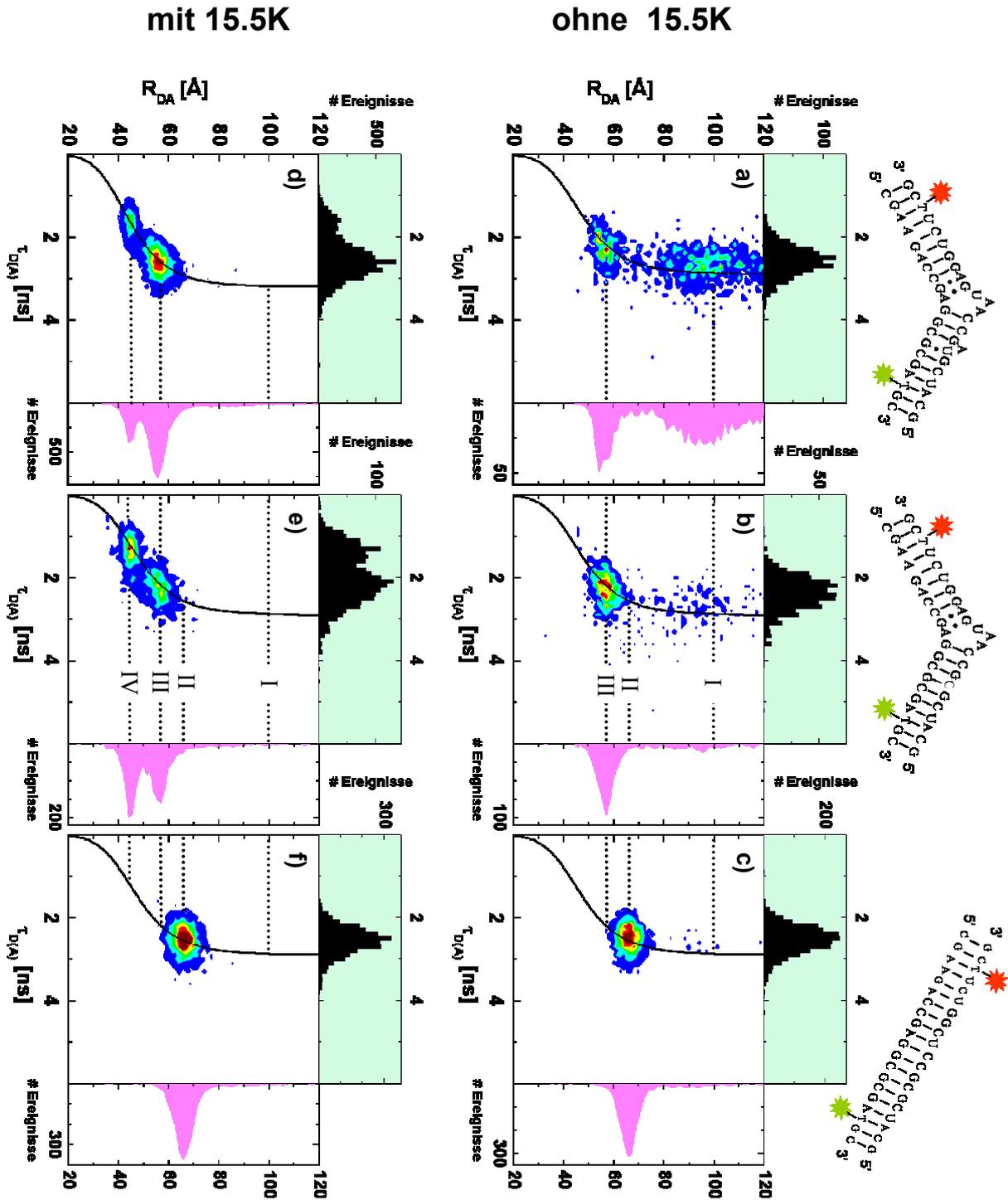


Abbildung 4-29: MFD-Messungen am *K*-turn der U4 snRNA Graphen a) bis c) zeigen die 2D-Histogramme der MFD-Einzelmolekülmessungen für die Proben Up1Down, Up2Down und Up3Down. Die steigende Anzahl an Molekülen ist mittels eines Farbgradienten dargestellt. Die Spezies mit dem großen Interfluorophorabstand repräsentiert die nur den Donor tragenden Moleküle. Die schwarze sigmoide Linie beschreibt die gleichzeitige Änderung des Abstandes mit der Donorlebensdauer für alle möglichen FRET-Effizienzen entsprechend Gl. 3-3 mit $\tau_{D(0)} = 2.9 \text{ ns}$, $k_{FD} = 0.16 \text{ ns}^{-1}$. Die horizontale Linie **I** zeigt die nur Donor-tragende Population an, während **II** und **III** sich jeweils auf das Referenzduplex und das Duplex inklusive Bindungsmotiv beziehen. Graphen d) bis f) zeigen die 2D-Histogramme für die Proben, die zusätzlich das 15.5K Protein bei einer

Konzentration von 220 nM enthalten. Eine neue Spezies, die durch die Linie **IV** hervorgehoben wird, tritt bei den beiden Proben, die das *K-turn* Motiv enthalten, auf.

Der Vergleich der Graphen a und b der Abbildung 4-29 zeigt auf, daß der Interfluorophorabstand der FRET-Spezies sich durch das Fehlen des herausstehenden Adenins und des Austausches des G•U Paars durch ein G-C Paar nicht ändert. Somit konnte aus dem Intensitätsverhältnis sowohl für das native als auch das modifizierte *K-turn*-Motiv eine FRET-Effizienz von 0,37 berechnet werden. Bei einem reduzierten Försterradius von 53,7 Å entsprechen diese Effizienzen zu einem Abstand von 56 ± 3 Å, wobei der Fehler die Halbwertsbreite der Verteilung der Spezies darstellt. In Graph b ist zu sehen, daß die Spezies, die nur den Donorfluorophor enthält, im Vergleich zu derselben Spezies in Graph a deutlich dezimiert ist. Dies liegt in der höheren Hybridisierungseffizienz von Up2Down relativ zu Up1Down begründet, welche wiederum durch die höhere Anzahl an Watson-Crick-Basenpaaren verursacht wird. Entsprechend besitzt die Referenz-RNA Up3Down, welcher Fehlpaarungen und *bulges* jeglicher Art fehlen, die höchste Hybridisierungseffizienz und zeigt fast gar keine nur Donor-tragende Spezies (Graph c).

Die FRET-Spezies der vollständig gepaarten Referenzduplex (Graph c der Abbildung 4-29), welche eine gerade A-RNA darstellt, zeigt relativ zum nativen und modifizierten *K-turn*-Motiv klar einen größeren Interfluorophorabstand auf. So ist für diese Moleküle eine FRET-Effizienz von nur 0,19 bestimmt worden, was einem Abstand von $65 \pm 2,5$ Å entspricht. Aus diesen Vergleichen läßt sich der Schluß ziehen, daß die herausstehenden Nukleotide des *K-turn*-Motivs einen Knick in der RNA-Helix hervorrufen und damit den Abstand zwischen den beiden Helixarmen und damit den Fluorophoren verkleinern. Ein positiver oder negativer Beitrag des herausstehenden Adenins und der G•U Mißpaarung an der Ausbildung des Knicks konnte nicht beobachtet werden.

4.3.2.2 FRET-Messungen mit Protein

Um den Einfluß des 15.5K Proteins auf das *K-turn*-Motiv zu untersuchen, sind die drei Konstrukte Up1Down, Up2Down und Up3Down auch in Anwesenheit des Proteins MFD-Einzelmolekülmessungen unterworfen worden. Die bereits mit dem Protein hybridisierten RNAs wurden abermals bis auf 0,1 nM Donorkonzentration in Puffer A+ verdünnt. Um einer Dissoziation des RNA/15.5K-Komplexes

vorzubeugen, wurde den Messungen das 15.5K Protein in einer Endkonzentration von 220 nM hinzugefügt. Zusätzlich wurde bei allen Messungen, die Protein beinhalteten, die tragende Glasoberfläche mit 0,1 g/l tRNA 15 min lang passiviert, um einen Verlust des Proteins durch Adsorption an der Oberfläche vorzubeugen.

Graphen d bis f der Abbildung 4-29 zeigen die gleichen Proben wie die Graphen a-c, jedoch unter der Zugabe des 15.5K Proteins. In allen Proben ist die relative Anzahl an Molekülen, die nur den Donor tragen, fast vollständig erschöpft. Entsprechend sind die Populationen der doppelsträngigen Spezies, die FRET zeigen, erhöht. Für die Proben, die das native und das modifizierte Bindungsmotiv (Abbildung 4-28) aufweisen, erscheint eine neue Spezies mit einer höheren FRET-Effizienz und damit einem geringeren Interfluorophorabstand, wie er in der Graphik dargestellt ist. In der Referenzprobe ohne Bindungsmotiv ist eine solche zusätzliche Spezies bei der Zugabe des 15.5K Proteins nicht aufzufinden (Vergleich Graph c und f). Dies demonstriert, daß die neue Spezies den Komplex der spezifischen Bindung des 15.5K Proteins am *K-turn*-Motiv repräsentiert. Der kleine Abstand von $45 \pm 2 \text{ \AA}$ und die damit einhergehende hohe FRET-Effizienz zeigen auf, daß die Proteinbindung den Knick in der RNA maßgeblich verstärkt und die Helixarme einander näher bringt. Die Tatsache, daß weiterhin zwei Spezies in der Messung zu sehen sind, welche die freie RNA-Duplex und den RNA/Protein-Komplex repräsentieren, ist ein Hinweis darauf, daß erstere nicht vollständig an das 15.5K Protein gebunden hat. Demnach ist das Experiment nahe den Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt worden. Die Gleichgewichtskonstante für die Bildung des U4 snRNA/15.5K-Komplexes wurde von (Watkins *et al.* 2000) auf 20 nM bestimmt. Eine Bestimmung der Gleichgewichtskonstante aus der Anzahl der Bursts der beiden Spezies, welche die RNA-Duplex und den RNA-Protein-Komplex darstellen, ist aufgrund von Unsicherheiten in der effektiven Probenkonzentration, die durch die Adsorption der Probe an die Glasoberfläche verursacht wird, nicht möglich.

Um sicherzustellen, daß die nicht mit dem Protein assoziierte Spezies, die sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des 15.5K Proteins zu sehen ist (hervorgehoben durch Linie III in Graph a und d der Abbildung 4-29), nicht selbst die Mittelung einer schnellen Dynamik zwischen der gefalteten und einer noch offeneren Konformation darstellt, sind diese Daten einer speziesselktiven FCS-Analyse unterworfen worden (Felekyan *et al.* 2005; Margittai *et al.* 2003) (Daten nicht dargestellt). Dazu wurden die Photonen dieser Spezies zusammen-

gefaßt und eine Kreuzkorrelation der grünen gegen die roten Photonen durchgeführt. Eine Antikorrelation des Signals, wie sie aus Fluktuationen im Interfluorophorabstand resultieren würde, ist bis in den Zeitbereich von 10 μs nicht beobachtet worden. Sehr starke Fluktuationen würden sogar bis im sub- μs -Bereich sichtbar sein; aber auch dort konnte kein auffälliger Term festgemacht werden.

Aus den oben aufgeführten MFD-Messungen lassen sich neben der Lebensdauer und dem Abstand zudem die stationäre Anisotropie für jeden Burst bestimmen. Sie ist ein Maß für die Korrektheit der Annahme von $2/3$ für κ^2 . In der Abbildung 4-30 ist in einem 2D-Histogramm die Donoranisotropie r_G in Abhängigkeit von $\tau_{D(A)}$ für a) den Up1Down/15.5K-Komplex und b) die Referenzhelix Up3Down dargestellt. Die Anisotropie des RNA/Protein-Komplexes beträgt dabei 0,108, die der alleinigen Duplex 0,068. Die Referenzhelix in Graph b besitzt eine Anisotropie von 0,061. Das Einsetzen der Perrin-Gleichung (Gl. 2-17) in den Graphen in Form einer blauen Kurve liefert für beide Experimente eine Rotationskorrelationszeit von $\rho = 0,45$ ns. Die Konsistenz der Rotationskorrelationszeiten für beide Messungen bzw. alle drei Spezies veranschaulicht, daß die Beweglichkeit des Donorfluorophors in allen Fällen gleich ist und weder durch den *K-turn* noch die Proteinbindung beeinflusst wird.

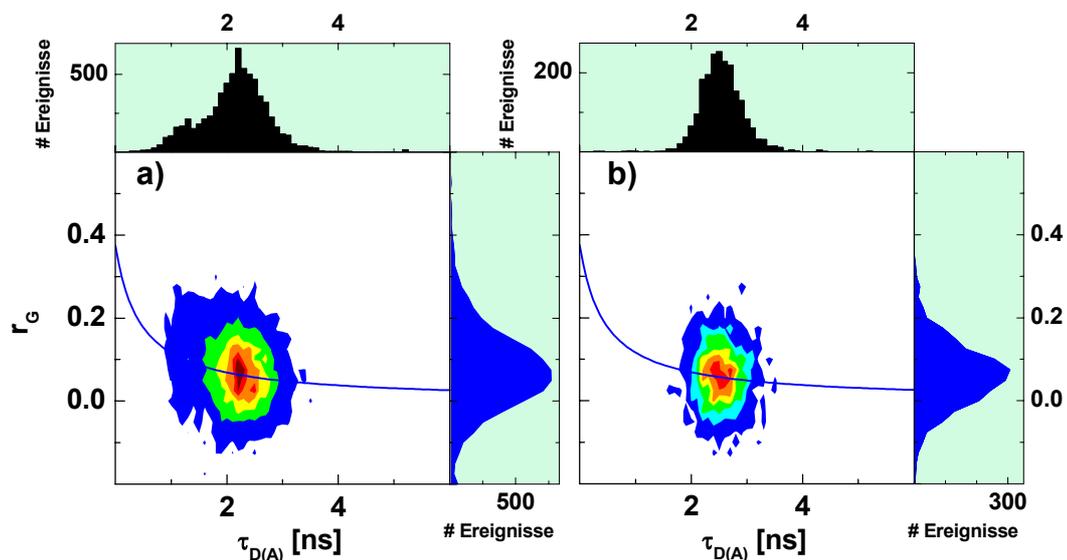


Abbildung 4-30: Anisotropiebestimmung aus den *K-turn* MFD-Messungen 2-D-Histogramme der grünen Anisotropie vs. Donorfluoreszenzlebensdauer in Anwesenheit des Akzeptors für a) den Up1Down/15.5K-Komplex und b) die Referenzhelix Up3Down. Die blaue Kurve beschreibt die Perrin-Gleichung bei einer Rotationskorrelationszeit von 0,45 ns (Gl. 2-17).

4.3.2.3 Einfluß von Salzen auf den K-turn

Um zu untersuchen, inwiefern die Faltung des *K-turns* ionenabhängig ist, sind hier die intramolekularen Abstände der Moleküle Up1Down – dem nativen Bindungsmotiv – und Up3Down – der Referenzhelix – im 90 mM Tris-Borat-Puffer mit steigenden Mg^{2+} - und Na^+ -Konzentrationen von jeweils 0 bis 5 mM bzw. 0 bis 200 mM gemessen worden. Die Ergebnisse der MFD-Einzelmolekülmessungen sind in Abbildung 4-31 gegen die entsprechenden Endkonzentrationen an NaCl und $MgCl_2$ aufgetragen. Für Messungen ohne Na^+ und Mg^{2+} -Ionen wurde EDTA in einer Konzentration von 2 mM hinzugegeben.

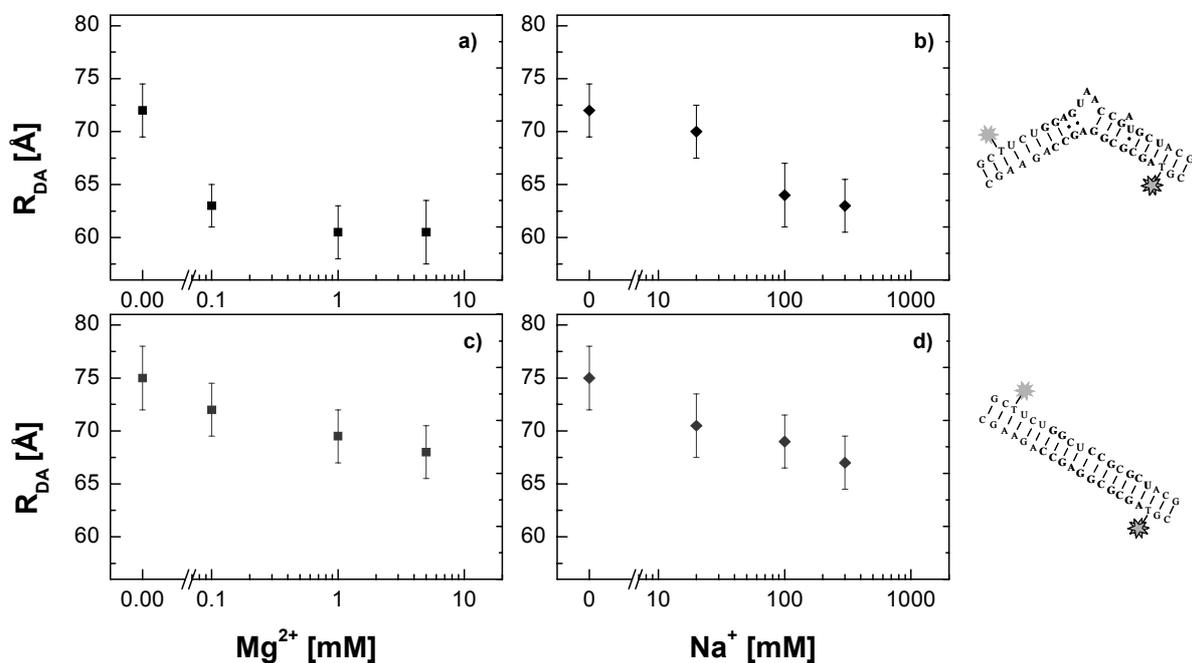


Abbildung 4-31: Salzabhängigkeit des Abstandes Abhängigkeit des Interfluorophorabstandes von der Magnesium- (■) und Natriumkonzentration (◆) in logarithmischer Auftragung für das native Bindungsmotiv (Graph a und b) und für die Referenzhelix (Graph c und d), bestimmt über MFD-Einzelmolekülmessungen.

Alle vier Meßreihen – zwei Proben unter dem Einfluß von zwei unterschiedlichen Ionenarten – weisen einen Abfall des Abstandes mit steigender Ionenkonzentration auf (Graph a bis d der Abbildung 4-31). Im Falle des U4 snRNA *K-turn*-Motivs induzieren die Na^+ -Ionen einen Konformationsübergang bei einer Konzentration zwischen 20 und 100 mM, während in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen dieser Übergang schon unterhalb einer Konzentration von 0,1 mM Mg^{2+} stattfindet. Hierbei ist noch anzuführen, daß der Einfluß von Mg^{2+} - und Na^+ -Ionen nicht unabhängig voneinander ist. Die Kombination von Mg^{2+} und Na^+ , wie sie in

den Messungen der drei Konstrukte mit und ohne Protein im Puffer A benutzt wurde, führt zu einer abermaligen schwachen Verkürzung der gemessenen Abstände (siehe Abbildung 4-29). Die hier aufgeführte gemessene Salzabhängigkeit läßt vermuten, daß das ungefaltete U4 snRNA *K-turn*-Motiv eine Struktur annehmen kann, welche durch die Bindung von Na⁺ und Mg²⁺-Ionen stabilisiert wird.

Um den Einfluß der Ionen auf den *K-turn* interpretieren zu können, sind die gleichen Messungen zusätzlich an der Referenzhelix durchgeführt worden. Auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit der Abstände von der Ionenkonzentration (Graph c und d), obwohl diese etwas schwächer ausgeprägt ist. Des weiteren ist kein sprunghafter Konformationsübergang innerhalb des untersuchten Ionenkonzentrationsbereiches wie bei der nativen *K-turn*-Duplex festzustellen, sondern eher ein stetiger Abfall des Abstandes mit steigender Ionenkonzentration.

Die Tatsache, daß sowohl Na⁺ als auch Mg²⁺ nicht nur einen Einfluß auf die Konformation der U4 snRNA *K-turn*-Duplex sondern auch auf die gerade, vollständig gepaarte Referenzhelix haben, läßt darauf schließen, daß es auch unspezifische Wechselwirkungen der Ionen mit der RNA gibt, welche sich auf den Abstand auswirken. Dies erfordert eine weitergehende Diskussion (siehe Kapitel 5.3.2). Hinzu kommt, daß sich die gemessenen Intensitätsverhältnisse und die resultierenden Abstände nur schwach mit der Salzkonzentration ändern, wenn man sie mit dem Einfluß der Bindung des 15.5K Proteins vergleicht: Das Protein reduziert den Abstand in der nativen Helix um weitere 11 Å bei einem bereits gesättigten Einfluß der betrachteten Ionen. Abschließend läßt sich also sagen, daß die Ionen sowohl spezifischen als auch unspezifischen Einfluß auf das *K-turn*-Duplex haben, jedoch nicht die starke Konformationsänderung wie das 15.5K Protein induzieren können.

Hierbei soll angemerkt werden, daß mit fallender Salzkonzentration eine Depopulation der FRET-Spezies und eine Steigerung der nur den Donor tragenden Spezies zusätzlich zur Änderung des Interfluorophorabstandes beobachtet wird. Dies demonstriert die Abhängigkeit der Hybridisierungseffizienz von Kationen, die ein Annähern von zwei negativ geladenen Strängen ermöglichen und die doppelhelikale Struktur stabilisieren. An dieser Stelle wird auch der Vorteil der Einzelmolekülmessung im Vergleich zu Ensemblemessungen demonstriert, da letztere die Verlagerung der Populationen von einer internen Änderung der FRET-Effizienz nicht unterscheiden könnte und entsprechend fehlerhafte Abstände liefern würde.

4.3.2.4 Vergleich mit Molekulardynamik-Simulationen

Da die FRET-Effizienz von der relativen Orientierung des Donors und des Akzeptors zueinander abhängt, ist es wichtig, daß die Fluorophore eine hohe Rotationsfreiheit haben und somit eine schnelle Mittelung ihrer Orientierungen gewährt wird. Aus diesem Grunde sind für die Fluorophoranbindung Linker von 6 Å Länge für den Farbstoff Alexa488 und 12 Å für Cy5 benutzt worden. Dies führt jedoch gleichzeitig zu einer Unsicherheit in der Fluorophorposition. Um jene zu quantifizieren und um die mittlere Fluorophorposition zu bestimmen, wurden von Gunnar Schröder aus der Gruppe von Prof. Grubmüller (MIP für Biophysikalische Chemie, Göttingen) Molekulardynamik-Simulationen der an die RNA gebundenen Fluorophore durchgeführt. Die Annahmen und die Bedingungen der Simulation gleichen denen der DNA- und RNA-Helix. Es sind lediglich sterische Hinderungen in Betracht gezogen worden, die elektrostatischen Interaktionen sowie der Einfluß von Lösungsmitteln wurden außen vor gelassen. Auch hier kann eine starke Wechselwirkung der Fluorophore mit der RNA basierend auf den gemessenen Donoranisotropien und der Rotationskorrelationszeit von 0,45 ns (siehe Kapitel 4.3.2.2) ausgeschlossen werden. Die erhaltenen Positionen und Orientierungen repräsentieren das größtmögliche Ensemble, welches den sterischen Einschränkungen der RNA und der Linker gehorcht.

Um also die Qualität der multiparameter-FRET-Abstandsmessungen zu überprüfen, sind die hier untersuchten RNA-Moleküle Up1Down und Up3Down zusammen mit den Fluorophoren modelliert und letztere MD-simuliert worden. Zur Beschreibung der Referenz-RNA ohne *K-turn*-Motiv wurden Aminoallyl-modifizierte Thymidine inklusive der Linker und der Fluorophore an eine A-RNA modelliert. Aus den 10.000 Punkten der mittels der MD-Simulation erhaltenen Fluorophorpositionen (siehe Abbildung 4-32) wurde die mittlere Position des Donor- und des Akzeptorfluorophors berechnet. Um die experimentell bestimmten Abstände mit den MD-Simulationen vergleichen zu können, wurde der Abstand zwischen jenen mittleren Positionen bestimmt. Die entsprechenden Fehler wurden aus der Standardabweichung der einzelnen Verteilungen berechnet. Für die modellierte gerade A-RNA, die die Referenzhelix darstellt, wurde ein Mittelpunktsabstand von $60 \pm 9,5$ Å bestimmt (Abbildung 5-8A), was recht gut mit dem experimentellen Wert von $64 \pm 2,5$ Å aus der MFD-FRET-Messung übereinstimmt.

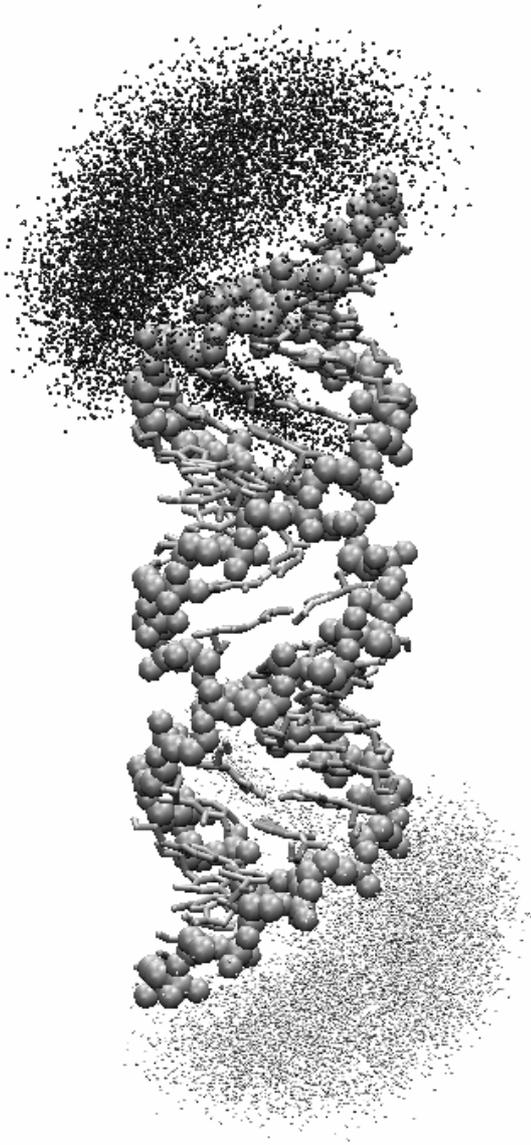


Abbildung 4-32: MD-Simulation der Fluorophore am Up3Down Konstrukt Verteilung von Alexa488 (grau) und Cy5 (schwarz) an der A-RNA Up3Down. Es sind jeweils nur die Referenzatome (siehe Anhang) des entsprechenden Fluorophors in 10.000 Konformationen aufgezeigt.

Zur Modellierung des Up1Down-Konstruktes wurde die von Vidovic *et al.* bestimmte Struktur des kristallinen U4 snRNA *K-turn*/15.5K-Komplexes herangezogen (Vidovic *et al.* 2000) (Abbildung 1-7). Diese Struktur zeigt eine stark genickte Konformation des U4 snRNA *K-turn*-Motivs in Gegenwart des 15.5K Proteins. Die Bestimmung der Fluorophorverteilung an dieser Struktur und der daraus resultierende Mittelungsabstand kann dazu benutzt werden, die Struktur des U4 snRNA- *K-turn*/15.5K Komplexes in Lösung im Vergleich mit der Struktur im Kristall zu diskutieren. So wurden an die Röntgenkristallstruktur die verlängerten Arme in Form einer A-RNA sowie die bereits für die Referenzhelix MD-simulierten Fluorophorwolken dran modelliert. Das Übernehmen der MD-simulierten Fluorophorverteilungen von der Referenzhelix war aufgrund der identischen Umgebung der Fluorophore möglich. Des weiteren zeigt die Fluoro-

phorwolke des Up3Downs bereits, daß sich die Verteilungen eher zu den Enden der Helix und nicht zur Mitte hin orientieren, wo der Knick die Verteilung eventuell beeinflussen könnte. Die MD-Simulation liefert diesmal einen Abstand zwischen den Mittelpunkten der Donor- und Akzeptorwolke von $42 \pm 11 \text{ \AA}$ (Abbildung 5-8B). Dies ist in guter Übereinstimmung zu den $45 \pm 2 \text{ \AA}$ aus den MFD-FRET Messungen, die für den Up1Down/15.5K-Komplex bestimmt worden sind.

4.3.2.5 Abschätzung von Winkeln

Die interhelikalen Winkel sind auf der Basis der FRET-Abstände berechnet worden, wofür angenommen wurde, daß die Helix im Phosphatrückgrat des Donorstranges zwischen den Basen G9 und A10 knickt. Es ist ferner angenommen worden, daß sich die Fluorophore auf der helikalen Achse befinden. Ihr axialer Abstand vom Knick ist durch Aufteilung des experimentell bestimmten Abstandes von 65 \AA zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluorophor an der linearen Referenz-RNA proportional der Anzahl der Basenpaare in jedem helikalen Arm bestimmt worden. In der Berechnung ist die kleine mittlere Abweichung der Fluorophore von der Achse sowie eine mögliche Rotation der helikalen Arme vernachlässigt worden. Der Fehler der Winkel ist durch eine abermalige Kalkulation der Winkel mit einer Verlängerung/Verkürzung der Interfluorophorabstände um die mittlere Linkerlänge, wie sie aus den MD-Simulationen abgeleitet wurde, abgeschätzt worden.

Nach dieser Berechnung ergibt sich für die RNA-Duplex mit dem *K-turn*-Motiv ein Winkel von $76^\circ \pm 15^\circ$ zwischen den Helices. Die Zugabe des 15.5K Proteins und die damit verbundene Komplexbildung reduziert den Winkel auf $48^\circ \pm 15^\circ$, wie aus den gemessenen Abständen von $45 \pm 2 \text{ \AA}$ geschätzt werden kann. Eine genauere Berechnung der Dreh- und Knickwinkel könnte durch den Einsatz von mehreren Abständen zwischen den Helixarmen erreicht werden, wie dies bei den DNA-Knicken angewandt worden ist.

4.4 MFD-Imaging

In Lösung durchgeführte Untersuchungen an Biomolekülen stellen eine lebensnahe und einfache Möglichkeit dar, das Molekül von Interesse unter kontrollierten Bedingungen zu charakterisieren. Die Struktur und Dynamik des

Moleküls kann unter Einfluß von Temperatur, unterschiedlichen Salzkonzentrationen und weiteren organischen Zusätzen untersucht werden. Ebenfalls die Wechselwirkung von multiplen Biomolekülen kann in wäßrigen Medien nachgewiesen und charakterisiert werden. Um das komplette Bild der Funktion eines Makromoleküls jedoch in seiner nativen Umgebung beschreiben zu können, wurde in den letzten Jahren die konfokale Fluoreszenzmikroskopie in Zellen stark entwickelt. Sie ermöglicht die Lokalisation von bestimmten Molekülen in der Zelle. Zu diesem Zwecke müssen die Proteine jedoch häufig überexprimiert werden. Die hohe Detektionseffizienz des MFD-Aufbaus hingegen ermöglicht die Messung von niedrigeren Konzentrationen. Zudem werden nicht nur die Intensität, sondern auch Anisotropie und Lebensdauer detektiert. Analog den Einzelmolekül-MFD-Experimenten können FRET-Bilder generiert werden. Damit lassen sich Interaktionen orts aufgelöst in der Zelle beobachten. In einem weiteren Auswerteverfahren ist zusätzlich die Möglichkeit gegeben, die Photonen aus einer Auswahl an Bildpunkten zu korrelieren. Auf diese Weise kann die Beweglichkeit des Moleküls in der Zelle dargestellt werden. Die folgenden aufgeführten Messungen stellen die Machbarkeitsuntersuchungen zur Detektion von Fluoreszenz in Zellen dar.

4.4.1 Diffusionsmessungen in Sepharose-Kugeln

Um das Potential des MFD-Imagings, FCS-Untersuchungen in Zellen durchführen zu können, aufzuzeigen, sind Fluoreszenz-Messungen in Sepharose-Kugeln durchgeführt worden. Die Sepharose-Kugeln stellen ein im Vergleich zu der wäßrigen Umgebung dichteres Medium dar. Es wird erwartet, daß das Sepharose-Netzwerk die Diffusion von den sich darin befindenden Molekülen relativ zur Diffusion außerhalb der Kugel verlangsamt. Dieser Effekt soll mittels MFD-Imaging an Rh110 und der den *3A-bulge* enthaltenden, Alexa488-markierten DNA-Helix (siehe Kapitel 4.1.2) in den Sepharose-Kugeln veranschaulicht werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Abbildung 4-33 dargestellt. Die Sepharose-Kugeln heben sich bereits in den Intensitätsbildern (a) vom Puffer aufgrund der unterschiedlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der fluoreszierenden Moleküle innerhalb und außerhalb der Kugeln ab. Während das Rh110 sich in den Sepharose-Kugeln ansammelt (Kugel heller als Hintergrund), ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der DNA aufgrund ihres viel höheren Molekulargewichtes außerhalb der Kugel höher (Kugel dunkeler als Hintergrund).

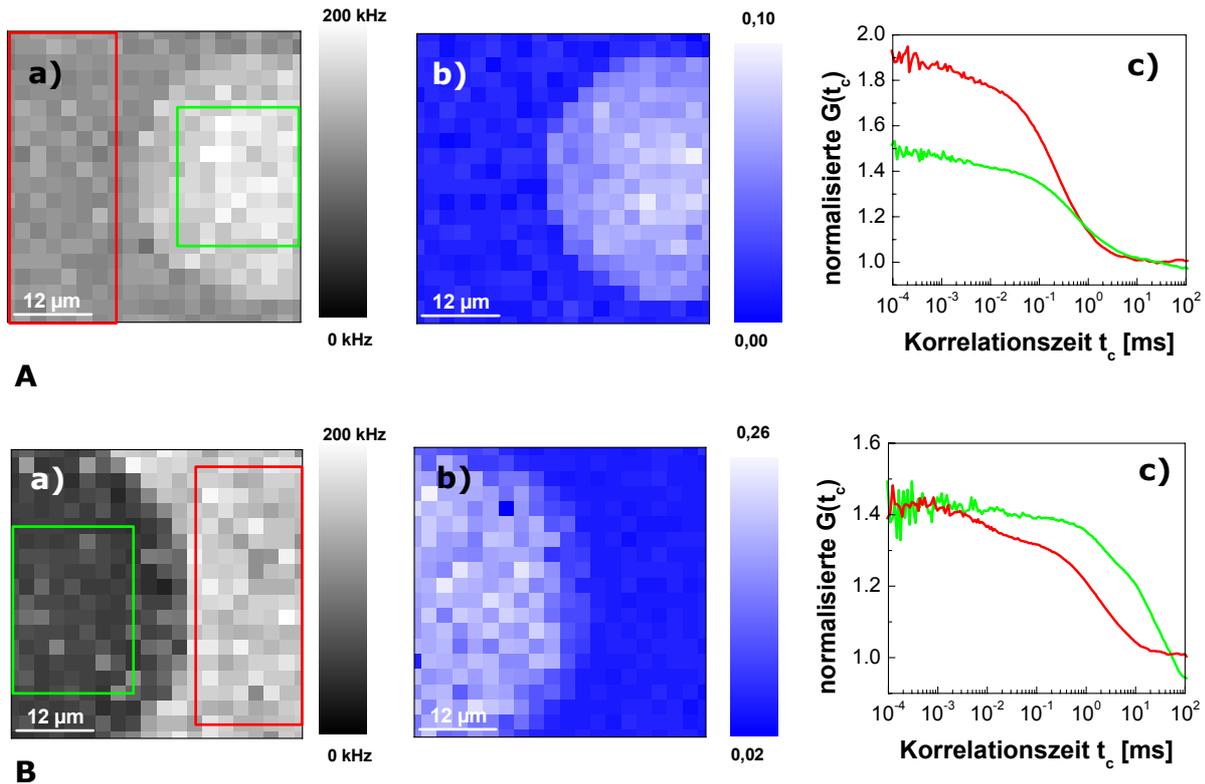


Abbildung 4-33: MFD-Imaging-Aufnahmen von Fluorophoren innerhalb und außerhalb von Sepharose-Kugeln. Detektion von jeweils 20x20 Pixeln bei einer Pixeldauer von 300 ms. In Graph a) ist die Intensität der Fluoreszenz, in b) die zugehörige Anisotropie dargestellt. Die FCS-Kurven in Graph c) resultieren aus den in Graph a) farblich markierten Pixel innerhalb (grün) und außerhalb (rot) der Kugel. Es ist sowohl die Diffusion von Rh110 (**A**) als auch die von dem mit Alexa448-markierten DNA-Duplex mit dem 3A-*bulge* (Abb. 4-10)(**B**) untersucht worden.

Ein Unterschied in der Beweglichkeit der beiden Probemoleküle Rh110 und DNA-Helix ist bereits in der Anisotropie, wie sie aus den Rohsignalen der Intensität in den Detektoren der parallelen und der senkrechten Polarisationsrichtung berechnet worden ist, zu sehen: in beiden Fällen ist die Anisotropie innerhalb der Kugel höher als außerhalb, wobei der Effekt bei der DNA-Helix stärker ist. Eine Quantifizierung der Beweglichkeit in Form der Diffusionszeit liefert die FCS der Pixel innerhalb und außerhalb der Kugel: Die Auswahl außerhalb der Kugel (rot) liefert für beide Probemoleküle eine FCS-Kurve mit einer kürzeren Diffusionszeit als innerhalb (grün). Für Rh110 liegt die Diffusionszeit im Puffer im sub-ms-Bereich und steigt in der Kugel auf mehrere ms an (Graph A-c der Abbildung 4-33). Die geknickte DNA-Helix mit dem 3A-*bulge* diffundiert selbst durch das Anregungsvolumen innerhalb von einigen ms, was durch die Sepharose-Kugel auf etwa 20 ms verlangsamt wird (Graph B-c der Abbildung 4-33). Die vorliegenden Messungen demonstrieren somit die Möglichkeit, die Beweglichkeit von Fluorophoren in

einer MFD-Messung im Rasterverfahren anhand von pixelselektiver FCS quantifizieren zu können.

4.4.2 Fluoreszenzhintergrund in Zellen

Um Messungen von fluoreszierenden Proben in Zellen bei einer piko- bis mikromolaren Konzentration durchführen zu können, müssen die Meßbedingungen so gewählt werden, daß der von der Autofluoreszenz der Zellen stammende Hintergrund in so niedrig wie möglich ist. Es ist bekannt, daß die Autofluoreszenz bei Anregung mit grünem und blauen Licht stärker als bei rotem Licht ist. Bei Messung von FRET und Benutzung von hellen Fluorophoren, wie sie die Fluorophore im grünen und blauen spektralen Bereich darstellen, ist jedoch eine Lichtquelle im Wellenlängenbereich um die 500 nm unabdingbar. Aus diesem Grunde sollen zu allererst die Bedingungen der Zellkultur so gewählt werden, daß die Autofluoreszenz bei dieser Anregung so klein wie möglich ist.

Die SS6 Hela-Zellen werden für gewöhnlich in DMEM-Medium kultiviert, welches Phenolrot zur Kontrolle des pH-Wertes enthält. Phenolrot ist selbst bei Anregung mit 496,5 nm nicht fluoreszent, aber es besteht die Vermutung, daß es in der Zelle zu einer fluoreszenten Substanz umgewandelt wird. Des weiteren ist Riboflavin, welches ein essentieller Bestandteil von Nährmedien ist, selbst fluoreszent. Aus diesem Grunde sind Nährmedien ausgewählt worden, die die aufgeführten Inhaltsstoffe in möglichst niedriger Konzentration enthalten. Die Zellen sind folglich vor den Imaging-Messungen mindestens eine Woche lang in den Medien DMEM, welches kein Phenolrot enthält, und in F12 sowie M199 kultiviert worden. Die jeweilige Konzentration an den Zusatzstoffen Phenolrot und Riboflavin in den Medien ist in Tabelle 4-9 aufgeführt.

Tabelle 4-9: Konzentration an Phenolrot und Riboflavin in den verwendeten Nährmedien

	<i>DMEM + Phenolrot</i>	<i>DMEM</i>	<i>F12</i>	<i>M199</i>
Phenolrot	15 mg/L	---	1,2 mg/L	---
Riboflavin	0,4 mg/L	0,4 mg/L	0,037 mg/L	0,01 mg/L

Die in den Medien kultivierten Zellen sind im konfokalen Imaging-Aufbau (Kapitel 3.2.3.4) im Rasterverfahren abgebildet worden (siehe Abbildung 4-34).

Dabei zeigen alle Zellen eine niedrigere Autofluoreszenz auf als in herkömmlichen DMEM mit Phenolrot kultivierte Hela-Zellen. Die Fluoreszenzzählrate im Zellkern, welcher im allgemeinen nur wenig Autofluoreszenz aufweist, beträgt für die hier aufgeführten Medien mit einer sehr niedrigen Riboflavinkonzentration (F12 und M199) jeweils 39 kHz relativ zu 45 kHz im DMEM-Medium. Es ist zudem auf die Spitzenzählrate in den Zellen als ganzes hinzuweisen, die für die im F12-Medium kultivierten Zellen mit Abstand am niedrigsten ist (vergleiche Intensitätsskala der Graphen a)-c) der Abbildung 4-34).

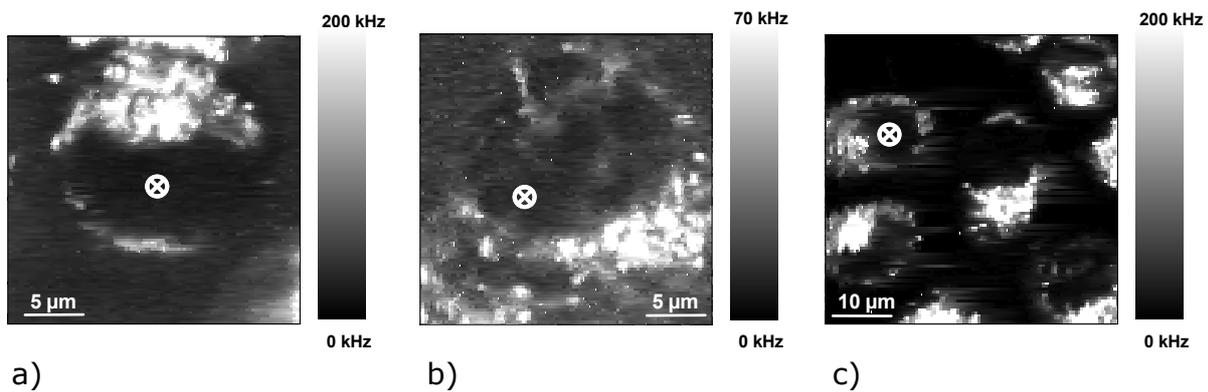


Abbildung 4-34: MFD-Imaging der Autofluoreszenz von Hela-Zellen. Die Messungen sind in den Medien a) DMEM; b) F12; c) M199 durchgeführt worden. Die Fluoreszenzzählrate an der markierten Position (☒) beträgt jeweils 45, 39 und 39 kHz. Die Anregungsleistungsdichte betrug 57 kW cm^{-2} .

Bei den in den Zellen gemessenen Zählraten sind einzelne Fluorophore nur schwer nachzuweisen. Bei Konzentrationen im μM -Bereich sollten jedoch Fluoreszenzmessungen in Form von FCS-Untersuchungen möglich sein.

5 DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einzelmolekül-Messungen an Oligonukleotiden haben die Möglichkeiten der MFD-FRET-Technik auf dem Gebiet der absoluten Abstandsmessungen demonstriert. Im Falle der Messungen an DNAs konnte dank verbesserter Korrekturansätze eine sehr hohe Genauigkeit erzielt werden. Dabei ist deutlich geworden, wie groß die Bedeutung der Mittelungsregimes (van der Meer *et al.* 1994) ist. Es wurde herausgehoben, wie stark die Rolle der Zeitskala der Fluorophorbewegung ist, wenn der Fluorophor einen großen Raum abtasten kann. Davon sind insbesondere kleine Abstände beeinflusst, welche sich zudem aufgrund des möglichen Interfluorophorkontaktes als problematisch erweisen.

Im Laufe der Arbeit sind mehrere Möglichkeiten der 3D-Strukturbestimmung demonstriert worden. Es wurde die Determinierung von Knicken im dreidimensionalen Raum anhand von DNAs aufgezeigt, der Knickwinkel in RNAs – induziert durch Proteinbindung – sowie die Orientierung der drei Helices einer RNA *three-way junction* zueinander bestimmt. Dabei hing die Genauigkeit der Strukturbestimmung von der Anzahl der betrachteten Abstände ab.

Bei den Messungen an RNAs sind wir dabei auf die Problematik von kurzen Linkern gestoßen, die einen starken Einfluß auf den Orientierungsfaktor besitzen und zudem eine Beeinflussung der Quantenausbeute der Fluorophore zur Folge haben. Somit können dieser Arbeit gute Bedingungen für FRET-Messungen entnommen und neuartige Korrekturansätze abgeleitet werden.

Die Machbarkeitsstudien zu Fluoreszenzmessungen in Zellen haben die Möglichkeit der pixelweisen MFD-Parameterbestimmung demonstriert und zeigen eine Perspektive auf Einzelmolekülmessungen in Zellen auf.

5.1 DNA-Helix

Die DNA stellt ein hervorragendes Modellsystem dar, da viel über ihre Struktur bekannt ist. Die an ihr durchgeführten Messungen dienen vornehmlich der Demonstration der Genauigkeit der MFD-FRET-Technik im Einzelmolekülregime zur Strukturanalyse. Dabei werden neue Erkenntnisse für die Technik gewonnen, wie die Bedeutung der räumlichen Verteilung der Fluorophore bei langen Linkern für die gemessenen FRET-Effizienzen. Zudem konnten die in der Literatur beschriebenen sequenzabhängigen Unregelmäßigkeiten in DNA-Helices reproduziert sowie durch herausstehende Basen generierte Knicke in der Helix genaustens charakterisiert werden.

5.1.1 Gerade Helix

Zur Eichung der MFD-FRET-Messungen sind experimentelle Einzelmolekül-daten mit Molekulardynamik-Vorhersagen verglichen worden. Es sind hierzu zwölf unterschiedliche intrahelikale Abstände – realisiert durch Verschachtelung von drei Donor- und vier Akzeptorpositionen – untersucht worden, wodurch die Einbeziehung von kleinen bis hin zu großen Abständen gewährleistet wurde (Abbildung 4-1). Es ist aus der Literatur bekannt, daß die Ermittlung von absoluten Abständen auf der ganzen Skala von niedrigen bis hin zu hohen Transfereffizienzen problematisch sein kann. Dabei ist für gewöhnlich ein einfacher Korrekturfaktor eingeführt worden, welcher lediglich auf einen systematischen Fehler zurückgeführt wurde. Durch den Vergleich der Meßdaten mit MD-Simulationen sollte hier die physikalische Ursache für die Unterschiede herausgefunden werden. Dies ist durch die Betrachtung von verschiedenen Mittelungsregimes und die Analyse von Antikorrelationen bei kleinen Abständen erreicht worden.

5.1.1.1 Experimentelle Daten zeigen ein helikales Förstermodell auf

Bereits die erste Betrachtung der Meßdaten zeigte auf, daß die FRET-Effizienz nicht stetig mit steigender Anzahl an separierenden Basen sank. Zu dem

sigmoidalen Verlauf der Transfereffizienz nach Förster kam eine zusätzliche sinusförmige Überlagerung hinzu (Abbildung 4-3), die aus dem treppenartigen Ablaufen der Fluorophore um die Helix resultiert (siehe Abbildung 5-1).

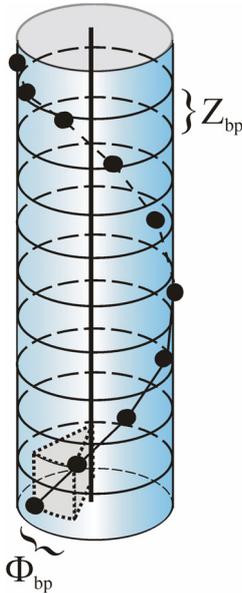


Abbildung 5-1: Helikales Modell Die Scheiben stellen die Basenpaare dar, die Punkte die sich treppenartig aufbauende Sequenz bzw. die mittlere Position der Fluorophore. Definiert wird die Helix über die Parameter Ganghöhe (*rise*, z_{bp}) und Gangwinkel (*twist*, ϕ_{bp}).

Der Vergleich der experimentellen Daten mit denen aus MD-Simulationen resultierenden und auf der durchschnittlichen Position der Fluorophore basierenden FRET-Effizienzen zeigte sowohl systematische als auch individuelle Abweichungen. Es ist somit für absolute Abstandsbestimmung aus FRET-Messungen nicht hinreichend, die räumliche Verteilung der Fluorophore auf eine mittlere Position zu reduzieren. Aus diesem Grunde sollte im weiteren die in der MD-Simulation bestimmte dreidimensionale Verteilung der Fluorophore und der Orientierungen der Übergangsdipolmomente bei der Energietransferbestimmung berücksichtigt werden.

5.1.1.2 Die Fluorophore unterliegen einer „schnellen Rotation“

Bei der Bestimmung von Energietransfereffizienzen spielt die Zeitskala der Fluorophordynamik relativ zur Energietransferrate eine große Rolle. Dabei wird zwischen dynamischen und statischen Regimes bezüglich der Dipolorientierung als auch der Position des Fluorophors im Raum unterschieden. Die Anwendung von unterschiedlichen Mittelungsregimes – der „schnellen Rotation“ sowie „langsamem Diffusion“ (Kapitel 4.1.1.2) neben dem oben bereits erwähnten helikalen Modell – auf die simulierte Fluorophorverteilung hat ergeben, daß erstere die Mittelungsdynamik der Fluorophore am besten repräsentiert. Somit folgt gleichzeitig, daß die aus den FRET-Messungen resultierenden Abstände nicht

direkt physikalische Dimensionen darstellen. Die Voraussetzung, daß für die Fluorophore eine mittlere Position angenommen werden kann, ist speziell für kleine Abstände fehlerhaft.

Aus den MD-Simulationen der Fluorophore an der Proben-DNA war es möglich, FRET-Effizienz-spezifische Korrekturen herzuleiten, um aus den experimentellen Daten Abstände, die denen des helikalen Modells entsprechen, zu bestimmen. Dazu ist die aus der Mittelung „schnellen Rotation“ berechnete FRET-Effizienz gegen die des nach dem helikalen Modell berechnete aufgetragen und eine Umrechnungsfunktion dritten Grades angepaßt worden. Diese ist auf die experimentellen FRET-Effizienzen angewandt worden, so daß die daraus berechneten Abstände nun den physikalischen Abstand zwischen den mittleren Positionen der Fluorophore repräsentierten. Die Korrekturen gelten sowohl für FRET-Effizienzen die aus Intensitäts- als auch Lebensdauermessungen bestimmt worden sind. Sie sind im Prinzip ebenfalls auf andere Systeme anwendbar, die analoge Linker und Fluorophore benutzen.

Die Tatsache, daß die experimentellen Daten gut mit dem Mittel der „schnellen Rotation“ angepaßt werden können, sagt etwas über die Zeitskala der Fluorophordynamik aus. Zum einen bedeutet das, daß die Fluorophore genügend Freiraum haben, um relativ zum Energietransfer schnell zu rotieren, was durch die schnelle Rotationskorrelationszeit (0,5 ns) aus den Anisotropiemessungen unterstützt wird (siehe auch Kapitel 4.1.1.1). Damit wird die Annahme von $2/3$ für κ^2 gerechtfertigt. Zum anderen beinhaltet das Regime der „schnellen Rotation“ des weiteren, daß die Fluorophore eine langsame translative Diffusion vollführen. Dies ist bei den experimentellen Bedingungen realistisch, wenn man bedenkt, daß allein ein freier Farbstoff eine Translationsdiffusionszeit von nur $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ besitzt (für Rhodamin6G in Ethanol, (Hansen *et al.* 1998)), was $29 \text{ \AA}^2/\text{ns}$ entspricht. Zieht man in Betracht, daß im Experiment der Fluorophor zusätzlich durch die Bindung über den Linker an die DNA in seiner Bewegung eingeschränkt ist, darf man annehmen, daß dieser Wert deutlich unterschritten wird. Bei einem Durchmesser der Wolke von mehreren Ångström kann so der ganze Raum nicht mehr innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer abgetastet werden. Eine detailliertere Untersuchung der Zeitskala für Positionsänderungen wäre interessant, liegt aber außerhalb des Rahmens dieser Arbeit.

5.1.1.3 Experimentelle Daten lassen auf eine Überstruktur der B-DNA schließen

Nähere Untersuchungen der experimentellen Daten haben ergeben, daß die in der Literatur beschriebene strukturelle Variabilität der sogenannten B-DNA in unseren Messungen bestätigt wird. In den Publikationen wird konstatiert, daß die Struktur der Helix von der Sequenz diktiert wird und jedes aufeinanderfolgende Basentriplett oder -quartett eine individuelle Konformation definiert. Dies kann man sich als ein Abknicken der Helix an jeder Base vorstellen, was zu einer umfassenden Krümmung der Helixstruktur führen kann (Abbildung 5-2).

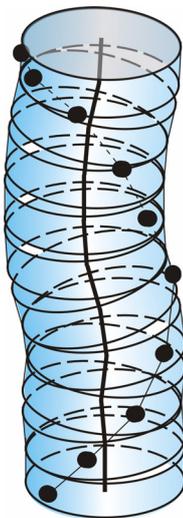


Abbildung 5-2: Sequenzabhängiges helikales Modell Die Parameter *rise*, *twist*, *roll* und *tilt* zur Beschreibung der Struktur von DNA-Helices (siehe Abbildung 1-1B) sind sequenzabhängig und können zu Krümmungen in der Helix führen.

Diese sequenzabhängigen Modelle der hier gebrauchten DNA ist mit dem Programm DIAMOD (Dlagic & Harrington 1998) generiert worden und es wurde festgestellt, daß die spezifischen Modelle die bezüglich der „schnellen Rotation“ korrigierten Meßdaten besser als die B-DNA beschreiben können (Abbildung 4-8). Damit wird folglich gezeigt, daß die 48 Basenpaar lange DNA-Helix nicht der idealen B-DNA entspricht, sondern eine Überstruktur in Form einer Krümmung aufweist (Abbildung 4-7). Bisherige Arbeiten auf dem Gebiet der FRET-Messungen an DNAs konnten lediglich die Händigkeit und helikale Geometrie der DNA demonstrieren (Clegg *et al.* 1993; Jares-Erijman & Jovin 1996; Lee *et al.* 2005). Mit den hier vorgestellten Ergebnissen wird erstmalig eine sequenzabhängige Krümmung der DNA mittels FRET nachgewiesen. Diese hochauflösende Strukturbestimmung wird durch eine große Anzahl der gemessenen Abstände und vor allem die hohe Präzision der MFD-Messungen im Einzelmolekülregime erreicht.

5.1.1.4 Kleine Abstände liefern eine zu niedrige FRET-Effizienz

Selbst nach der Korrektur der experimentellen Daten bezüglich der Mittelung der Fluorophorverteilung sowie der Sequenzabhängigkeit der DNA-Struktur blieben die FRET-Effizienzen der kleinsten Abstände deutlich unter den erwarteten (Abbildung 4-8). Dabei handelt es sich um Abstände, bei welchen der Interfluorophorabstand ähnlich den räumlichen Ausmaßen der Wolke der Fluorophorpositionen aus der MD-Simulation ist, und zudem die Abstände so klein sind, daß ein Kontakt zwischen den beiden Fluorophoren möglich ist. Aus diesem Grunde sind die Daten dieser Abstände einer FCS-Analyse unterworfen worden, um potentielle Fluktuationen in den Fluoreszenzsignalen des Donors und des Akzeptors zu detektieren.

Typischerweise werden Fluktuationen durch translative Diffusion und photochemische Prozesse der Fluorophore verursacht und resultieren in Korrelationstermen sowohl in der Autokorrelation als auch Kreuzkorrelation der entsprechenden Signale. Eine Korrelation in der Kreuzkorrelation ist darauf zurückzuführen, daß die Signale der beiden Kanäle miteinander korreliert sind, d.h. ein Dunkelwerden des Donors führt auch zwangsweise zu einem Dunkelwerden des Akzeptors. Im Gegensatz dazu führen Konformationsänderungen des Probemoleküls und Photobleichen des Akzeptors zu einer Antikorrelation, d.h. das Ansteigen eines Signals führt zum Sinken des anderen, resultierend in einem Anstiegsterm in der Kreuzkorrelationskurve. Dabei können meist nur die Prozesse identifiziert werden, die sich in der Zeitskala eindeutig von der Diffusionsdynamik unterscheiden.

Im Falle der kleinen Abstände in der DNA-Helix war es möglich, eine Antikorrelation im Bereich von etwa 4 μ s aufzudecken (Tabelle 4-2). Der von der Triplett-Kinetik isolierte Antikorrelationsterm für Abstände zwischen neun und elf Basenpaaren ist im Vergleich zu Abständen, die diesen Term nicht mehr aufzeigen (15 und 21 Basenpaare), in Abbildung 5-3 aufgezeigt. Im Falle des Interfluorophoroabstands von sieben Basenpaaren beträgt die Lebensdauer der am stärksten ausgeprägten Antikorrelation 4,3 μ s. In dieser Zeitskala ist es unwahrscheinlich, daß das Ereignis auf Konformationsänderungen der Helix oder Diffusionsdynamiken der Fluorophore basiert. Die Zeitskala der Dynamik impliziert vielmehr eine direkte Wechselwirkung zwischen den Fluorophoren. Dabei sind auch andere Transfermechanismen wie der Dexter-Transfer zu bedenken.

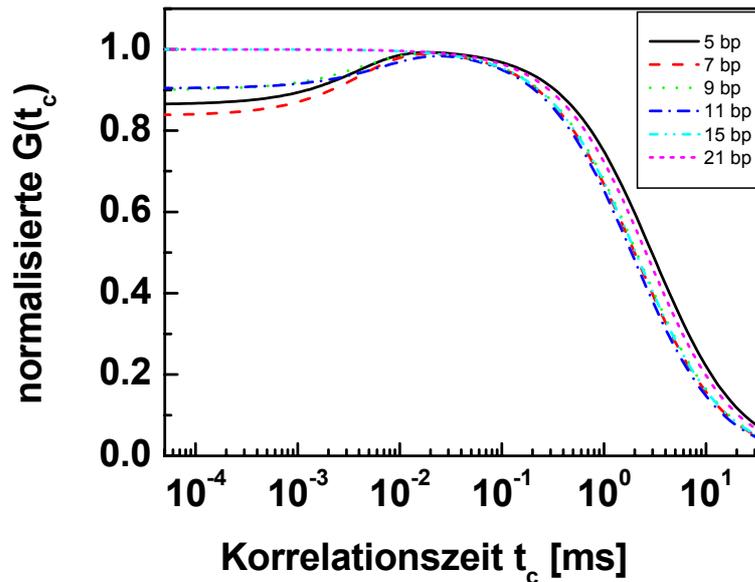


Abbildung 5-3: Isolierter Antikorrelationsterm in der FCS der Helix-Meßdaten Graphische Darstellung der berechneten Antikorrelation durch Abziehen der theoretischen Triplett-Komponente aus der FCS-Kurve (siehe Tabelle 4-2) für unterschiedliche Interfluorophorabstände in Basenpaaren (bp).

Des weiteren sollte an dieser Stelle aufgeführt werden, daß sich die Fluorophore in diesem Bereich nicht mehr wie Punktdipole, wie in der Förstertheorie angenommen, verhalten. In diesem Fall gilt die R^6 -Abhängigkeit nicht mehr, sondern es wird eher ein quadratischer Zusammenhang zwischen der Energietransfereffizienz und dem Abstand erwartet. In diesem Fall überschätzt der Förster-Ausdruck die Energietransferrate aufgrund des Fehlers im Orientierungsfaktors (Wong *et al.* 2004).

5.1.2 Geknickte Helix

Nachdem das Modellsystem DNA-Helix gut definiert wurde, konnte die Problemstellung erweitert werden. Dies ist durch die Generierung von unterschiedlich stark ausgeprägten Knicken in der DNA durch Adenin-Insertion realisiert worden. Neben dem eigentlichen Knickwinkel war es möglich, die mit dem Knick einhergehende Drehung und Versatz der Helixarme zu quantifizieren.

5.1.2.1 Der Knick nimmt mit der Anzahl der eingeschobenen Basen zu

Es sind die Energietransfereffizienzen von Konstrukten mit einem, drei sowie fünf eingeschobenen Adenosinen (Abbildung 4-10) unter denselben Bedingungen wie für die vollständig komplementäre Helix gemessen worden. Die

experimentellen Daten (Abbildung 4-11) zeigen einen sprunghaften Anstieg der Transfereffizienz von 15 zu 17 separierenden Basen. Die offensichtliche Wiedernäherung der Fluorophore bei steigendem Abstand kann nur durch einen Knick in der Helix erklärt werden. Der Grad des Sprunges nimmt mit der Anzahl der eingeschobenen Basen erwartungsgemäß zu, was die Verstärkung des Knickes widerspiegelt. Eine Veranschaulichung des Effektes ist in Abbildung 5-4 zu sehen.

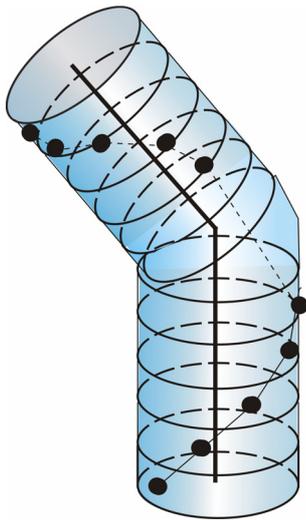


Abbildung 5-4: Modell von geknickter Helix
Auswirkung von ungepaarten Basen auf die DNA-Struktur. Hinzu kommt eine eventuelle Überstruktur in Form einer sequenzabhängigen Krümmung.

Um den Knick zu quantifizieren, sind in einem Modell die Positionen der Akzeptoren relativ zu den Donoren geändert und den korrigierten gemessenen Abständen angepaßt worden. Für die Helixarme ist eine gekrümmte Helix gewählt worden, die nach sequenzspezifischen Parametern aufgebaut worden ist. Die Berechnung geschah unter der Annahme, daß die Fluorophore ihre Position relativ zu den Helixarmen, an welchen sie befestigt waren, bewahrt haben und die beiden Helixarme weiterhin in einem Helixstrang miteinander verknüpft waren. Lediglich die fünf Torsionswinkel im Rückgrat des kürzeren Stranges – der Knickstelle – sind variiert worden. Des weiteren ist angenommen worden, daß die Hybridisierung in der Nähe des Knickes bestehen bleibt und keinen Fluktuationen unterliegt. Die aus diesen Rechnungen resultierenden Positionen der Fluorophore im dreidimensionalen Raum sind inklusive der eingefügten Helixarme graphisch zusammengebracht worden. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-5 zu sehen. Dabei ist deutlich die Zunahme des Knickes mit steigender Anzahl an eingefügten Basen zu erkennen. Die Stelle des jeweiligen *A-bulges* ist mit einem Keil gekennzeichnet, welcher ebenfalls in der gleichen Abhängigkeit wächst. Dies demonstriert den zunehmenden Platz, den die ungepaarten Adenine – von einem über drei auf fünf – einnehmen.

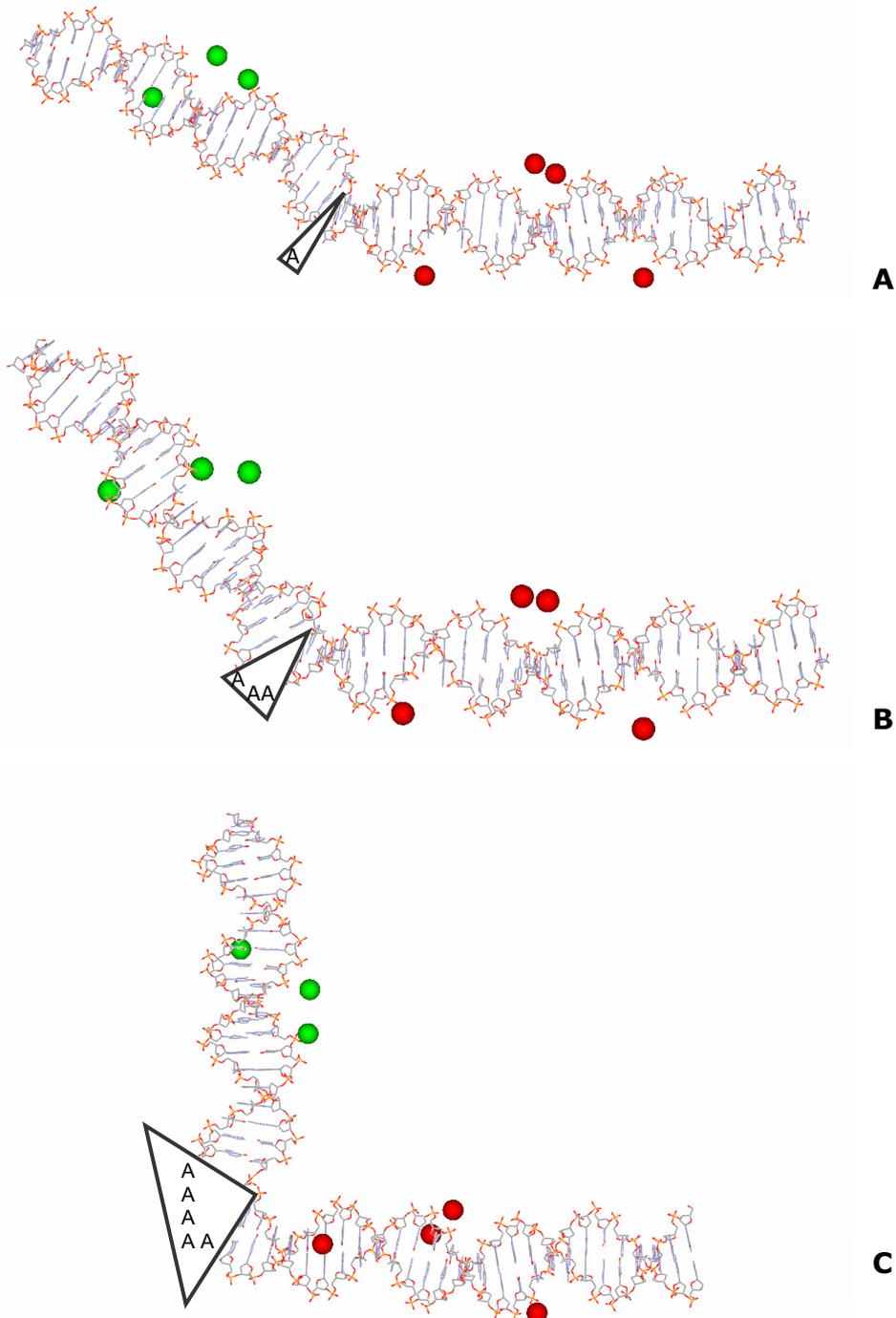


Abbildung 5-5: Resultierende Knicke in DNA-Helix aus ungepaarten Adeninen Generierung von Strukturen aus FRET-Messungen von DNA-Helices mit 1, 3 bzw. 5 (jeweils in Abbildung **A**, **B** und **C** zu sehen) ungepaarten Adeninen. Der einzelsträngige Abschnitt, welcher die herausstehenden Adenine beherbergt, ist durch den Keil repräsentiert.

Ein Versuch, die ungepaarten Adenosine in die Lücken zu modellieren, hat aufgezeigt, daß der Platz jeweils um wenige Ångström zu klein ist. Dies mag auf eine fehlerhafte Annahme bei der Berechnung des Knickes hinweisen, daß die Hybridisierung der Helix bis auf die ungepaarten Adenine bestehen bleibt. Es ist anzunehmen, daß die Basenpaarung in direkter Nachbarschaft zu dem Knick gestört

ist. Zudem ist die Modellierung der Adenosine nicht trivial und verlangt Kenntnisse über die Struktur von *bulged*-Adeninen. In der Literatur gibt es Hinweise auf ein Stapeln von einzelsträngigen Adeninen im Doppelstrang. Hierbei findet man, daß im Falle von fünf Adeninen vier gestapelt sind und das fünfte den Knick vollführt (Dornberger *et al.* 1999). Die ungepaarten Adenine in einem 3-Nukleotid-*bulge* sind ebenfalls in einer Konformation der kontinuierlichen Stapelung in der DNA-Helix vorgefunden worden (Aboul-ela *et al.* 1993; Rosen *et al.* 1992). Im Falle von einem Adenin deuten NMR-Untersuchungen auf eine Stapelung der Base innerhalb der Helix hin (Hare *et al.* 1986; Nikonowicz *et al.* 1989; Nikonowicz *et al.* 1990; Rosen *et al.* 1992; Woodson & Crothers 1988), während Röntgenkristallographiedaten auf eine extrahelikale Konformation schließen lassen (Joshua-Tor *et al.* 1992; Miller *et al.* 1988). Die MD-Simulationen eines 1A-*bulges* konnten beide Konformationen aufzeigen (Feig *et al.* 2001; Zacharias & Sklenar 1997). Da die Stapelung von Purinbasen in Lösung jedoch sehr stabil ist, sollte von einer intrahelikalen Konformation ausgegangen werden.

Um die Korrektur für die Mittelungen nochmals auf die Probe zu stellen, ist für das 3A-*bulge* der Knick auch für die nicht mittelungskorrigierten Daten angepaßt worden (Daten nicht gezeigt). Die Summe der kleinsten Quadrate beläuft sich in diesem Fall auf 1,38, was eine deutlich schlechtere Qualität der Anpassung im Vergleich zum Wert von 0,70 für die korrigierten Daten aufzeigt. Dabei sind die stärksten Abweichungen bei den Abständen 17, 22, 23 and 25 zu sehen. Dies bestätigt noch einmal, daß die Mittelungskorrekturen begründet und für die korrekte Abstandsbestimmung vonnöten sind.

5.1.2.2 Die Einführung von ungepaarten Basen führt zu Drehung, Versatz und Knicken der Helices zueinander

Um die Messungen mit anderen Experimenten vergleichen zu können und anschaulichere Parameter als die der Torsionswinkel im Knick zu generieren, sind die beiden Helixarme der modellierten Struktur auf ihre resultierende Orientierung im Raum hin untersucht worden. Die Ergebnisse für die Knickwinkel, Drehwinkel für Donor- und Akzeptorhelixarme sowie den Helixachsenversatz in numerischer Form sind Tabelle 4-4 zu entnehmen.

Eine drastischste Änderung im Knick wird im Experiment erst durch den Sprung von drei auf fünf Adenosine erreicht (von 36° auf 73°). Auch der dabei

untersuchte Versatz der beiden Achsen zueinander ist erst in diesem Fall stark ausgeprägt. Die Auswirkung auf die Drehung des Donor- sowie des Akzeptorarmes um ihre jeweilige Achse ist schwächer ausgeprägt und vor allem in der Drehrichtung unterschiedlich. So variieren beide Winkel nicht stetig mit ansteigender Anzahl von Basen. Dies läßt vermuten, daß die Konformationen, die eine, drei oder fünf Adenosine einnehmen, recht unterschiedlich sind. Es ist an dieser Stelle jedoch wichtig anzuführen, daß die besten 10.000 Konformationen, bei welchen sich unterschiedliche Kombinationen an Torsionswinkeln finden lassen, in nur einem Minimum an Knickwinkeln, Drehwinkeln und Versätzen resultieren (siehe Abbildung 4-15).

Der Vergleich der bisherigen Arbeiten auf dem Gebiet der durch ungepaarte Basen in die DNA eingeführten Knicke mit den hier vorgestellten Daten zeigt abermals die hohe Präzision und Auflösung der aufgeführten Messungen auf. Die Knickwinkel – der in der Literatur am häufigsten aufgeführte Parameter – betragen für den 1A-, 3A- bzw. 5A-*bulge* jeweils 13° , 36° bzw. 73° . Diese Winkel korrelieren gut mit dem mittels transientser elektrischer Doppelbrechung bestimmten Knickwinkel pro ungepaarte Base von $10\text{-}20^\circ$ (Zacharias & Hagerman 1995). Der aus NMR-Messungen hergeleitete Knickwinkel von $73^\circ \pm 11^\circ$ für ein 5A-*bulge* (Dornberger *et al.* 1999) stimmt mit dem in dieser Arbeit kalkulierten Wert von ebenfalls 73° hochgradig überein. Die Arbeiten zu Knicken in DNAs mittels FRET (Gohlke *et al.* 1994; Lorenz *et al.* 1999; Stühmeier *et al.* 2000) liefern nur grobe Schätzungen der Knickwinkel in den untersuchten Molekülen. FRET-Untersuchungen an 5A-*bulges* in DNA-Helices haben Knickwinkel von $95^\circ \pm 15^\circ$ (Gohlke *et al.* 1994) sowie $84^\circ \pm 3^\circ$ (Stühmeier *et al.* 2000; zwei *bulges* innerhalb einer Helix) zwischen den Helixarmen ergeben. Eine Bestimmung der Knick- und Drehwinkel der beiden an den Knick angrenzenden Helixarme mittels FRET konnte erstmalig in den vorliegenden Untersuchungen aufgezeigt werden.

5.2 RNA-Helix

Als weiteres wohldefiniertes Referenzsystem dient die A-RNA, die im Hinblick auf Untersuchungen an spleißosomalen RNA-Strukturen vermessen worden ist. Die unterschiedliche Umgebung der Fluorophore und die verkürzte Linkerlänge haben einen starken Einfluß auf die Bewegungsfreiheit der Fluorophore, was in den experimentellen Daten beobachtet werden konnte. Da in dem Fall der

RNA-Untersuchungen die MD-Simulation nur eingeschränkt gut die Meßergebnisse wiedergeben kann, wurde zusätzlich das *wobbling-in-a-cone*-Modell zu Rate gezogen, welches die begrenzte Fluorophorbeweglichkeit bestätigt hat.

5.2.1.1 Kurze Linker und eine tiefe, enge große Grube der RNA führen zu einer hohen Anisotropie

Die Messungen an der RNA-Helix unterscheiden sich relativ zu denen an der DNA-Helix nicht nur hinsichtlich des Probemoleküls, sondern auch der Linkerlänge: sie ist sowohl für den Donor als auch den Akzeptor um eine C6-Einheit kürzer. Damit liegt v.a. im Falle des Donors Alexa488 eine sehr kurze Anbindung vor, was in Kombination mit der tiefen und engen großen Grube der RNA, in welcher der Fluorophor angebunden ist, zu einem begrenzten zur Verfügung stehenden Raum führt. Experimentell zeigt sich das in der relativ hohen Anisotropie des Donors in Ab- und Anwesenheit des Akzeptors (siehe Abbildung 4-17). Zeitaufgelöste Anisotropiezerfallsmessungen zeigen für beide Fluorophore eine im Vergleich zur DNA (0,5 ns) langsame Relaxation der lokalen Bewegung im Bereich von etwa 1,5 ns. Des weiteren besitzen beide eine recht hohe Residualanisotropie (0,11 für Donor und 0,179 für Akzeptor), die nur mit der globalen Bewegung der gesamten RNA-Helix relaxiert. Die hohe Anisotropie liefert den ersten Hinweis dafür, daß der Orientierungsfaktor nicht dem dynamischen Mittel von $2/3$ entspricht (Kapitel 2.3.4) und damit bei der Bestimmung von Abständen detaillierter berücksichtigt werden muß.

Anschaulich läßt sich der Effekt der kurzen Linker und der tiefen Grube in dem Ergebnis der MD-Simulation darstellen. Abbildung 5-6 zeigt die RNA mit den modellierten Fluorophorverteilungen, wobei jeder Punkt eine mögliche Position des Fluorophors darstellt. Die hellgrauen Punkte repräsentieren den Donorfluorophor. Es ist zu sehen, daß die Verteilung tief in der großen Grube positioniert ist. Der Akzeptor, welcher in schwarz dargestellt ist, nimmt aufgrund des längeren Linkers einen größeren Raum ein.



Abbildung 5-6: MD-Simulation von Fluorophoren an A-RNA Tertiärstruktur der untersuchten A-RNA und Verteilung des Donor- und Akzeptorfluorophors, jeweils in hellgrau und schwarz. Dargestellt sind je 10.000 Positionen der Referenzatome (siehe Anhang) für den Abstand von 21 Basenpaaren.

Vergleicht man jedoch beide Verteilungen mit denen an der B-DNA aus Abbildung 4-4, wird der Unterschied schnell deutlich. Die offene DNA mit ihrer flachen großen Grube bietet den über lange Linker angebondenen Fluorophoren viel Bewegungsfreiraum, was sich in der fast kugelförmigen Verteilung der Fluorophore äußert. Diese steht im krassen Gegensatz zur sichelartigen Form, wie sie in Abbildung 5-6 zu sehen ist. In Anbetracht dessen, daß bei der Simulation die elektrostatischen Wechselwirkungen außer acht gelassen wurden, liegt es bei einer so großen Kontaktfläche zwischen Fluorophor und RNA und der Tatsache, daß beide negativ geladen sind, nahe anzunehmen, daß die Verteilung noch stärker eingeschränkt ist.

5.2.1.2 Die Fluorophore unterliegen nicht der schnellen Rotation

Wie bereits für die DNA, sind auch im Falle der RNA-Messungen die Daten der MD-Simulation dazu benutzt worden, um Energietransfereffizienzen für unterschiedliche Dynamiken vorherzusagen und zu vergleichen. Das Modell der „schnellen Rotation“, bei welcher die berechnete Ortsverteilung der Fluorophore bei der Ermittlung der Transfereffizienzen in Betracht gezogen wird, nicht aber ihre Orientierung, liefert sehr ähnliche Ergebnisse wie das helikale Modell, welches annimmt, daß sich beide Fluorophore nur einer, und zwar der berechneten mittleren Position, aufhalten (Abbildung 4-20). Dieser im Vergleich zu den Ergebnissen der DNA-Mittelungen (siehe Abbildung 4-5) nur kleine Unterschied ist wahrscheinlich auf schwächere Variationen im Abstand zurückzuführen, die wiederum auf den kleinen Wolken der Verteilung basieren (Parkhurst & Parkhurst 1995). Erst die Einbeziehung des Orientierungsfaktors κ^2 bei jedem Abstand, wie das bei dem statischen Modell der „langsamen Diffusion“ angenommen wird,

führt zu erniedrigten Transfereffizienzen. Diese Art der Mittelung liegt den experimentellen Daten am nächsten (vergleiche Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20), auch wenn sie den charakteristischen Verlauf nicht wiedergeben kann. Die langsame Bewegung der Fluorophore spiegelt sich in der experimentellen Rotationsdiffusionszeit der lokalen Bewegung der Fluorophore wider. Diese liegt sowohl für den Donor als auch für den Akzeptor bei etwa 1,5 ns, wie aus zeitaufgelösten Anisotropieuntersuchungen bestimmt worden ist, und somit in der Größenordnung der Lebensdauer. Eine komplette Mittelung der Orientierungen während des Transfers ist damit nicht möglich, und es läßt sich aussagen, daß sich die Fluorophore nicht mehr im Regime der „schnellen Rotation“ befinden, sondern einer statischeren Bewegung unterliegen.

5.2.1.3 Die Fluorophore sind in ihrem örtlichen Aufenthalt sowie ihrer lokalen Bewegung eingeschränkt

Die Anwendung des statischen Mittels auf die MD-Daten liefert von allen Modellen die beste Beschreibung der experimentellen Meßwerte. Nichtsdestotrotz gibt es deutliche Abweichungen vor allem im Verlauf der Werte in Abhängigkeit von der Anzahl an separierenden Basenpaaren. Aus diesem Grunde ist eine willkürliche Einschränkung der Fluktuationen vorgenommen worden indem eine Subpopulation aus der simulierten Fluorophorverteilung ausgewählt und nur diese der statischen Mittelung unterworfen wurde. Die daraus resultierenden Transfereffizienzen spiegeln den charakteristischen Verlauf der Meßdaten deutlich besser wider (vergleiche Abbildung 4-20 und Abbildung 4-22). Dies demonstriert, daß eine Einschränkung der simulierten Verteilung gerechtfertigt ist und den Fluorophoren real ein deutlich kleineres Raumvolumen zur Verfügung steht, als es in der einfachen MD-Simulation vorhergesagt wird. Der naheliegendste Faktor ist dabei die elektrostatische Abstoßung zwischen dem jeweiligen Fluorophor, die beide negativ geladen sind, und dem Phosphatrückgrad. Im Falle der DNA-Proben sind die Linker lang genug und die große Grube weit genug, daß die Fluorophore aus der Helix rausragen können und damit die Kontaktfläche zwischen Fluorophor und Rückgrat klein ist. Dies ist bei der RNA nicht der Fall; die kurzen Linker halten die Fluorophore in der Grube gefangen bzw. führen zu einer Bevorzugung der Positionen, bei denen der Linker ausgestreckt ist und der Fluorophor aus der Grube rausragen kann. Eine genauere Betrachtung der Einschränkung als die in dieser Arbeit willkürliche Auswahl der Subpopulation durch

das Ausschneiden eines Kugelvolumens könnte durch die Einbeziehung von Lösungsmittelmolekülen und elektrostatischen Wechselwirkungen in die Simulation erreicht werden.

Neben der örtlichen Einschränkung weisen zudem die Anisotropiemeßdaten auf eine limitierte Rotationsbewegung der Fluorophore hin (Kapitel 5.2.1.1). Wie bereits erwähnt, ist sie auf die kurzen Linker zurückzuführen, die dafür verantwortlich sind, daß die Fluorophore hauptsächlich in der engen und tiefen großen Grube der RNA-Helix gefangen sind. Die repulsiven Kräfte zwischen dem Fluorophor und dem Helixrückgrat führen zudem dazu, daß der Fluorophor eine Orientierung und Position einnehmen wird, in welcher der Abstand zum Rückgrat maximal ist. Es ist zu erwarten, daß diese zusätzliche Einschränkung der lokalen Beweglichkeit in der MD-Simulation eine noch bessere Anpassung an die experimentellen Daten liefern würde. Eine weitere Methode, die die räumliche Einschränkung explizit mit einbezieht, ist das *wobbling-in-a-cone*-Modell. Der gewünschte Freiheitsgrad der Fluorophorbewegung ist durch die Einschränkung des Kegels, in welchem sich der Fluorophor bewegen darf, realisiert worden. Die Anpassung des Modells an die experimentellen Werte lieferte ein etwas besseres Ergebnis als die MD-Simulation. Dies ist wohl damit zu begründen, daß das *wobbling-in-a-cone*-Modell eine ähnlich starke Einschränkung der Fluorophorbeweglichkeit an die Meßdaten anpaßt, wie sie aus den Anisotropiemessungen hergeleitet wurde und wie sie von der MD-Simulation nicht vorhergesagt wird. Die aus den experimentellen Anisotropiemessungen hergeleiteten Kegelwinkel der Fluorophorbewegung sind den Vorhersagen der beiden theoretischen Modelle in Tabelle 5-1 gegenübergestellt. Während aus der MD-Simulation wie erwartet zu große Winkel resultieren, kann das *wobbling-in-a-cone*-Modell die begrenzten Rotationsfreiräume von Donor (minimaler Öffnungswinkel 90°) und Akzeptor (maximaler Öffnungswinkel 40°), wie sie aus den experimentellen Daten resultieren, recht gut reproduzieren. Aus der MD-Simulation ergibt sich nur eine schwache Restriktion des Donors (minimaler Öffnungswinkel 23°) und eine vernachlässigbar kleine des Akzeptors (maximaler Öffnungswinkel 87°). Das *wobbling-in-a-cone*-Modell hingegen ist imstande, die experimentell bestimmte Einschränkung der lokalen Bewegung des Donors wiederzugeben (minimaler Öffnungswinkel $72,5^\circ$), auch wenn die Bewegung des Akzeptors weiterhin ungehindert ist (maximaler Öffnungswinkel $85,9^\circ$).

Tabelle 5-1: Werte für Beweglichkeit der Fluorophore aus experimentellen und theoretischen Daten Der fett markierte Wert stellt die direkt aus den jeweiligen Daten gewonnene Größe dar, die Umrechnung in die jeweils andere Größe geschah nach Gl. 2-18 und 2-19.

	<i>experimentelle Daten</i>	<i>MD-Simulation</i>	<i>wobbling-in-a-cone-Modell</i>
r_{∞} Donor	0,11	0,0022	0,0776
θ_{min} des Donors	90°	23°	72,5°
r_{∞} Akzeptor	0,179	0,0003	0,0006
θ_{max} des Akzeptors	40°	87°	85,9°

Zusätzlich zu den hier erwähnten und untersuchten Einflüssen der Fluorophorbewegung auf die gemessenen Transfereffizienzen sind weitere Parameter zu bedenken. Zum einen liegt mit Sicherheit auch bei der A-RNA eine sequenzabhängige Krümmung der Helix vor, wie im Laufe der Untersuchungen an der B-DNA ausführlich erörtert wurde. Hierbei wird eine sequenzabhängige Abweichung von den mittleren Werten für die Helixparameter (siehe Abbildung 1-1B), wie sie zwecks RNA-Modellierung vorausgesetzt wurden, erwartet. Es sind jedoch keine Arbeiten auf dem Gebiet bekannt, so daß eine genauere Strukturvorhersage über die in dieser Arbeit genutzte RNA-Helix nicht realisiert werden kann. Dies wiederum macht weiterführende Arbeiten auf dem Gebiet lohnenswert. Im Falle der hier vorliegenden Probe darf der Einfluß der Tertiärstruktur auf die gemessenen Transfereffizienzen jedoch nicht überschätzt werden, da der Abstand der Fluorophore zur Helixachse nicht sehr groß ist und damit Variationen wie Helizität oder Krümmungen nur schwach zum Tragen kommen. Ferner wurden FCS-Analysen an den MFD-Daten vorgenommen, die einen Aufschluß über eventuelle Fluktuationen zwischen den Fluorophoren geben sollten. Auch hier zeigten sich – wie bereits für die DNA-Messungen – im Bereich von wenigen μ s Antikorrelations-terme bei den kleinsten Abständen auf, so daß ebenfalls bei den RNA-Proben trotz der kurzen Linker von Fluorophorwechselwirkungen ausgegangen werden muß. Eine quantitative Analyse ist nicht vorgenommen worden.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die Messungen an der RNA neue Informationen zum Thema Fluorophorumgebung sowie –beweglichkeit geliefert haben. Ferner dienen die Daten als Referenz für Messungen an spleißosomalen RNA-Strukturen.

5.3 Spleißosomen

Im Laufe der Untersuchungen an der spleißosomalen RNA ist es gelungen, die Struktur der *three-way junction* der U4/U6 snRNA zu bestimmen und den *K-turn* der U4 snRNA näher zu charakterisieren. Dabei wurden am *K-turn* sowohl Bindungsstudien mit dem Protein 15.5K durchgeführt als auch die Ionenabhängigkeit der *K-turn*-Konformation untersucht. Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der *three-way junction* sind Messungen von zwölf unterschiedlichen Abständen an derselben Probe durchgeführt worden. Die Orientierung der drei Arme zueinander ist über Abstandsvergleich ermittelt worden.

Die Experimente sind dabei mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen mit Hilfe der MFD-Technik durchgeführt worden. Die gleichzeitige Messung von mehreren voneinander unabhängigen Fluoreszenzparametern ermöglicht die Kontrolle von Lösungsereignissen aufgrund von Fluorophor-Proben-Wechselwirkungen während der Messung, welche Fehler in die Abstandsbestimmung induzieren würden.

5.3.1 U4/U6 snRNA *three-way junction*

Zur Charakterisierung der spleißosomalen *three-way junction* aus dem U4/U6 Duplex sind die an die Kreuzung angrenzenden doppelhelikalen Segmente fluoreszenzmarkiert und die Abstände mittels MFD-Einzelmolekülmessungen bestimmt worden. Neben den apparaturspezifischen Korrekturen sind die experimentell bestimmten Effizienzen und Abstände zusätzlich bezüglich der Fluorophorbewegung (Kapitel 4.1.1.2; 4.2.1.2) korrigiert worden. Aus dem Vergleich der Abstände mit den Erwartungswerten an einer geraden RNA-Helix, wie sie in Kapitel 4.2 bestimmt worden sind, ist ein Modell für die Faltung der U4/U6 snRNA *three-way junction* erstellt worden, in welchem zwei der drei Helices koaxial aufeinander stapeln.

5.3.1.1 Die Umgebung der Fluorophore wirkt sich direkt auf ihre spektroskopischen Eigenschaften aus

In den spektroskopischen Studien von (Buschmann *et al.* 2003) an rot fluoreszierenden Farbstoffen ist der Einfluß von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität, Viskosität sowie von Detergenzien auf die Fluoreszenzquantenausbeute untersucht worden. Dabei ist die starke Sensitivität hydrophiler Carbocyanin-Farbstoffe auf die Viskosität der Lösung aufgezeigt worden.

Die Viskosität, und weniger die Polarität des Lösungsmittels, wirkt sich auf die cis-trans-Isomerisierung des flexiblen Polymethin-Rückgrats der Cyanine aus, was bereits von Rodriguez *et al.* demonstriert worden ist (Rodriguez *et al.* 1997). Die in dieser Arbeit untersuchten, mit Cyanin5 markierten Proben unterstreichen die Empfindlichkeit der Carbocyanin-Farbstoffe. Die Messungen zeigen deutlich den Einfluß des lokalen Umfelds auf die Quantenausbeute von Fluorophoren auf. Die U4/U6 snRNA *three-way junction* bildet dabei eine komplexe dreidimensionale Struktur aus, die in stark unterschiedlichen Mikroumgebungen resultiert und sich direkt auf die Quantenausbeuten der an unterschiedliche Positionen angeordneten Fluorophore auswirkt. Diese Wirkung wird durch eine Anbindung über kurze Linker begünstigt, da diese den Bewegungsfreiraum der Fluorophore deutlich reduzieren. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Buschmann *et al.* und Rodriguez *et al.* (Buschmann *et al.* 2003; Rodriguez *et al.* 1997) kann aus den hier vorliegenden Untersuchungen geschlossen werden, daß die starken Schwankungen in der Quantenausbeute von Cyanin5 auf Änderungen im Anteil der cis-trans-Fluktuation basieren.

Die Auswirkung des kurzen Linkers auf die Fluorophorbeweglichkeit ist bereits bei den Messungen an der RNA-Helix festgestellt worden. Bei diesen Untersuchungen lag eine den U4/U6-Messungen entsprechende Ankopplung der Fluorophore sowie analoge Form des Probemoleküls vor. Neben der Quantenausbeute spiegelt sich die kurze Anbindung auch in einer eingeschränkten Beweglichkeit wider, was in der hohen Anisotropie sichtbar wird. Dies führt zu einer Unsicherheit im Orientierungsfaktor. Der darin enthaltene Fehler wirkt sich direkt auf die bestimmten Abstandswerte aus (Lakowicz 1999). Der große Fehler im Orientierungsfaktor führt zwangsweise zu einem großen Fehler in der Abstandsbestimmung. Den experimentellen Daten kann kein diskreter Wert zugeordnet werden, sondern lediglich ein Wertintervall. Eine Konformationsanalyse, wie sie für die DNA durchgeführt worden ist (Kapitel 5.1.2) und bei welcher Knick- und Drehwinkel bestimmt wurden, ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Die aus den MFD-Messungen hergeleitete zweidimensionale Struktur der U4/U6 snRNA *three-way junction* wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

5.3.1.2 Stamm II und 5'-terminale Haarnadelschleife bilden eine koaxiale Helixstapelung aus

Diverse Untersuchungen an DNA- und RNA-*three-way junctions* haben aufgezeigt, daß für gewöhnlich zwei der drei Helices eine durchgängige Helix ausbilden (zusammengefaßt in (Lilley 2000)). Dies wird vor allem durch moderate Salzkonzentrationen und fehl-/ungepaarte Basen begünstigt (siehe auch Kapitel 1.3.1.1). Die vorliegenden Messungen an der U4/U6 snRNA sind bei einer Magnesium-Konzentration von 5 mM durchgeführt worden. Die Mg^{2+} -Ionen schirmen die negative Ladung des Phosphorsäure-Rückgrats der Helices ab und sollten folglich eine eventuelle Faltung der Helices ermöglichen. Bei der U4/U6 *three-way junction* handelt es sich um eine $2SH_3SH_2$ Kreuzung, was bedeutet, daß sich in jedem der drei Stämme ungepaarte Basen befinden. Es ist anzunehmen, daß dabei die Einzelstränge in Stamm II untereinander nicht-kanonische Paarungen eingehen. Die fehl- und ungepaarten Basen erhöhen die Flexibilität bei der Faltung der Helices. Um nun herauszufinden, welche zwei der drei Helices eine koaxiale Stapelung ausbilden, sind verschiedene Abstände an der spleißosomalen U4/U6 snRNA experimentell bestimmt worden. Mit Hilfe von vorhergehenden Messungen an einer vollständig kanonisch gepaarten RNA-Helix konnten die experimentellen Daten entsprechend dem gültigen Mittelungsregime für die Bewegung der Fluorophore korrigiert und ein Fehler in der Abstandsbestimmung geschätzt werden. Zudem dienten die Daten der A-RNA als Referenz für eine Stapelung. Aus der Betrachtung der korrigierten Abstände ist zu erkennen, daß die gemessenen Abstände zwischen dem Stamm II und der 5'-terminalen Haarnadelschleife am besten mit denen innerhalb einer geraden A-RNA übereinstimmen (siehe Abbildung 4-27). Das aus den MFD-FRET-Messungen resultierende Schema für die Faltung der U4/U6 snRNA ist in Abbildung 5-7 dargestellt.

Eine Vergleichsmöglichkeit der Faltung bietet das Hammerkopf-Ribozym, welches eine $HS_1HS_7HS_3$ Kreuzung enthält und deren *three-way junction*-Struktur mittels Röntgenkristallographie bestimmt worden ist (Scott *et al.* 1995). Sowohl das Hammerkopf-Ribozym als auch die U4/U6 snRNA enthalten in allen Stämmen ungepaarte Basen und zudem die Möglichkeit zur Fehlpaarbildung. In beiden Fällen knickt derjenige Helixstamm ab, welcher auf einer Seite die meisten und auf der anderen Seite die wenigsten ungepaarten Basen enthält. Die zwei anderen Stämme führen dabei eine koaxiale Helixstapelung durch.

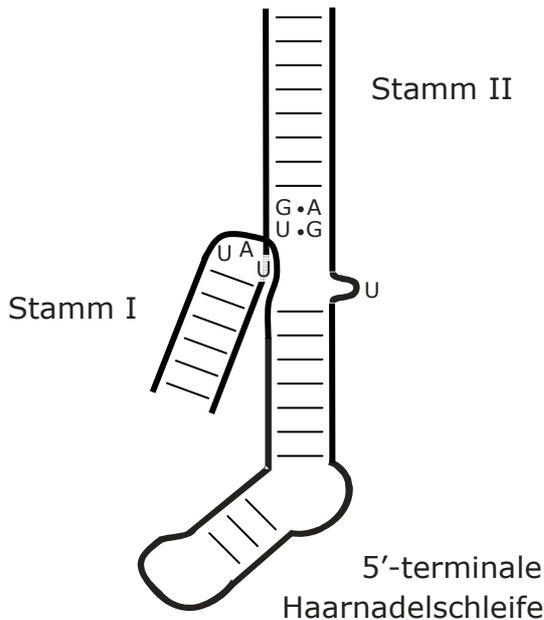


Abbildung 5-7: Schema der Helixstapelung in der U4/U6 snRNA Stamm II vollzieht mit der 5'-terminalen Haarnadelschleife eine koaxiale Stapelung. Die nicht Watson-Crick-gepaarten Basen in der *three-way junction* sind hervorgehoben.

Im Falle der U4/U6 snRNA *three-way junction* ist es der Stamm I, der abknickt, da er angrenzend an die 5'-terminale Haarnadelschleife drei ungepaarte Basen enthält während auf der anderen Seite in Richtung Stamm II lediglich zwei nicht-kanonisch gepaarte Basen sitzen (siehe Abbildung 5-7). Das Fehlen von ungepaarten Basen zwischen Stamm I und II führt dazu, daß hier nur ein schwacher Knick ausgeführt werden kann und Stamm I sich somit an die 5'-terminale Haarnadelschleife anlagert. Der damit einhergehende scharfe Knick zwischen dem Stamm I und der 5'-terminalen Haarnadelschleife wird durch die drei ungepaarten Basen UAU zwischen den Stämmen ermöglicht.

Eine kürzlich veröffentlichte Homologiestudie von *three-way junctions*, die ebenfalls die U4/U6 snRNA beinhaltet, macht eine analoge Strukturvorhersage der Faltung (Lescoute & Westhof, 2006). Folglich eignen sich MFD-FRET-Untersuchungen hervorragend zur Bestimmung der Konformation von biologischen Molekülen. Eine genauere Berechnung der Helixorientierungen bei weiterführenden Untersuchungen wäre nichtsdestotrotz wünschenswert. Hierzu wäre eine Modifizierung der nativen Struktur vonnöten: Zum einen sollten die drei Stämme verlängert werden, um auch größere Abstände, die im allgemeinen genauer zu bestimmen sind, messen zu können. Zum anderen sollten die drei Stämme so modifiziert werden, daß alle Basen miteinander kanonische Paarungen eingehen würden und damit die Stämme geraden Helices entsprechen würden. Lediglich die native Sequenz im Bereich der *three-way junction* sollte vollständig erhalten bleiben. Zudem wäre ein weniger umgebungsabhängiger Akzeptor-Fluorophor als Cy5 und eine längere Linkerlänge vorzuziehen.

5.3.2 *K-turn* der humanen U4 snRNA unter Einfluß vom 15.5K Protein

Um den Knickwinkel, den das *K-turn*-Motiv der humanen U4 snRNA in die RNA induziert, in Lösung zu bestimmen und die Bindung des 15.5K Proteins zu charakterisieren, sind drei unterschiedliche Konstrukte in Anlehnung an das Motiv entwickelt worden: Das erste enthält das native Bindungsmotiv, das zweite ein modifiziertes Bindungsmotiv, bei welchem ein *bulged-A* entfernt und eine G•U Fehlpaarung gegen ein G-C-Paar ausgetauscht wurde, und das dritte ist eine lineare A-RNA zu Kontrollzwecken. Hierbei soll noch angemerkt werden, daß das modifizierte Konstrukt lediglich der Motive entledigt wurde, die nach (Klein *et al.* 2001) nicht zu der Konsensussequenz des *K-turns* gehören (siehe Abbildung 1-6).

Die Spleißosomexperimente haben das Potential der MFD-FRET-Einzelmolekülmessungen demonstriert, unterschiedliche Spezies einer Probe diskriminieren und intramolekulare Abstandsbestimmungen für jede Spezies innerhalb einer Messung durchführen zu können. Des weiteren wurden sowohl die FCS als auch die Zeitfensteranalyse dazu herangezogen, eventuelle Dynamiken zwischen den Spezies zu verfolgen. Die Schlüsse aus den Untersuchungen sollen im folgenden aufgeführt werden.

5.3.2.1 Sowohl der native als auch der modifizierte *K-turn* führen einen Knick in die RNA ein

Zur Charakterisierung des *K-turn*-Motivs in Lösung sind intramolekulare Abstände innerhalb der drei oben aufgeführten Konstrukte mittels MFD-Einzelmolekülmessungen bestimmt worden (siehe Abbildung 4-29, Graphen a bis c). Dabei wurde sowohl für das native als auch das modifizierte Bindungsmotiv ein deutlich kleinerer Abstand als für die gerade Referenzhelix gemessen. Der Unterschied von 9 Å läßt den Schluß zu, daß das *K-turn*-Motiv der U4 snRNA einen Knick in die RNA induziert, wie es bereits für andere *K-turn*-Motive mittels Röntgenkristallographie und NMR gezeigt wurde (Klein *et al.* 2001; Mao *et al.* 1999; Nissen *et al.* 2001). Da es sich bei der Struktur um ein Proteinbindemotiv handelt, wurde seine Konformation in den meisten Fällen im Komplex mit dem entsprechenden Protein determiniert. Die hier vorliegenden Messungen zeigen auf, daß der Knick im Falle des *K-turns* der 5'-terminalen Haarnadelschleife der

U4 snRNA bereits ohne Protein vorliegt. Des Weiteren hat die Messung desselben Abstandes von $56 \pm 3 \text{ \AA}$ für das modifizierte wie für das native Konstrukt veranschaulicht, daß bereits die Konsensussequenz nach D.J. Klein (Klein *et al.* 2001) aus Abbildung 1-6 genügt, um den Knick zu induzieren. Das *bulged-A* und die Fehlpaarung sind für die Ausbildung des *K-turns* nicht essentiell.

5.3.2.2 Die Bindung des 15.5K Proteins führt einen starken Knick ein

Die Messungen an der U4 snRNA *K-turn*/15.5 Protein-Mischung zeigen zwei FRET-aktive Spezies im 2D-Histogramm, welche die RNA-Duplex und den RNA/15.5-Komplex repräsentieren. Dies deutet darauf hin, daß der U4 snRNA *K-turn* nur zwei bevorzugte Konformationen besitzt, nämlich eine ungefaltete und eine gefaltete. Die Tatsache, daß die beiden Spezies separat voneinander detektiert werden, zeigt, daß die Aufenthaltsdauer der Spezies in der jeweiligen Konformation deutlich länger als die Beobachtungszeit von mehreren Millisekunden bei der Diffusion durch das Anregungsvolumen ist. Eine schnellere Dynamik als die Diffusionszeit würde zu einem Vermischen der beiden Konformationen innerhalb eines Bursts und damit zu einer Mittelung der Abstände führen. Folglich muß es sich um einen raren und schnellen Übergang handeln. Um dies zu bestätigen, sind die Bursts in Abschnitte von 1 ms unterteilt worden (Zeitfensteranalyse, Daten nicht dargestellt), es konnte aber auch in diesem Zeitbereich kein Umschalten zwischen den Konformationen beobachtet werden. Der Versuch eines Nachweises von schnelleren Dynamiken wurde weiterhin mittels speziesselektiver FCS an der proteinungebundenen RNA-Duplex durchgeführt. Sie sollte aufklären, ob der für diese Spezies bestimmte Abstand eine Mittelung aus der gefalteten Konformation, wie sie im Komplex mit dem 15.5K Protein vorliegt, und einer noch offeneren Konformation darstellt, oder ob es sich dabei um eine statische Spezies handelt. Die FCS-Analyse zeigte keine zusätzliche Antikorrelation bis in den Bereich von $10 \mu\text{s}$, und eine signifikante Fluktuation bis in den sub- μs -Bereich, die den Triplett-Term überlagern würde, konnte auch nicht beobachtet werden. Beide Analysen zeigen auf, daß die ungefaltete Konformation (gekennzeichnet durch die Linie III in Abbildung 4-29) wirklich nur eine Spezies darstellt und nicht aus der Mittelung von unterschiedlich langlebigen (μs -ms) Konformationen resultiert. Die Abwesenheit von jenen langlebigen gefalteten Konformationen weist weiterhin darauf hin, daß die Komplexbildung von dem U4 snRNA *K-turn* und dem 15.5K Protein entweder durch einen

induced-fit (engl.; induzierte Anpassung) Prozeß oder durch das konformationelle Einfangen einer kurzlebigen Konformation geschieht. Hierzu hat V. Cojocaru in einer Molekulardynamik-Simulation gezeigt, daß sich der U4 snRNA *K-turn*, wie er im Kristall mit dem 15.5K Protein vorliegt (Abbildung 1-7), in Abwesenheit des Proteins bereits nach 10 ns teilweise entfaltet (Cojocaru *et al.* 2005).

Der Einfluß des 15.5K Proteins auf die Struktur des U4 snRNA 5'-terminalen Haarnadelschleife muß noch weiter untersucht werden. Die Messungen sind zwar an dem nativen Motiv durchgeführt worden, jedoch wurde die UUUAU-Schleife, die im übrigen in der Kristallstruktur nicht aufgelöst war, durch ein doppelhelikales RNA-Segment ersetzt (Vergleich Abbildung 1-6 und Konstrukt Up1Down der Abbildung 4-28). Letzteres sollte zu einer Stabilisierung der Hybridisierung führen und damit auch die gefaltete Konformation des *K-turn*-Motivs stabilisieren. Die geschlossene Struktur ist jedoch nur in der Anwesenheit des 15.5K Proteins beobachtet worden. Somit kann gefolgert werden, daß auch der U4 snRNA *K-turn* der 5'-terminalen Haarnadelschleife in Abwesenheit des 15.5K Proteins aufgrund der schwächeren Stabilisierung ungefaltet vorliegt und die Faltung erst durch Proteinbindung, so wie sie in der Kristallstruktur zu sehen ist, stattfindet.

5.3.2.3 Weder Natrium- noch Magnesium-Ionen können einen starken Knick induzieren

Die Faltung von RNA-Strukturen ist oft von der Wechselwirkung mit Ionen abhängig. Die hier aufgeführten Messungen an dem U4 snRNA *K-turn*-Motiv enthüllten einen Konformationsübergang, welcher durch Na⁺- und Mg²⁺-Ionen bei Konzentrationen von jeweils zwischen 20 und 100 mM bzw. unter 0.1 mM induziert werden kann (Graphik 4-29 a und b). Ein ähnliches Ergebnis wurde von T.A. Goody für das KT-7-Motiv der Helix 7 aus der 23S rRNA mittels Frequenzdomänen-Lebensdauer-messungen gefunden (Goody *et al.* 2004). Dies deutet darauf hin, daß das ungefaltete U4 snRNA *K-turn*-Motiv eine stärker geöffnete Konformation adaptiert, welche durch die Bindung von Na⁺- and Mg²⁺-Ionen stabilisiert wird. Jedoch ist im Kontrast zum KT-7 *K-turn*-Motiv die Bindung von Ionen nicht hinreichend, um die stark geknickte Konformation zu induzieren, wie sie in Gegenwart des 15.5K Proteins aufzufinden ist.

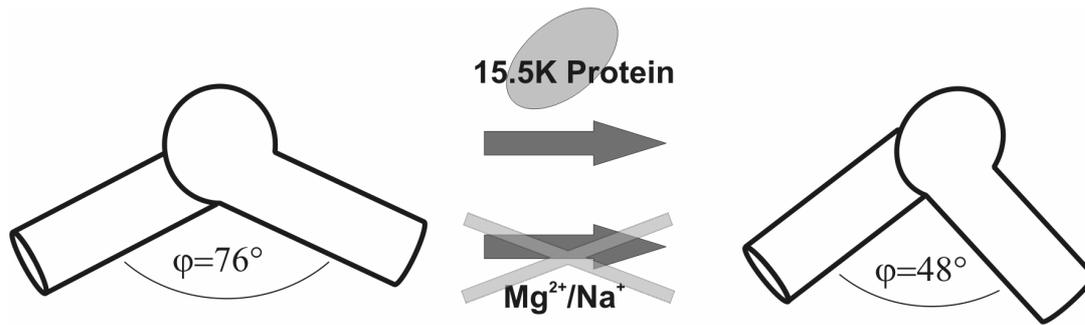


Abbildung 5-8: Schema der Knickinduktion in der 5'-terminalen Haarnadelschleife der U4 snRNA Das 15.5K Protein induziert eine starke Konformationsänderung im *K-turn*, die allein in der Gegenwart von Mg^{2+} - oder Na^+ -Ionen nicht beobachtet werden kann.

Da im Experiment einzelne Moleküle betrachtet werden, die durch das konfokale Anregungsvolumen diffundieren, würden neue, langlebige (mehrere ms andauernde) Konformationen, die durch die Bindung von Ionen an das *K-turn*-Motiv entstehen würden, als neue Spezies im 2D-Histogramm erscheinen. Dies wird jedoch nicht beobachtet. Ebenfalls hat weder die Analyse von individuellen Zeitspuren noch eine spezies-selektive Korrelationsanalyse bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen ein Umschalten zwischen verschiedenen Konformationen aufgedeckt. Dieses Ergebnis und die hohe nötige Konzentration an monovalenten Ionen, um den Konformationsübergang zu induzieren, deuten darauf hin, daß die Ionen mit dem U4 snRNA *K-turn* mittels eines diffusen Mechanismus wechselwirken. Ihre Bindung ist jedoch nicht spezifisch und sie können auch keinen Konformationsübergang in die vollständig gefaltete Struktur induzieren.

Die Interpretation der Salzabhängigkeit muß jedoch mit Vorsicht gehandhabt werden, da auch im Falle der doppelhelikalen Referenzhelix, die kein Bindungsmotiv enthält, eine Abhängigkeit des Abstandes von der Ionenkonzentration beobachtet werden konnte (Abbildung 4-31 c und d). Solch eine Änderung im Abstand könnte durch Strukturumwandlungen in der RNA-Helix erklärt werden. Eine durch die Bindung von Ionen hervorgerufene elektrostatische Abschirmung des RNA-Rückgrats könnte damit in einer Stauchung der Helix resultieren. Des weiteren kann ein schwacher Einfluß der Ionen auf die Beweglichkeit der Fluorophore nicht ganz ausgeschlossen werden und würde zu einer Mißinterpretation als Konformationsänderung der RNA-Helix führen. Zu dem Einfluß auf die Beweglichkeit sind jedoch keine Hinweise aus der Betrachtung der Anisotropie zu entnehmen.

Auch wenn die Ionen einen schwachen Einfluß die U4 snRNA *K-turn*-Struktur haben, so zeigen die Messungen doch eindeutig auf, daß sie die stark geknickte

Konformation, wie sie vom 15.5K Protein induziert wird, nicht einführen können. So wurden auch keine lokalisierten Mg^{2+} -Ionen in der Kristallstruktur des U4 snRNA *K-turn*/15.5K-Komplexes gefunden (Vidovic *et al.* 2000). Dies zeigt, daß die Ionen nicht bei der Stabilisierung der gefalteten Konformation beteiligt sind.

5.3.2.4 Die Struktur des *K*-turns in Lösung entspricht derjenigen im Kristall

Um die gemessenen Abstände mit Modellstrukturen vergleichen zu können, müssen die Positionen der Fluorophore mit in Betracht gezogen werden. Um die örtliche Unsicherheit, welche durch die Länge der Linker eingeführt wird, mit einzubeziehen, ist ein Satz von 10.000 möglichen Positionen der Fluorophore mittels MD-Simulationen berechnet worden, bei welchen nur sterische Hindernisse in Betracht gezogen worden sind. Die Position des Fluorophors ist durch die Bildung einer Mittelung abgeschätzt worden. Die Struktur des RNA-Protein-Komplexes ist durch die Verlängerung der Kristallstruktur des U4 snRNA *K-turns* mit helikalen Armen modelliert worden. Die mittleren Positionen der Fluorophore an der Referenzhelix und dem *K-turn*/15.5K-Komplex sind in Abbildung 5-9 dargestellt.

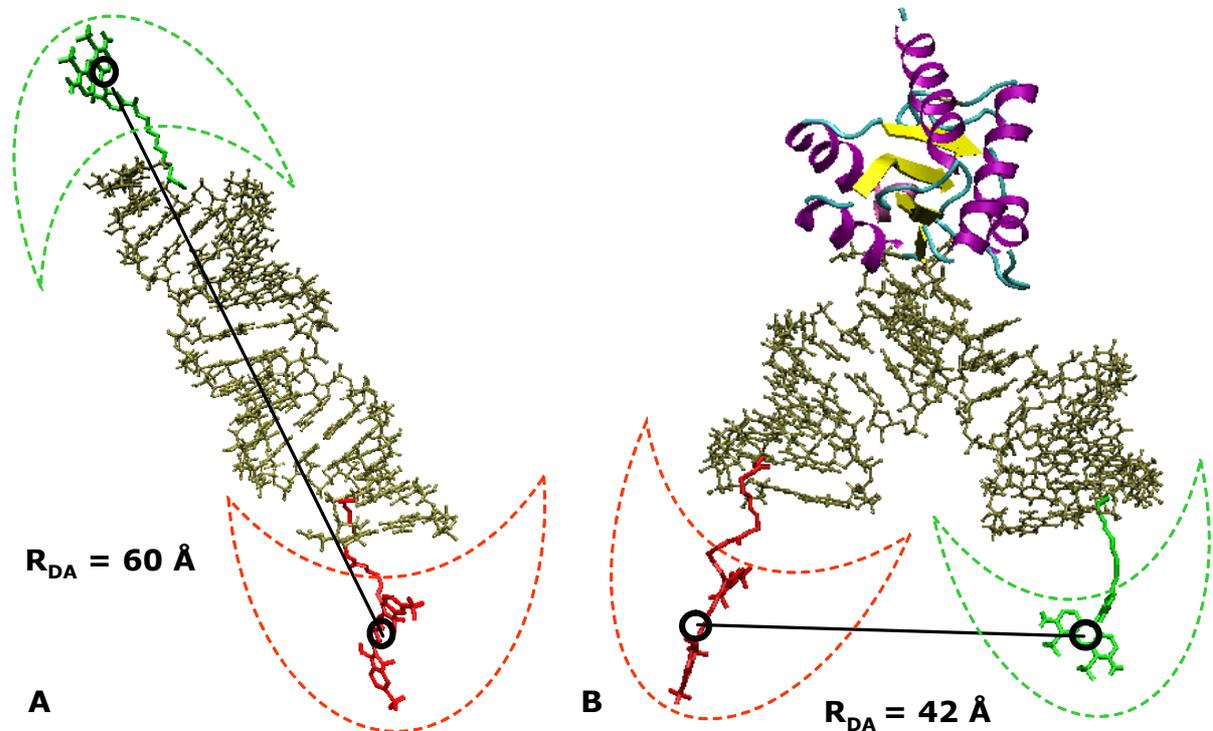


Abbildung 5-9: Mittlere Fluorophorposition aus MD-Simulation an spleißosomalen Konstrukten Mittlere Position von Alexa488 (grün) und Cy5 (rot) an den Konstrukten Up3Down (A) und Up1Down/15.5K-Komplex (B). Die gestrichelt umrandete Fläche deutet die Fluorophorverteilung aus der MD-Simulation an.

Der Vergleich der gemessenen Abstände mit den aus den Konstrukten modellierten Abständen zeigt, daß die Struktur des gefalteten U4 snRNA *K-turn*-Motivs in Lösung der Kristallstruktur sehr ähnlich ist. Darauf deuten auch die geschätzten interhelikalen Winkel, welche in Tabelle 5-2 zusätzlich zu den Abständen aufgeführt sind.

Tabelle 5-2: Abstände und interhelikale Winkel für unterschiedliche Proben Sowohl für die lineare Referenzhelix als auch den *K-turn*/15.5 Protein-Komplex ist eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den modellierten Abständen gefunden worden.

	<i>MFD-FRET-Messungen</i>		<i>MD-Simulation</i>	
	Abstand	Interhelikaler Winkel	Abstand	Interhelikaler Winkel
Referenzhelix	65 ±2,5 Å	180°	60 ±9,5 Å ¹	180° ¹
Natives Bindungsmotiv	56 ±3 Å	76 ±15°		
Natives Bindungsmotiv +15.5K Protein	45 ±2 Å	48 ±15°	42 ±11 Å ²	53° ²

¹ A-RNA
² Kristallstruktur

So beträgt der Winkel zwischen den Helixarmen für das native Bindungsmotiv in Abwesenheit des 15.5K Proteins 76° ±15° und wird durch die Bindung des Proteins auf 48° ±15° gesenkt. Letzteres ist in guter Übereinstimmung mit den 53° des Knickes des RNA-Duplex in der Kristallstruktur.

5.4 MFD-Imaging

Die MFD-Imaging-Experimente stellen Machbarkeitsstudien zu Diffusions- und Beweglichkeitsuntersuchungen von fluoreszenzmarkierten Proben in Zellen dar. Sie sollen zum einen die Entwicklung der Apparatur und der Programme für das MFD-Imaging im Rasterverfahren in der Gruppe von Prof. Seidel demonstrieren. Zum anderen werden die Bedingungen für die Zellkultur bezüglich einer möglichst niedrigen Autofluoreszenz in den Zellen optimiert.

5.4.1 Diffusionsmessungen in Sepharose-Kugeln

Mit der Messung von sich frei bewegenden Fluorophoren innerhalb und außerhalb von Sepharose-Kugeln wird ein Modell geschaffen, bei welchem die Moleküle in unterschiedlich dichten Medien diffundieren. Auf diese Weise kann eine unterschiedliche Beweglichkeit desselben Moleküls in Abhängigkeit vom Aufenthaltsort simuliert werden. Die Detektion von Photonen im Rasterverfahren liefert ein Bild der Fluoreszenz innerhalb und außerhalb der Sepharose-Kugel. Die Berechnung der pixelweisen FCS dieser Photonen ermöglicht die Bestimmung der Diffusionszeit und bei genügender Photonenanzahl auch die Rotationszeit der Moleküle in einem beliebigen Bildausschnitt. In den vorliegenden Messungen (Abbildung 4-33) wird das an der Bestimmung der FCS und der daraus ersichtlichen Diffusionszeit von Rh110 bzw. Alexa488-markierter, einen *3A-bulge* enthaltender DNA-Helix demonstriert. In der FCS kann eine deutliche Behinderung der Diffusion des jeweiligen Moleküls durch das Sepharosenetzwerk beobachtet werden. Die erhöhten Anisotropiewerte innerhalb der Sepharose-Kugel lassen zudem auf eine Erhöhung der Rotationskorrelationszeit schließen, also auch hier auf eine behinderte Bewegung. Insgesamt zeigen die Messungen die Möglichkeit auf, unterschiedliche Beweglichkeiten an verschiedenen Orten in der Zelle quantitativ und bildgebend in einem pixelweisen Verfahren auswerten zu können.

5.4.2 Fluoreszenzhintergrund in Zellen

Eine FCS-Kurve mit einer guten Auflösung des Diffusionstermes kann nur generiert werden, wenn die vom untersuchten Fluorophor stammenden Fluktuationen sich in der Intensität vom Hintergrundsignal abheben. Werden die Fluoreszenzmessungen in Zellen durchgeführt, so kann deren Autofluoreszenz eine FCS-Auswertung erheblich erschweren, sofern die Autofluoreszenz um ein vielfaches stärker als das eigentliche Fluoreszenzsignal ist. Aus diesem Grunde sind in Aussicht auf zukünftige FCS-Messungen in Zellen mittels MFD-Imaging die Bedingungen der Zellkultur optimiert worden. Die Messungen zeigen die ersten Bilder in Zellen auf (Abbildung 4-34). Demnach sollte für die Zellkultur das Medium F12 verwendet werden, wahlweise könnten noch weitere Untersuchungen mit M199 durchgeführt werden, da es die niedrigste Konzentration an Riboflavin und gar kein Phenolrot enthält. Nach den Intensitätsmessungen zu urteilen sollten die zukünftigen FCS-Messungen nach Möglichkeit im Zellkern

durchgeführt werden, da jener die niedrigste Autofluoreszenz in der ganzen Zelle aufweist. Eine weitere Möglichkeit, die Fluoreszenz des untersuchten Moleküls vom Hintergrund zu unterscheiden, ist die Lebensdauer im jeden Pixel zu bestimmen. Aus MFD-Imaging-Messungen resultierende Lebensdauerbilder sind bereits in der Dissertation von M. König vorgestellt worden (König 2005). Das MFD-Imaging bietet somit wie auch die MFD-Einzelmolekülmessungen durch die Auswertung mehrerer Parameter eine Kontrolle der Ergebnisse.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABOUL-ELA,F., MURCHIE,A.I., HOMANS,S.W., und LILLEY,D.M.J., "Nuclear magnetic resonance study of a deoxyoligonucleotide duplex containing a three base bulge." (1993), *J Mol Biol*, **229(1)**, 173-188.
- AUFFINGER,P., BIELECKI,L., und WESTHOF,E., "Anion binding to nucleic acids." (2004), *Structure*, **12**, 379-388.
- BAN,N., NISSEN,P., HANSEN,J., MOORE,P.B., und STEITZ,T.A., "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution." (2000), *Science*, **289(5481)**, 905-920.
- BHATTACHARYYA,A. und LILLEY,D.M.J. , "The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles)." (1989), *Nucleic Acids Res*, **17(17)**, 6821-6840.
- BERENDSEN,H.J.C., SPOEL,D., und DRUNEN,R., "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation." (1995), *Comp.Phys.Comm.*, **91**, 43-56.
- BERGER,S., "Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie." (2001), Dissertation.
- BORDONNE,R., BANROQUES,J., ABELSON,J., und GUTHRIE,C., "Domains of yeast U4 spliceosomal RNA required for PRP4 protein-binding,snRNP-snRNP interactions, and pre-messenger-RNA splicing in vivo." (1990), *Genes & Development*, **4(7)**, 1185-1196.
- BRAND,L., "Zeitaufgelöster Nachweis einzelner Moleküle in Lösung." (1998), Dissertation.
- BRAND,L., EGGELING,C., ZANDER,C., DREXHAGE,K.H., und SEIDEL,C.A.M., "Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection - comparison of one- and two-photon excitation in solution." (1997), *Journal of Physical Chemistry A*, **101(24)**, 4313-4321.
- BROW,D.A. und GUTHRIE,C., "Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals." (1988), *Nature*, **334(6179)**, 213-218.
- BURGE,C.B., SHARP,P.A., und TUSCHL,T., "Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome." (1999) in Gesteland, R.F., Atkins, J.F., und Cech, T.R., "The RNA World", Second Edition, 525-560.
- BUSCHMANN,V., WESTON,K.D., und SAUER,M., "Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes." (2003), *Bioconjugate Chemistry*, **14(1)**, 195-204.
- CANTOR,C.R. und SCHIMMEL,P.R., "Biophysical Chemistry Part I: The conformation of biological macromolecules." (1980), W.H.Freeman and Company, San Francisco.
- CATE,J.H., GOODING,A.R., PODELL,E., ZHOU,K.H., GOLDEN,B.L., KUNDROT,C.E., CECH,T.R., und DOUDNA,J.A., "Crystal structure of a group I ribozyme domain: Principles of RNA packing." (1996), *Science*, **273(5282)**, 1678-1685.

- CLEGG,R.M., "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids." (1992), *Methods in Enzymology*, **211**, 353-388.
- CLEGG,R.M., MURCHIE,A.I.H., ZECHEL,A., und LILLEY,D.M.J., "Observing the helical geometry of double-strand DNA in solution by fluorescence energy transfer." (1993), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 2994-2998.
- COJOCARU,V., NOTTROT,S., KLEMENT,R., und JOVIN,T.M., "The snRNP 15.5K protein folds its cognate K-turn RNA: A combined theoretical and biochemical study." (2005), *RNA*, **11(2)**, 197-209.
- DALE,R.E. und EISINGER,J., "Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor." (1974), *Biopolymers*, **13**, 1573-1605.
- DALE,R.E. und EISINGER,J., "Polarized Excitation Energy Transfer." (1975) in Chen, R.F. und Edelhoch, H., "Biochemical Fluorescence: Concepts Vol. 1", 115-284.
- DALE,R.E., EISINGER,J., und BLUMBERG,W.E., "Orientational freedom of molecular probes - Orientation factor in intra-molecular energy transfer." (1979), *Biophysical Journal*, **26(2)**, 161-193.
- DENIZ,A.A., DAHAN,M., GRUNWELL,J.R., HA,T.J., FAULHABER,A.E., CHEMLA,D.S., WEISS,S., und SCHULTZ,P.G., "Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations." (1999), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96(7)**, 3670-3675.
- DENIZ,A.A., LAURENCE,T.A., BELIGERE,G.S., DAHAN,M., MARTIN,A.B., CHEMLA,D.S., DAWSON,P.E., SCHULTZ,P.G., und WEISS,S., "Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2." (2000), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97(10)**, 5179-5184.
- DICKERSON,R.E., "Definitions and nomenclature of nucleic-acid structure parameters." (1989), *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **6 (4)**, 627-634.
- DLAKIC,M. und HARRINGTON,R.E., "DIAMOD: display and modeling of DNA bending." (1998), *Bioinformatics*, **14(4)**, 326-331.
- DORNBERGER,U., HILLISCH,A., GOLLMICK,F.A., FRITZSCHE,H., und DIEKMANN,S., "Solution structure of a five-adenine bulge loop within a DNA duplex." (1999), *Biochemistry*, **38(39)**, 12860-12868.
- EGGELING,C., "Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie." (1999), Dissertation.
- EGGELING,C., BERGER,S., BRAND,L., FRIES,J.R., SCHAFFER,J., VOLKMER,A., und SEIDEL,C.A.M., "Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection." (2001), *Journal of Biotechnology*, **86(3)**, 163-180.
- EGGELING,C., FRIES,J.R., BRAND,L., GÜNTHER,R., und SEIDEL,C.A.M., "Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy." (1998), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1556-1561.

-
- EGGELING,C., KASK,P., WINKLER,D., und JAGER,S., "Rapid analysis of Forster resonance energy transfer by two-color global fluorescence correlation spectroscopy: Trypsin proteinase reaction." (2005), *Biophysical Journal*, **89(1)**, 605-618.
- EGGELING,C., WIDENGREN,J., RIGLER,R., und SEIDEL,C.A.M., "Photostabilities of fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy: Mechanisms and experimental methods for estimating photobleaching in aqueous solution." (1999) in Rettig, W., Strehmel, B., Schrader, M., und Seifert, H., "Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine", 193-240.
- EHRENBERG,M. und RIGLER,R., "Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations." (1974), *Chemical Physics*, **4**, 390-401.
- EIGEN,M. und RIGLER,R., "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology." (1994), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5740-5747.
- EPE,B., STEINHAUSER,K.G., und WOOLLEY,P., "Theory of measurement of Forster-type energy transfer in macromolecules." (1983), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80(9)**, 2579-2583.
- FEIG,M., ZACHARIAS,R., und PETTITT,B.M., "Conformations of an adenine bulge in a DNA octamer and its influence on DNA structure from molecular dynamics simulations." (2001), *Biophysical Journal*, **81(1)**, 352-370.
- FELEKYAN,S., KUHNEMUTH,R., KUDRYAVTSEV,V., SANDHAGEN,C., BECKER,W., und SEIDEL,C.A.M., "Full correlation from picoseconds to seconds by time-resolved and time-correlated single photon detection." (2005), *Review of Scientific Instruments*, **76(8)**, 083104-1-083104-14.
- FORSTER,A.C. und SYMONS,R.H., "Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites." (1987), *Cell*, **49(2)**, 211-220.
- FÖRSTER,T., "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." (1948), *Annalen der Physik*, **2**, 55-75.
- GABRIELIAN,A. und PONGOR,S., "Correlation of intrinsic DNA curvature with DNA property periodicity." (1996), *FEBS Letters*, **393(1)**, 65-68.
- GOHLKE,C., MURCHIE,A.I.H., LILLEY,D.M.J., und CLEGG,R.M., "Kinking of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer." (1994), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 11660-11664.
- GOODSELL,D.S. und DICKERSON,R.E., "Bending and curvature calculations in B-DNA." (1994), *Nucleic Acids Research*, **22(24)**, 5497-5503.
- GOODWIN,P.M., AMBROSE,W.P., und KELLER,R.A., "Single-molecule detection in liquids by laser-induced fluorescence (Review)." (1996), *Accounts of Chemical Research*, **29(12)**, 607-613.
- GOODY,T.A., MELCHER,S.E., NORMAN,D.G., und LILLEY,D.M.J., "The kinK-turn motif in RNA is dimorphic, and metal ion-dependent." (2004), *RNA*, **10**, 254-264.
- GREEN,M.R., "Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-messenger-RNA splicing." (1991), *Annual Review of Cell Biology*, **7**, 559-599.

- HA,T., ENDERLE,T., OGLETREE,D.F., CHEMLA,D.S., SELVIN,P.R., und WEISS,S., "Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor." (1996), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 6264-6268.
- HA,T., TING,A.Y., LIANG,J., CALDWELL,W.B., DENIZ,A.A., CHEMLA,D.S., SCHULTZ,P.G., und WEISS,S., "Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism." (1999a), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96(3)**, 893-898.
- HA,T., ZHUANG,X.W., KIM,H.D., ORR,J.W., WILLIAMSON,J.R., und CHU,S., "Ligand-induced conformational changes observed in single RNA molecules." (1999b), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96(16)**, 9077-9082.
- HAAS,E., KATCHALSKI-KATZIR,E., und STEINBERG,I.Z., "Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization." (1978), *Biochemistry*, **17(23)**, 5064-5070.
- HANSEN,R.L., ZHU,X.R., und HARRIS,J.M., "Fluorescence Correlation Spectroscopy with Patterned Photoexcitation for Measuring Solution Diffusion Coefficients of Robust Fluorophores." (1998), *Analytical Chemistry*, **70**, 1281-1287.
- HARE,D., SHAPIRO,L., und PATEL,D.J., "Extrahelical adenosine stacks into right-handed DNA: solution conformation of the d(C-G-C-A-G-A-G-C-T-C-G-C-G) duplex deduced from distance geometry analysis of nuclear Overhauser effect spectra." (1986), *Biochemistry*, **25(23)**, 7456-7464.
- HOCHSTRASSER,R.A., CHEN,S.M., und MILLAR,D.P., "Distance distribution in a dye-linked oligonucleotide determined by time-resolved fluorescence energy transfer." (1992), *Biophysical Chemistry*, **45**, 133-141.
- HU,J., XU,Y., SCHAPPERT,K., HARRINGTON,T., WANG,A., BRAGA,R., MOGRIDGE,J. , und FRIESEN,J.D., "Mutational analysis of the prp4 protein of *Saccharomyces cerevisiae* suggests domain structure and snRNP interactions." (1994), *Nucleic Acids Research*, **22(9)** , 1724-1734.
- HUMPHREY,W., DALKE,A., und SCHULTEN,K., "VMD: Visual molecular dynamics." (1996), *Journal of Molecular Graphics*, **14(1)**, 33-38.
- INSTITUTE OF MOLECULAR BIOTECHNOLOGY (2005), http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/nana/IMAGE_NASP.html.
- JARES-ERIJMAN,E.A. und JOVIN,T.M., "Determination of DNA Helical Handedness by Fluorescence Resonance Energy Transfer." (1996), *Journal of Molecular Biology*, **257**, 597-617.
- JENSCH,F. und KEMPER,B., "Endonuclease VII resolves Y-junctions in branched DNA in vitro." (1986), *EMBO Journal*, **5(1)**, 181-189.
- JOSHUA-TOR,L., FROLOW,F., APPELLA,E., HOPE,H., RABINOVICH,D., und SUSSMAN,J.L., "Three-dimensional structures of bulge-containing DNA fragments." (1992), *J Mol Biol*, **225(2)**, 397-431.
- KAROLIN,J., FA,M., WILCZYNSKA,M., NY,T., und JOHANSSON,L.B.A., "Donor-donor energy migration for determining intramolecular distances in proteins: I. Application of a model

-
- to the latent plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)." (1998), *Biophysical Journal*, **74(1)**, 11-21.
- KINOSHITA,K., Jr., KAWATO,S., und IKEGAMI,A., "A Theory of Fluorescence Polarization Decay in Membranes." (1977), *Biophysical Journal*, **20**, 289-305.
- KLEIN,D.J., SCHMEING,T.M., MOORE,P.B., und STEITZ,T.A., "The kinK-turn: a new RNA secondary structure motif." (2001), *EMBO Journal*, **20(15)**, 4214-4221.
- KLOSTERMEIER,D. und MILLAR,D.P., "Time-resolved fluorescence resonance energy transfer: A versatile tool for the analysis of nucleic acids." (2001), *Biopolymers*, **61(3)**, 159-179.
- KOSHIOKA,M., SASKI,K., und MASUHARA,H., "Time-Dependent Fluorescence Depolarization Analysis in Three Dimensional Microscopy." (1995), *Applied Spectroscopy*, **49(2)**, 224-228.
- KÖNIG,M., "Multiparameter-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur molekularen Dynamik an einzelnen Biomolekülen." (2005), Dissertation.
- KULLBACK,S., "Information Theory and Statistics." (1959), John Wiley & Sons, New York.
- LAKOWICZ,J.R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy." (1999), **Second Edition**, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
- LAMOND,A.I., KONARSKA,M.M., GRABOWSKI,P.J., und SHARP,P.A., "Spliceosome assembly involves the finding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein." (1988), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85(2)**, 411-415.
- LEE,N.K., KAPANIDIS,A.N., WANG,Y., MICHALET,X., MUKHOPADHYAY,J., EBRIGHT,R.H., und WEISS,S., "Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation." (2005), *Biophysical Journal*, **88(4)**, 2939-2953.
- LESCOUTE,A., und WESTHOF,E.; "Topology of three-way junctions in folded RNAs." (2006), *RNA*, **12(1)**, 83-93.
- LILLEY,D.M.J., "Structures of helical junctions in nucleic acids." (2000), *Quarterly Reviews of Biophysics*, **33(2)**, 109-159.
- LILLEY,D.M.J., "Folding of Branched RNA Species [Review]." (2001), *Biopolymers*, **48(2-3)**, 101-112.
- LILLEY,D.M.J., CLEGG,R.M., DIEKMANN,S., SEEMAN,N.C., VONKITZING,E., und HAGERMAN,P.J., "A nomenclature of junctions and branchpoints in nucleic acids." (1995), *Nucleic Acids Research*, **23(17)**, 3363-3364.
- LORENZ,M., HILLISCH,A., PAYET,D., BUTTINELLI,M., TRAVERS,A., und DIEKMANN,S., "DNA Bending Induced by High Mobility Group Proteins Studied by Fluorescence Resonance Energy Transfer." (1999), *Biochemistry*, **38(37)**, 12150-12158.
- LU,M., GUO,Q., und KALLENBACH,N.R., "Effect of sequence on the structure of 3-arm DNA junctions." (1991), *Biochemistry*, **30(24)**, 5815-5820.

- MAGDE,D., ELSON,E.L., und WEBB,W.W., "Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy." (1972), *Physical Review Letters*, **29**, 705-708.
- MAKAROVA,O.V., MAKAROV,E.M., LIU,S.B., VORNLOCHER,H.P., und LUHRMANN,R., "Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6 center dot U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing." (2002), *EMBO Journal*, **21(5)**, 1148-1157.
- MAO,H.Y., WHITE,S.A., und WILLIAMSON,J.R., "A novel loop-loop recognition motif in the yeast ribosomal protein L30 autoregulatory RNA complex." (1999), *Nature Structural Biology*, **6(12)**, 1139-1147.
- MARGITTAI,M., WIDENGREN,J., SCHWEINBERGER,E., SCHRÖDER,G.F., FELEKYAN,S., HAUSTEIN,E., KÖNIG,M., FASSHAUER,D., GRUBMÜLLER,H., JAHN,R., und SEIDEL,C.A.M., "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1." (2003), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 15516-15521.
- METS,Ü. und RIGLER,R., "Submillisecond Detection of Single Rhodamine Molecules in Water." (1994), *Journal of Fluorescence*, **4(3)**, 259-264.
- MILLER,M., HARRISON,R.W., WLODAWER,A., APPELLA,E., und SUSSMAN,J.L., "Crystal structure of 15-mer DNA duplex containing unpaired bases." (1988), *Nature*, **334(6177)**, 85-86.
- MOERNER,W.E. und KADOR,L., "Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid." (1989), *Physical Review Letters*, **62(21)**, 2535-2538.
- MOERNER,W.E. und ORRIT,M., "Illuminating Single Molecules in Condensed Matter [Review]." (1999), *Science*, **283(5408)**, 1670-1676.
- MOORE,M.J., QUERY,C.C., CRISPINO,J.D., und SHARP,P.A., "The chemical mechanism of pre-messenger RNA splicing." (1993), *Journal of Cellular Biochemistry*, 158-158.
- MOORE,M.J. und SHARP,P.A., "Evidence for 2 active-sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-messenger RNA splicing." (1993), *Nature*, **365(6444)**, 364-368.
- NIE,S., CHIU,D.T., und ZARE,R.N., "Probing Individual Molecules with Confocal Fluorescence Microscopy." (1994), *Science*, **266**, 1018-1021.
- NIE,S., CHIU,D.T., und ZARE,R.N., "Real-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy." (1995), *Analytical Chemistry*, **67**, 2849-2857.
- NIKONOWICZ,E., ROONGTA,V., JONES,C.R., und GORENSTEIN,D.G., "Two-dimensional ¹H and ³¹P NMR spectra and restrained molecular dynamics structure of an extrahelical adenosine tridecamer oligodeoxyribonucleotide duplex." (1989), *Biochemistry*, **28(22)**, 8714-8725.
- NIKONOWICZ,E.P., MEADOWS,R.P., und GORENSTEIN,D.G., "NMR structural refinement of an extrahelical adenosine tridecamer d(CGAGAATTCGCG)₂ via a hybrid relaxation matrix procedure." (1990), *Biochemistry*, **29(17)**, 4193-4204.
- NILSEN,T.W., "RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing." (1998) in Simons, R.W. und Grunberg-Manago, M., "RNA Structure and Function", 279-307.

-
- NISSEN,P., IPPOLITO,J.A., BAN,N., MOORE,P.B., und STEITZ,T.A., "RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: The A-minor motif." (2001), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98(9)**, 4899-4903.
- NOTTROTTS,S., "Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der spleißosomalen U4/U6 snRNP-spezifischen Protein-RNA Wechselwirkungen." (2002), Dissertation.
- NOTTROTTS,S., HARTMUTH,K., FABRIZIO,P., URLAUB,H., VIDOVIC,I., FICNER,R., und LUHRMANN,R., "Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA." (1999), *EMBO Journal*, **18**, 6119-6133.
- NOTTROTTS,S., URLAUB,H., und LUHRMANN,R., "Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins." (2002), *EMBO Journal*, **21**, 5527-5538.
- O'CONNOR,D.V. und PHILLIPS,D., "Time-correlated Single Photon Counting." (1984), Academic Press, New York.
- ORR,J.W., HAGERMAN,P.J., und WILLIAMSON,J.R., "Protein and Mg²⁺-induced conformational changes in the S15 binding site of 16 S ribosomal RNA." (1998), *Journal of Molecular Biology*, **275(3)**, 453-464.
- PADGETT,R.A. und SHUKLA,G.C., "A revised model for U4atac/U6atac snRNA base pairing." (2002), *RNA-A Publication of the RNA Society*, **8(2)**, 125-128.
- PARKHURST,K.M. und PARKHURST,L.J., "Donor-acceptor distance distributions in a double-labeled fluorescent oligonucleotide both as a single strand and in duplexes." (1995), *Biochemistry*, **34(1)**, 293-300.
- PAWLEY,J.B., "Handbook of Biological Confocal Microscopy." (1995), **Second Edition**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- PECK,L.J. und WANG,J.C., "Sequence dependence of the helical repeat of DNA in solution." (1981), *Nature*, **292(5821)**, 375-378.
- RICE,J.A. und CROTHERS,D.M., "DNA bending by the bulge defect." (1989), *Biochemistry*, **28(10)**, 4512-4516.
- RIGLER,R., "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening - Applications in biotechnology." (1995), *Journal of Biotechnology*, **41**, 177-186.
- RIGLER,R. und WIDENGREN,J., "Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy." (1990) in Klinge, B. und Owman, C., "BioScience", 180-183.
- RODRIGUEZ,J., SCHERLIS,D., ESTRIN,D., ARAMENDIA,P.F., und NEGRI,R.M., "AM1 study of the ground and excited state potential energy surfaces of symmetric carbocyanines." (1997), *Journal of Physical Chemistry A*, **101(37)**, 6998-7006.
- ROTHWELL,P.J., BERGER,S., KENSCH,O., FELEKYAN,S., ANTONIK,M., WÖHRL,B.M., RESTLE,T., GOODY,R.S., und SEIDEL,C.A.M., "Multi-parameter Single-molecule Fluorescence Spectroscopy reveals Heterogeneity of HIV-1 Reverse Transcriptase:primer/template Complexes." (2003), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 1655-1660.

- ROSEN, M.A., LIVE, D., und PATEL, D.J., "Comparative NMR study of A(n)-bulge loops in DNA duplexes: intrahelical stacking of A, A-A, and A-A-A bulge loops." (1992), *Biochemistry*, **31(16)**, 4004-4014.
- SABANAYAGAM, C.R., EID, J.S., und MELLER, A., "Using fluorescence resonance energy transfer to measure distances along individual DNA molecules: Corrections due to nonideal transfer." (2005), *Journal of Chemical Physics*, **122(6)**, 61103-61107.
- SANDHAGEN, C., "Gi-scan." (2005), C++-basiertes Programm.
- SARAI, A., MAZUR, J., NUSSINOV, R., und JERNIGAN, R.L., "Origin of DNA helical structure and its sequence dependence." (1988), *Biochemistry*, **27(22)**, 8498-8502.
- SCHAFFER, J., "Charakterisierung von Einzelmolekülen durch selektive Fluoreszenzspektroskopie." (2000), Dissertation.
- SCHAFFER, J., VOLKMER, A., EGGELING, C., SUBRAMANIAM, V., STRIKER, G., und SEIDEL, C.A.M., "Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence anisotropy." (1999), *Journal of Physical Chemistry A*, **103(3)**, 331-336.
- SCHULER, B., LIPMAN, E.A., STEINBACH, P.J., KUMKE, M., und EATON, W.A., "Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence." (2005), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102(8)**, 2754-2759.
- SCHWEINBERGER, E., "Multidimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen." (2002), Dissertation.
- SCHWILLE, P., MEYER-ALMES, F.J., und RIGLER, R., "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." (1997), *Biophysical Journal*, **72(4)**, 1878-1886.
- SCOTT, W.G., FINCH, J.T., und KLUG, A., "The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme - a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage ." (1995), *Cell*, **81(7)**, 991-1002.
- SERGANOV, A.A., MASQUIDA, B., WESTHOF, E., CACHIA, C., PORTIER, C., GARBER, M., EHRESMANN, B., und EHRESMANN, C., "The 16S rRNA binding site of Thermus thermophilus ribosomal protein S15: Comparison with Escherichia coli S15, minimum site and structure." (1996), *RNA-A Publication of the RNA Society*, **2(11)**, 1124-1138.
- SHEN, Z. und HAGERMAN, P.J., "Conformation of the central, 3-helix junction of the 5 S ribosomal-RNA of Sulfolobus acidocaldarius." (1994), *Journal of Molecular Biology*, **241(3)**, 415-430.
- SHERA, E.B., SEITZINGER, N.K., DAVIS, L.M., KELLER, R.A., und SOPER, S.A., "Detection of single fluorescent molecules." (1990), *Chemical Physics Letters*, **174(6)**, 553-557.
- SINDEN, R.R., "Neurodegenerative diseases: Origins of instability." (2001), *Nature*, **411(6839)**, 757-758.
- STRYER, L., "Biochemistry." (1996), **4th Edition**, W.H. Freeman and Company, New York.
- STRYER, L. und HAUGLAND, R.P., "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler." (1967), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **58**, 719-726.

-
- STÜHMEIER,F., WELCH,J.B., MURCHIE,A.I.H., LILLEY,D.M.J., und CLEGG,R.M., "Global structure of three-way DNA junctions with and without additional unpaired bases: a fluorescence resonance energy transfer analysis." (1997), *Biochemistry*, **36**, 13530-13538.
- STÜHMEIER,F., HILLISCH,A., CLEGG,R.M., und DIEKMANN,S., "Fluorescence energy transfer analysis of DNA structures containing several bulges and their interaction with CAP." (2000), *Journal of Molecular Biology*, 302(5), 1081-1100.
- ULYANOV,N.B. und JAMES,T.L., "Statistical analysis of DNA duplex structural features." (1995), *Nuclear Magnetic Resonance and Nucleic Acids*, **261**, 90-120.
- VAN DER MEER,B.W., "Kappa-squared: from nuisance to new sense." (2002), *Reviews in Molecular Biotechnology*, **82(3)**, 181-196.
- VAN DER MEER,B.W., COOKER,G., und CHEN,S.Y., "Resonance Energy Transfer: Theory and Data." (1994), VCH Publishers, New York.
- VANKAN,P., MCGUIGAN,C., und MATTAG,I.W., "Roles of U4 and U6 snRNAs in the assembly of splicing complexes." (1992), *EMBO Journal*, **11(1)**, 335-343.
- VIDOVIC,I., NOTTROT,S., HARTMUTH,K., LUHRMANN,R., und FICNER,R., "Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment." (2000), *Molecular Cell*, **6**, 1331-1342.
- WANG,Y.H. und GRIFFITH,J., "Effects of bulge composition and flanking sequence on the kinking of DNA by bulged bases." (1991), *Biochemistry*, **30(5)**, 1358-1363.
- WATKINS,N.J., SEGALT,V., CHARPENTIER,B., NOTTROT,S., FABRIZIO,P., BACHI,A., WILM,M., ROSBASH,M., BRANLANT,C., und LUHRMANN,R., "A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP." (2000), *Cell*, **103(3)**, 457-466.
- WATSON,J.D. und CRICK,F.H.C., "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." (1953), *Nature*, **171**, 737-738.
- WEISS,S., "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules." (1999), *Science*, **283(5408)**, 1676-1683.
- WEISS,S., "Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy." (2000), *Nature Structural Biology*, **7(9)**, 724-729.
- WERSIG,C. und BINDEREIF,A., "Reconstitution of functional mammalian U4 small nuclear ribonucleoprotein: Sm protein binding is not essential for splicing in vitro." (1992), *Molecular and Cellular Biology*, **12(4)**, 1460-1468.
- WIDENGREN,J., "Fluorescence Correlation Spectroscopy, Photophysical Aspects And Applications." (1996), Dissertation.
- WIDENGREN,J., METS,Ü., und RIGLER,R., "Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study." (1995), *Journal of Physical Chemistry*, **99**, 13368-13379.
- WIDENGREN,J., RIGLER,R., und METS,Ü., "Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy." (1994), *Journal of Fluorescence*, **4(3)**, 255-258.

- WILD,U.P., HOLZWARTH,A.R., und GOOD,H.P., "Measurement and analysis of fluorescence decay curves." (1977), *Review of Scientific Instruments*, **48(12)**, 1621-1627.
- WONG,K.F., BAGCHI,B., und ROSSKY,P.J., "Distance and orientation dependence of excitation transfer rates in conjugated systems: Beyond the Forster theory." (2004), *Journal of Physical Chemistry A*, **108(27)**, 5752-5763.
- WOODSON,S.A. und CROTHERS,D.M., "Structural model for an oligonucleotide containing a bulged guanosine by NMR and energy minimization." (1988), *Biochemistry*, **27(9)**, 3130-3141.
- WOZNIAK,A.K., NOTTROT,S., KUHN-HOLSKEN,E., SCHRODER,G.F., GRUBMULLER,H., LUHRMANN,R., SEIDEL,C.A.M., und OESTERHELT,F., "Detecting protein-induced folding of the U4 snRNA kinK-turn by single-molecule multiparameter FRET measurements." (2005), *RNA-A Publication of the RNA Society*, **11(10)**, 1545-1554.
- YANG,M.S. und MILLAR,D.P., "Conformational flexibility of three-way DNA junctions containing unpaired nucleotides." (1996), *Biochemistry*, **35(24)**, 7959-7967.
- YEAN,S.L. und LIN,R.J., "U4 small nuclear-RNA dissociates from a yeast spliceosome and does not participate in the subsequent splicing reaction." (1991), *Molecular and Cellular Biology*, **11(11)**, 5571-5577.
- YING,L.M., WALLACE,M.I., und KLENERMAN,D., "Two-state model of conformational fluctuation in a DNA hairpin-loop." (2001), *Chemical Physics Letters*, **334(1-3)**, 145-150.
- ZACHARIAS,M. und HAGERMAN,P.J., "Bulge-induced bends in RNA: quantification by transient electric birefringence." (1995), *J Mol Biol*, **247(3)**, 486-500.
- ZACHARIAS,M. und SKLENAR,H., "Analysis of the stability of looped-out and stacked-in conformations of an adenine bulge in DNA using a continuum model for solvent and ions." (1997), *Biophysical Journal*, **73(6)**, 2990-3003.
- ZANDER,C., SAUER,M., DREXHAGE,K.H., KO,D.S., SCHULZ,A., WOLFRUM,J., BRAND,L., EGGELING,C., und SEIDEL,C.A.M., "Detection and characterization of single molecules in aqueous solution." (1996), *Applied Physics B*, **63(5)**, 517-523.
- ZHUANG,X., BARTLEY,L.E., BABCOCK,H.P., RUSSELL,R., HA,T., HERSCHLAG,D., und CHU,S., "A single-molecule study of RNA catalysis and folding." (2000), *Science*, **288(5473)**, 2048-2051.

ANHANG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Akzeptorfluorophor bzw. mit Akzeptor markiertes Molekül; Adenin
APD	Avalanche-Photodiode
BIFL	<i>Burst-Integrated Fluorescence Lifetime</i>
B	Streulichtsignal
bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration
c'	Lichtgeschwindigkeit
C	Cytosin
ds	doppelsträngig
D	Donorfluorophor bzw. mit Donor markiertes Molekül; Diffusionskonstante
D(A)	mit Donor- und Akzeptorfarbstoff markierter Molekülkomplex
DNA	<i>Desoxynucleic Acid</i> (Desoxynukleinsäure)
em	<i>emission</i> (Fluoreszenzemission)
ex	<i>excitation</i> (Anregung)
E	Extinktion
E _T	Energietransfereffizienz
F	Fluoreszenzintensität
F _a	Faraday-Konstante (= $9,65 \cdot 10^4$ C mol ⁻¹)
F _A	Fluoreszenzintensität des Akzeptorfarbstoffs
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> (Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie)
F _D	Fluoreszenzintensität des Donorfarbstoffs
F _{ges}	Gesamt-Fluoreszenzintensität
FRET	Fluoreszenzresonanter Energietransfer
g _G	Detektionseffizienz im grünen Wellenlängenbereich
g _R	Detektionseffizienz im roten Wellenlängenbereich
G	grüner Wellenlängenbereich; Guanin
h	Plancksches Wirkungsquantum (= $6,63 \cdot 10^{-34}$ J s)
I	mittlere Anregungsleistungsdichte [kW cm ⁻²]
I ₀	Anregungsleistungsdichte in der Fokusebene [kW cm ⁻²]
IC	<i>Internal Conversion</i> (Innere Konversion)
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
J	Überlappungsintegral [M ⁻¹ cm ³]

k	Geschwindigkeitskonstante, Boltzmann-Konstante ($= 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
kD	Kilodalton
k_D	Summe der Geschwindigkeitskonstanten von Fluoreszenz, innerer Umwandlung und <i>intersystem crossing</i> des Donorfarbstoffs [s^{-1}]
$k_{D(0)}$	Summe der Geschwindigkeitskonstanten von Fluoreszenz, innerer Umwandlung und <i>intersystem crossing</i> des Donorfarbstoffs [s^{-1}]
k_F	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [s^{-1}]
k_{FRET}	Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers [s^{-1}]
k_{IC}	Geschwindigkeitskonstante der inneren Umwandlung (engl. <i>internal conversion</i>) [s^{-1}]
k_{ISC}	Geschwindigkeitskonstante für den Übergang vom angeregten in den Triplettzustand [s^{-1}]
k_P	Geschwindigkeitskonstante der Phosphoreszenz [s^{-1}]
k_Q	Geschwindigkeitskonstante der Löschung [$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
k_T	Geschwindigkeitskonstante für den Übergang vom Triplettzustand in den Grundzustand [s^{-1}]
K_A	Gleichgewichtskonstante der Assoziation
K_D	dynamische Löschkonstante; Dissoziationsgleichgewichtskonstante
l_1, l_2	Korrekturfaktoren für die Mischung der Polarisationsanteile bei Transmission durch das Objektiv
MD	Molekulardynamik
MFD	Multiparameter-Fluoreszenzdetektion
n	Anzahl an Photonen in einem Einzelmolekülereignis
n_D	Brechungsindex des Lösungsmittels
N	Anzahl an fluoreszierenden Molekülen; Nukleobase
N_0	Anzahl an fluoreszierenden Molekülen zur Zeit $t=0$ der Anregung
N_i	Besetzungsdichte eines Energieniveaus
NA	Avogadro-Konstante ($= 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (= Kernmagnetische Resonanz)
p	Index für parallele Polarisation; Laserlichtleistung am Objektiv
Q	Löschmolekül; Löschung (engl. <i>quenching</i>)
r	Anisotropie
r_0	Anisotropie zur Zeit $t=0$ der Anregung des Moleküls (molekülabhängig)
R_0	Försterradius [\AA]
R_{0r}	reduzierter Försterradius [\AA]
R	ideale Gaskonstante ($= 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); „roter“ Wellenlängenbereich
R_{DA}	Abstand von Donor und Akzeptor eines FRET-Paares [$\text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$]
RNA	<i>Riconucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
s	Index für senkrechte Polarisation
S	am Detektor auftreffendes Signal

$S_{0/1}$	Singulettzustand des Grundzustands/des ersten angeregten Zustands
t	Zeit
t_i	Korrelationszeit des Bunchingterms i in der FCS
t_c	Korrelationszeit [ms]
t_D	Diffusionszeit [ms]
t_T	Triplettkorrelationszeit [μ s]
T	absolute Temperatur [K]; Triplettzustand; Messfenster bei der zeitaufgelösten Spektroskopie; zeitlicher Schwerpunkt eines Einzelmolekülereignisses, Thymin
T_{1eq}	Amplitude des Triplettteils der Korrelationskurve
TCSPC	<i>Time-correlated Single Photon Counting</i> (Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung)
V_D	Detektionsvolumen [fl]
VitC	Vitamin C
x_i	molekülgewichtete Amplitude der Abklingzeit τ_i bei mehrexponentieller Abklingkurvenanpassung
X	Koordinate senkrecht zur Helixachse
z_0	$1/e^2$ -Radius in axialer (z) Richtung [μ m]
Z	Helixachsenkoordinate
α	<i>Crosstalk</i> (Übersprechen)
ε	Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
Φ	Fluoreszenzquantenausbeute
γ	inverse Photonenenergie; Streulichtanteil
κ^2	Orientierungsfaktor
λ	Wellenlänge [nm]
μ	Übergangsdipolmoment
ν	Frequenz [Hz]
ρ	Rotationskorrelationszeit [ns]
σ	Absorptionsquerschnitt
τ	Fluoreszenzlebensdauer
ω_0	$1/e^2$ -Radius in radialer (x,y) Richtung [μ m]

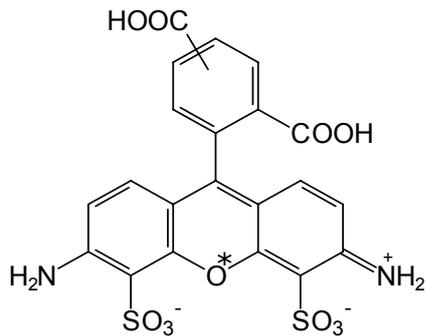
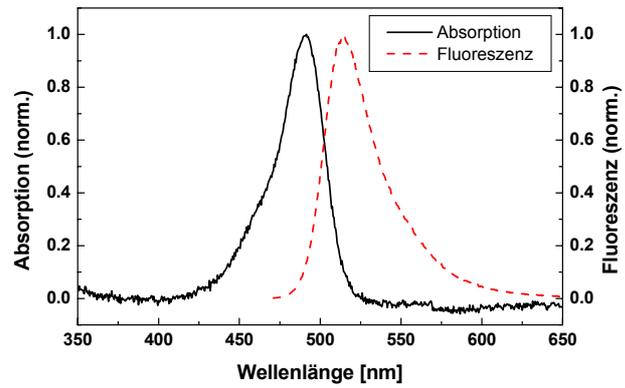
FLUOROPHORE

Alexa 488

Absorptionsmaximum: 495 nm

$\epsilon_{495 \text{ nm}}$: $71\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Fluoreszenzmaximum: 519 nm

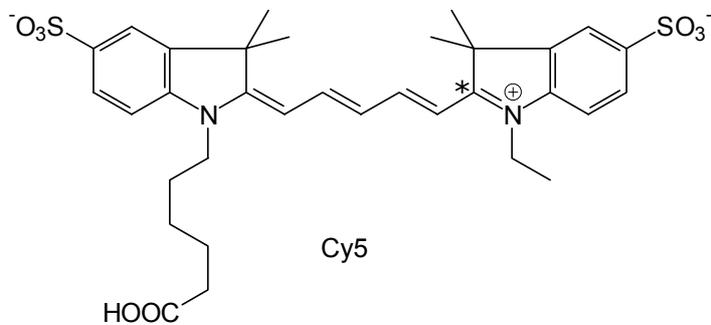
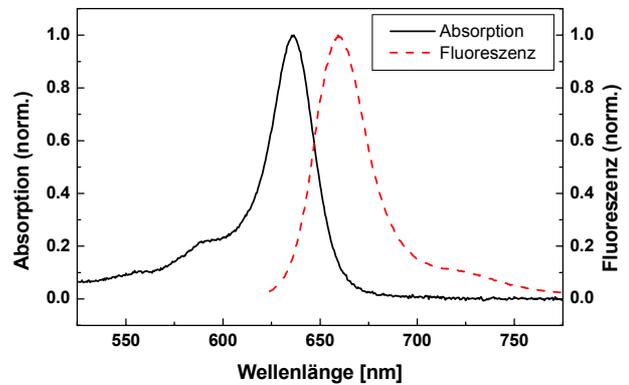


Cy5

Absorptionsmaximum: 649 nm

$\epsilon_{649 \text{ nm}}$: $250\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Fluoreszenzmaximum: 670 nm



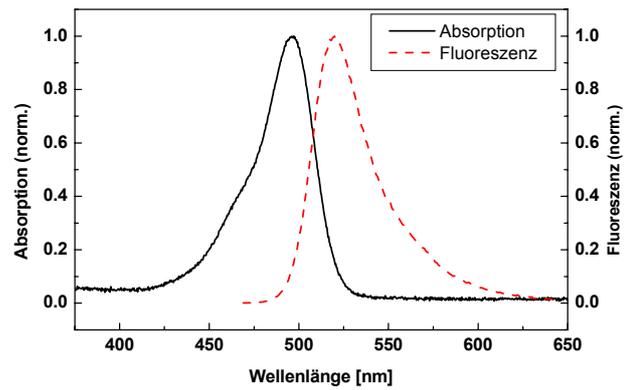
* Bei der MD-Simulation herangezogene Atome zur Abstandsbestimmung.

Rhodamin 110

Absorptionsmaximum: 496 nm

$\epsilon_{649 \text{ nm}}$: 68 000 M⁻¹ cm⁻¹

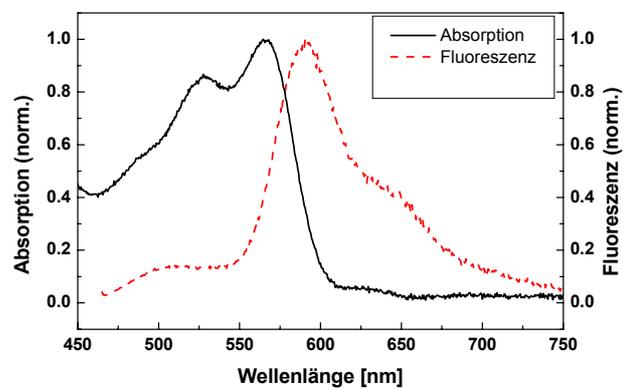
Fluoreszenzmaximum: 527 nm



Rhodamin 101

Absorptionsmaximum: 649 nm

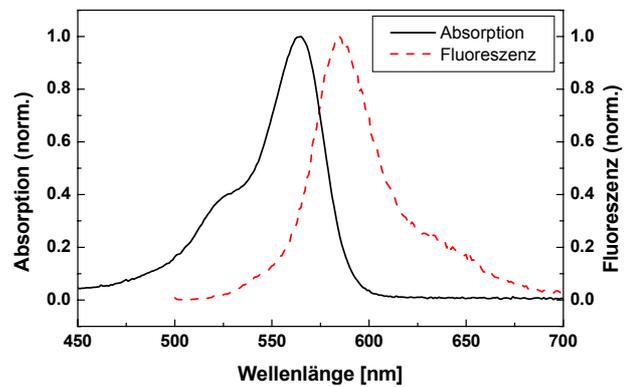
Fluoreszenzmaximum: 670 nm



Sulphorhodamin B

Absorptionsmaximum: 649 nm

Fluoreszenzmaximum: 670 nm



OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN

Sequenzen der in Material und Methoden eingeführten Moleküle. Der Stern (*) verweist auf die Fluorophormarkierungsstellen. Bei mehreren möglichen Markierungen an einer Sequenz wird dem Namen die Nummer der markierten Base drangehängt. Die Namensgebung der Hybride erfolgt durch das Aneinanderreihen von Donor- und Akzeptorname. (Eine Ausnahme bildet hier der *K-turn* – in diesem Falle wird der Donor an den Akzeptornamen nachgestellt.)

Tabelle 1: DNA-Helices

Name	Fluorophor	Sequenz
DNA_D	Alexa488	5´-d(48 -GGA CTA GTC TAG GCG AAC GTT TAA GGC GAT CTC T*GT* TT*A CAA CTC CGA- 1)
DNA_A	Cy5	5´-d(1 -TCG GAG TTG TAA ACA GAG AT*C GCC TT*A AAC GT*T CGC CT*A GAC TAG TCC- 48)
1a_D	Alexa488	5´-d(53 -AA7 TGG ACT AGT CTA GGC GAA CGT TTA AGG <u>CAG</u> ATC TCT* GT*T T*AC AAC TCC GA- 1)
3a_D	Alexa488	5´-d(55 -AA7 TGG ACT AGT CTA GGC GAA CGT TTA AGG <u>CAA</u> <u>AGA</u> TCT CT*G T*TT* ACA ACT CCG A- 1)
5a_D	Alexa488	5´-d(57 -AA7 TGG ACT AGT CTA GGC GAA CGT TTA AGG <u>CAA</u> <u>AAA</u> GAT CTC T*GT* TT*A CAA CTC CGA- 1)

Endständig ungepaarte Basen sind *kusiv*, intern ungepaarte unterstrichen.

Tabelle 2: RNA-Helices

Name	Fluorophor	Sequenz
RNA_D	Alexa488	5´-(48 -GGA CUA GUC UAG GCG AAC GUU UAA GGC GAU CUC U*GU* UU*A CAA CUC CGA- 1)
RNA_A	Cy5	5´-(1 -UCG GAG UUG UAA ACA GAG AU*C GCC UU*A AAC GU*U CGC CUA GAC UAG UCC- 48)

Tabelle 3: K-turn der U4 snRNA

Name	Fluorophor	Sequenz
up1	Cy5	5´-(GCA UCG UAG CCA AUG AGG UCU T*CG)
up2	Cy5	5´-(GCA UCG CGC CAA UGA GGU CUT* CG)
up3	Cy5	5´-(GCA UCG CGC CUC GGU CUT* CG)
down	Alexa488	5´-(CGA AGA CCG AGG CGC GAT* GC)

Tabelle 4: U4/U6 snRNA *three-way junction*

<i>Name</i>	<i>Fluorophor</i>	<i>Sequenz</i>
U4_D	Alexa488	5'-(1 -AGC UUU* GCG CAG UGG CAG UAU* CGU* AGC CAA UGA GGU UUA U*CC GAG GCG CGA UUA UUG CUA AUU GA- 65)
U6_A	Cy5	5'-(47 -UCA AUU* AGC AU*G GCC CCU* GCG CAA GGA UGA CAC GCA AAU UC- 87)
U4_A62	Cy5	5'-(1 -UCA AUU AGC AAU AAU CGC GCC UCG GAU AAA CCU CAU UGG CUA CGA UUA UUG CUA AU*U GA- 59)

ORIGINALDATEN DER FRET-STUDIEN

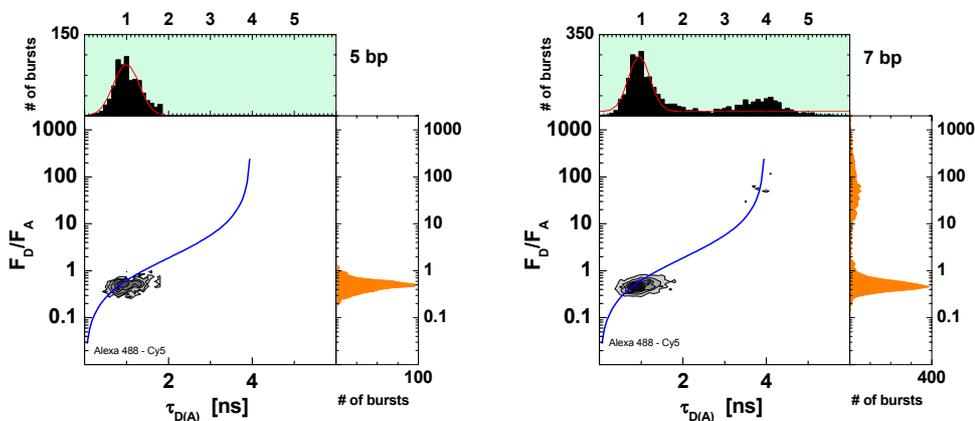
Im folgenden sind die Zahlenwerte der im Ergebnisteil präsentierten Diagramme tabellarisch aufgelistet. Des weiteren sind die zugehörigen MFD-Messungen in Form von 2D-Histogrammen aufgeführt.

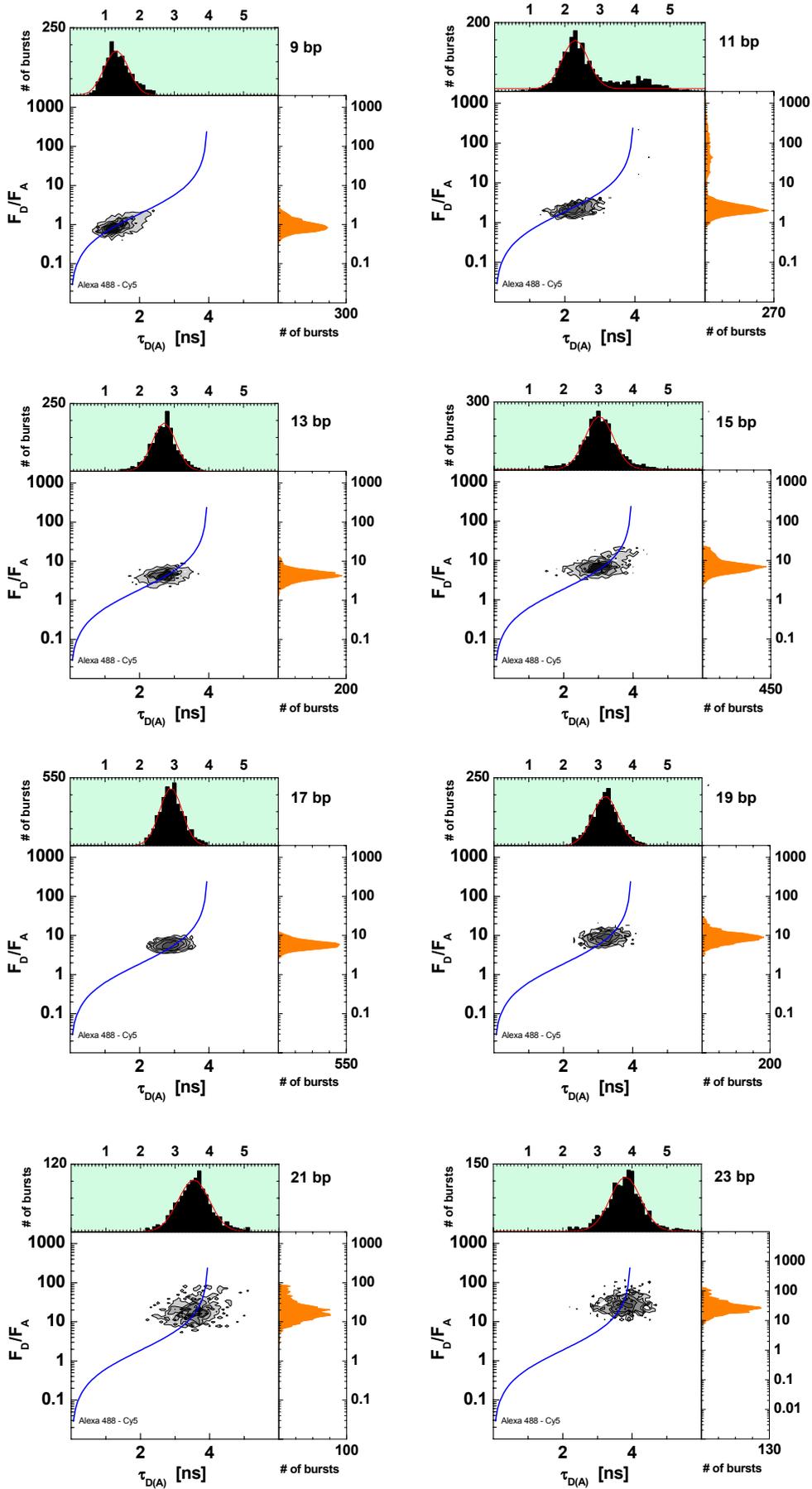
Kapitel 4.1.1

Tabelle 5: MFD-Rohdaten und der daraus geleiteten Ergebnisse zur geraden DNA Helix

$\tau_{D(A)}$ ist dem Gaußfit der jeweiligen Probe in Abbildung 1 entnommen. τ_D ist in einer nur den Donor enthaltenden Messung bestimmt worden. E_T berechnet sich aus diesen Werten nach Gl. 2-22, zur Korrektur der Transfereffizienz wird Gl. 4-6 herangezogen. Der daraus resultierende Abstand zwischen der mittleren Fluorophorverteilung läßt sich nach Gl. 2-24 mit einem Försterradius von $R_0 = 51,7 \text{ \AA}$ berechnen. Werte zu den Abbildungen 4-3, 4-6 und 4-8.

Abstand [bp]	$\tau_{D(A)}$ [ns]	τ_D [ns]	E_T	E_T (korr)	Abstand [Å]
5	0,94	3,97	0,76	0,89	37,4
7	0,91	3,97	0,77	0,90	37,0
9	1,29	3,97	0,68	0,81	41,7
11	2,27	3,97	0,43	0,51	52,5
13	2,71	3,97	0,32	0,36	58,0
15	3,02	3,97	0,24	0,26	62,8
17	2,90	3,97	0,27	0,30	60,8
19	3,21	3,97	0,19	0,20	66,4
21	3,54	3,97	0,11	0,11	75,0
23	3,81	3,97	0,04	0,04	88,7
25	3,97	3,97	0	0,01	114,5
27	3,84	3,97	0,03	0,04	91,3





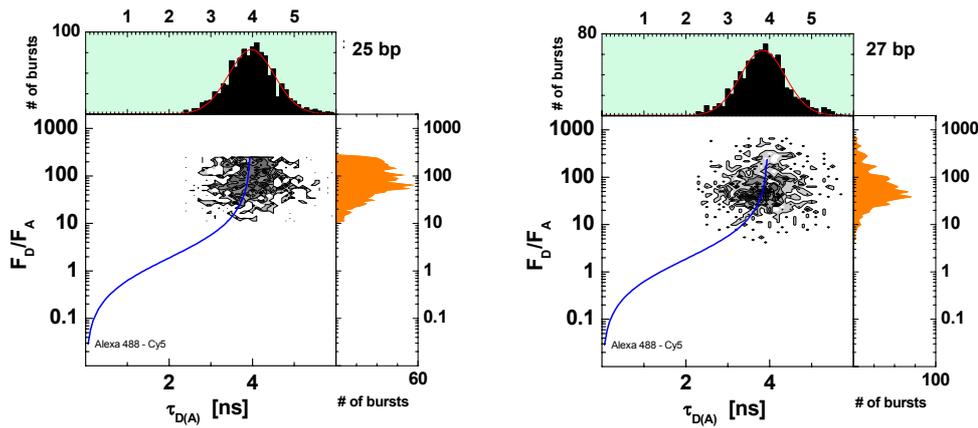


Abbildung 1: 2D-Histogramme der MFD-FRET Messungen der geraden DNA Helix Die Korrekturparameter für die MFD-Daten sind: $B_G = 2,9$ kHz, $B_R = 1,1$ kHz, $g_G = 0,32$, $g_R = 0,53$, $\alpha = 0,018$. Der Schwerpunkt des $\tau_{D(A)}$ -Gaußfits ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die Quantenausbeuten betragen bei den vorliegenden Messungen $\Phi_D = 0,8$ und $\Phi_A = 0,43$. Kurve nach Gl. 1 (siehe unten). # of bursts: Ereignisanzahl.

$$\frac{F_D}{F_A}(\tau_{D(A)}) = \left(\frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}} - 1 \right) \cdot \frac{\Phi_{FD}}{\Phi_{FA}} \quad (\text{Gl. 1})$$

Tabelle 6: Gekrümmte helikale Modelle der DNA Transfereffizienz zwischen den mittleren Aufenthaltsorten der MD-simulierten Fluorophorverteilung an unterschiedlichen DNAs. Werte zur Abbildung 4-8.

Abstand [bp]	B-DNA	Gabrielian	Goodsell	Ulyanov
5	0,97	0,97	0,97	0,97
6	0,97	0,96	0,97	0,97
7	0,97	0,94	0,95	0,96
8	0,94	0,89	0,91	0,92
9	0,87	0,81	0,82	0,85
10	0,75	0,68	0,69	0,73
11	0,61	0,55	0,54	0,53
12	0,49	0,44	0,43	0,41
13	0,40	0,35	0,36	0,33
14	0,35	0,30	0,30	0,28
15	0,31	0,27	0,26	0,25
16	0,28	0,24	0,22	0,21
17	0,23	0,25	0,27	0,32
18	0,18	0,19	0,22	0,24
19	0,13	0,13	0,16	0,17
20	0,10	0,09	0,11	0,12
21	0,07	0,07	0,08	0,08
22	0,05	0,05	0,06	0,06
23	0,04	0,04	0,04	0,05
24	0,04	0,03	0,04	0,04
25	0,03	0,03	0,03	0,03
26	0,03	0,02	0,02	0,02
27	0,02	0,02	0,02	0,02
28	0,02	0,02	0,01	0,02
29	0,01	0,01	0,01	0,01

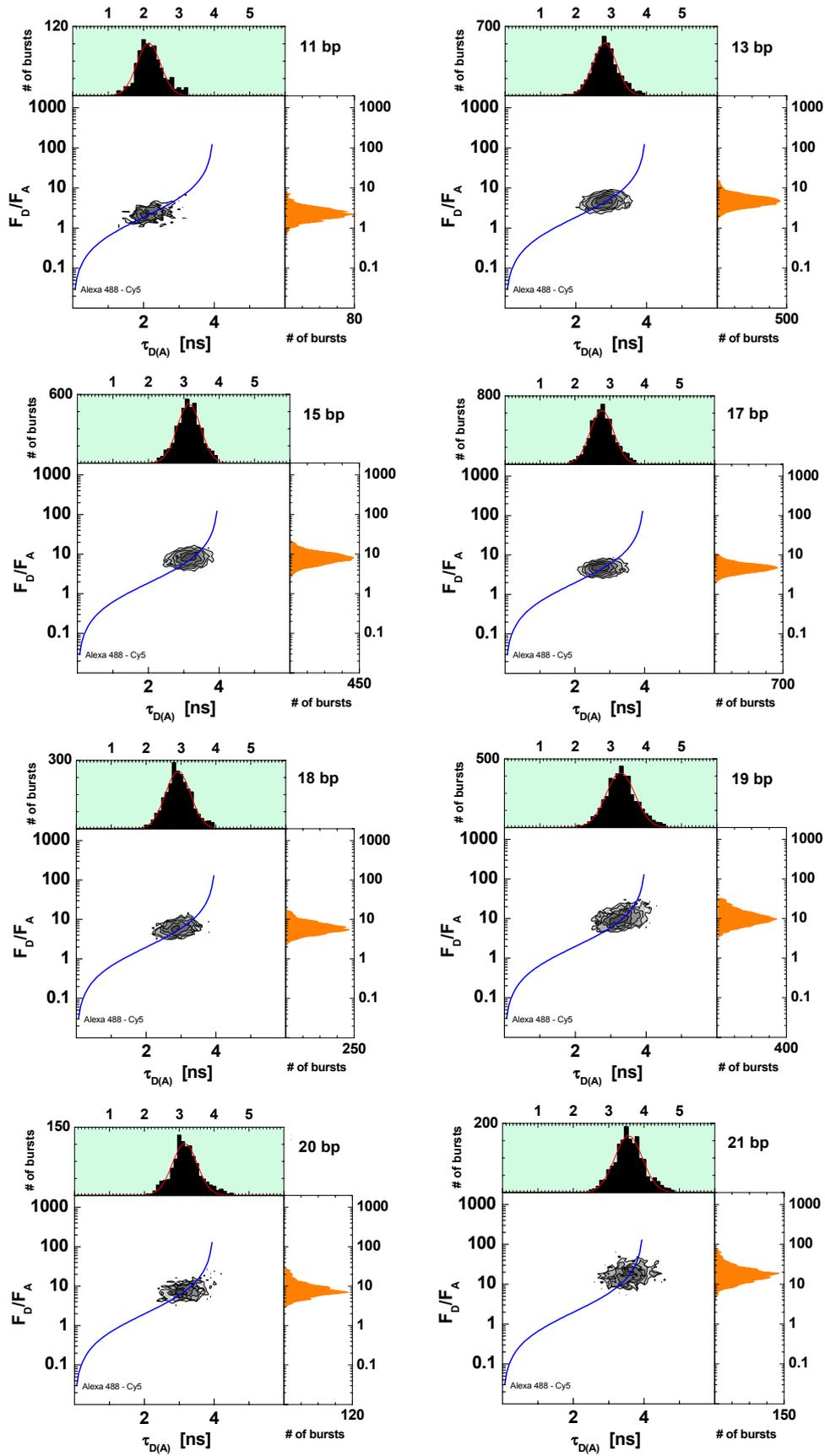
Tabelle 7: Auswirkung von Mittelungsregimes auf die Transfereffizienz Anwendung von Gl. 4-2 (helikales Modell), 4-4 (schnelle Rotation) und 4-5 (langsame Diffusion) auf den DNA MD-Datensatz. Werte zur Abbildung 4-5.

Abstand [bp]	helikales Modell	schnelle Rotation	langsame Diffusion
5	0,97	0,90	0,76
7	0,97	0,87	0,73
9	0,87	0,75	0,59
11	0,61	0,53	0,41
13	0,40	0,37	0,29
15	0,31	0,30	0,24
17	0,23	0,23	0,18
19	0,13	0,14	0,12
21	0,07	0,08	0,07
23	0,04	0,05	0,05
25	0,03	0,03	0,03
27	0,02	0,02	0,02

Kapitel 4.1.2

Tabelle 8: MFD-Rohdaten und der daraus geleiteten Ergebnisse zur geknickten Helix mit einem ungepaarten Adenin $\tau_{D(A)}$ ist dem Gaußfit der jeweiligen Probe in Abbildung 2 entnommen. τ_D ist in einer nur den Donor enthaltenden Messung bestimmt worden. E_T berechnet sich aus diesen Werten nach Gl. 2-22, zur Korrektur der Transfereffizienz wird Gl. 4-6 herangezogen. Der daraus resultierende Abstand zwischen der mittleren Fluorophorverteilung läßt sich nach Gl. 2-24 mit einem Försterradius von $R_0 = 51,7 \text{ \AA}$ berechnen. Werte zur Abbildung 4-11a.

Abstand [bp]	$\tau_{D(A)}$ [ns]	τ_D [ns]	E_T	E_T (korr)	Abstand [\AA]	B_G / B_R [kHz]	g_G / g_R	α	E_T (fit)
11	2,14	4,00	0,47	0,53	50,9	3,3/1,1	0,32/0,39	0,018	0,54
13	2,82	4,00	0,30	0,31	59,3	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,33
15	3,15	4,00	0,21	0,21	64,7	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,25
17	2,77	4,00	0,31	0,32	58,6	3,0/0,8	0,32/0,39	0,018	0,34
18	2,91	4,00	0,27	0,28	60,7	3,0/0,8	0,32/0,39	0,018	0,26
19	3,28	4,00	0,18	0,17	67,3	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,16
20	3,3	4,00	0,18	0,17	67,8	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,11
21	3,56	4,00	0,11	0,10	74,8	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,08
22	3,67	4,00	0,08	0,07	78,9	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,06
23	3,8	4,00	0,05	0,05	85,9	3,0/0,8	0,32/0,39	0,018	0,04
25	3,85	4,00	0,04	0,04	89,6	3,3/1,1	0,32/0,39	0,018	0,03
27	3,94	4,00	0,02	0,02	99,9	3,2/0,9	0,32/0,39	0,018	0,02



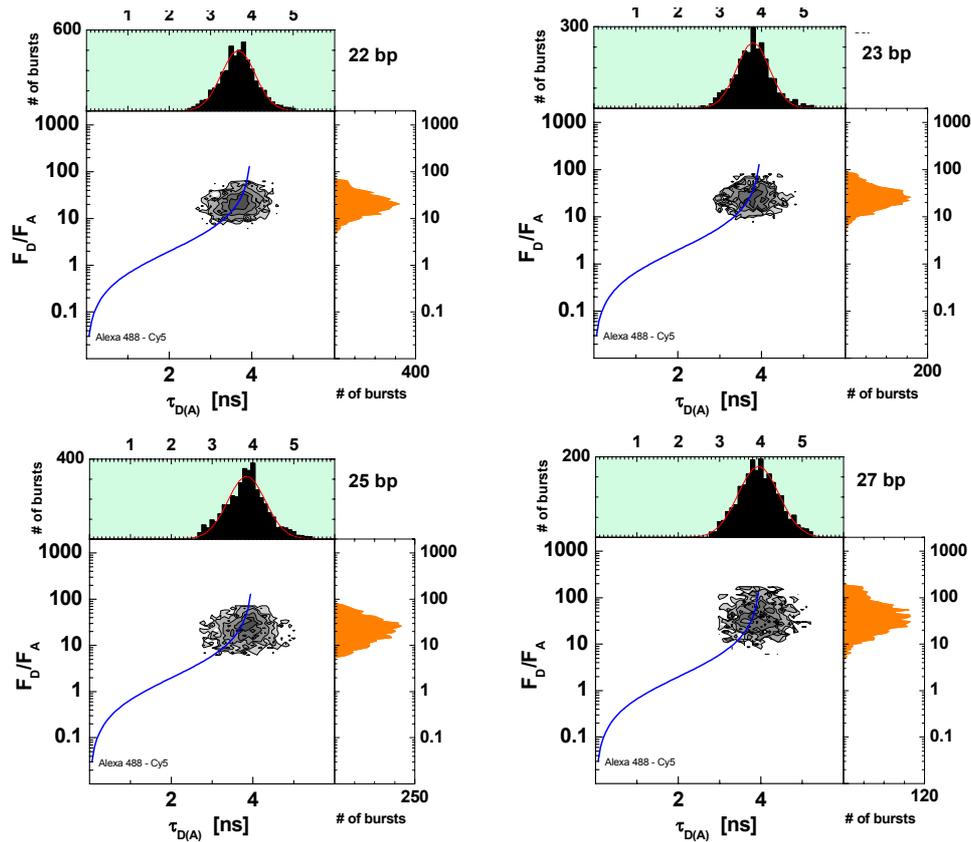
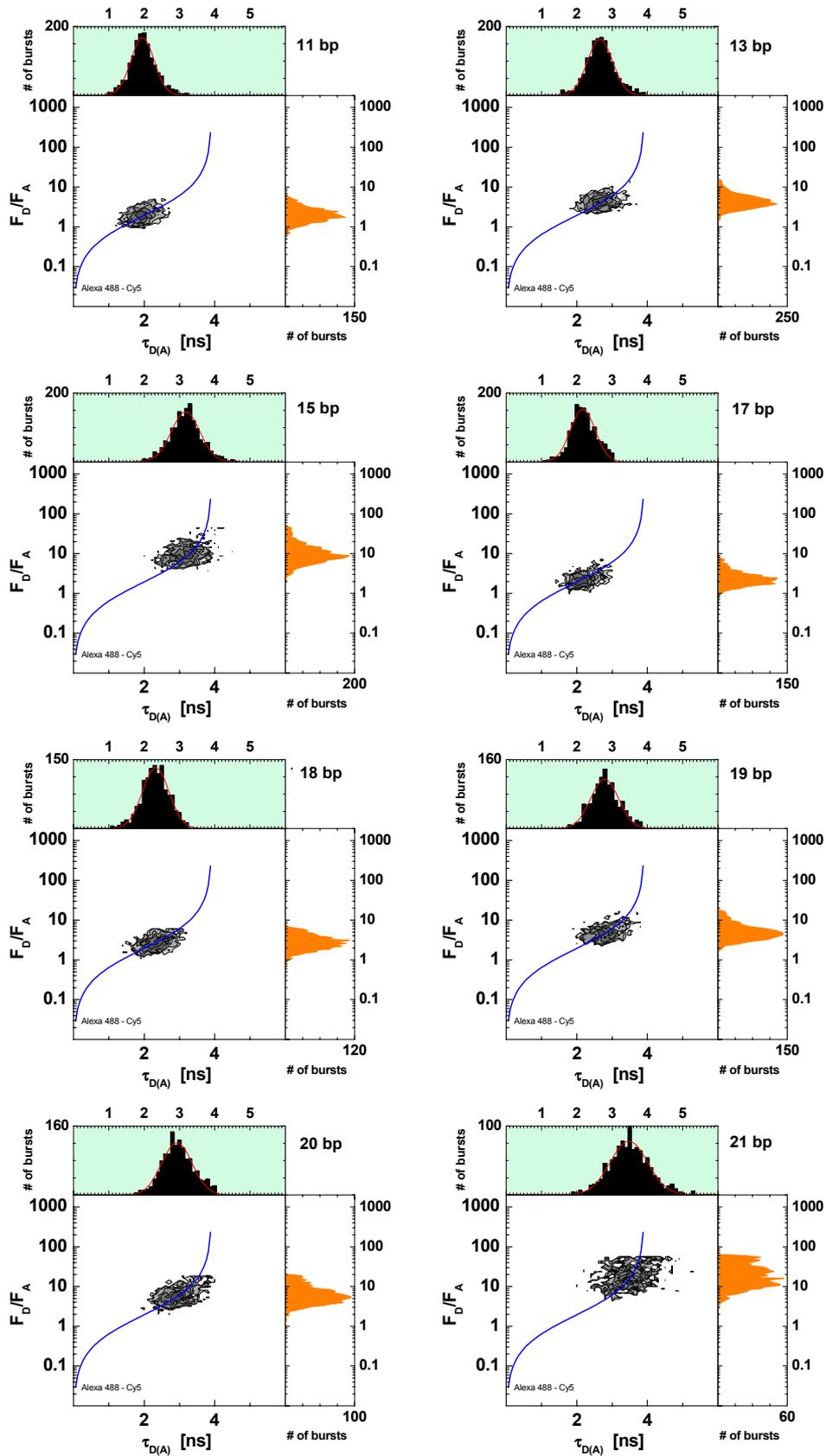


Abbildung 2: 2D-Histogramme der MFD-FRET Messungen der geknickten Helix mit einem ungepaarten Adenin Die individuellen Korrekturparameter sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Der Schwerpunkt des $\tau_{D(A)}$ -Gaußfits ist ebenfalls in dieser Tabelle aufgeführt. Die Quantenausbeuten betragen $\phi_D = 0,8$ und $\phi_A = 0,43$. Kurve nach Gl. 1. # of bursts: Ereignisanzahl.

Tabelle 9: MFD-Rohdaten und der daraus geleiteten Ergebnisse zur geknickten Helix mit drei ungepaarten Adeninen $\tau_{D(A)}$ ist dem Gaußfit der jeweiligen Probe in Abbildung 3 entnommen. τ_D ist in einer nur den Donor enthaltenden Messung bestimmt worden. E_T berechnet sich folglich nach Gl. 2-22, zur Korrektur der Transfereffizienz wird Gl. 4-6 herangezogen. Der daraus resultierende Abstand zwischen der mittleren Fluorophorverteilung läßt sich nach Gl. 2-24 mit einem Försterradius von $R_0 = 51,7 \text{ \AA}$ berechnen. Werte zur Abbildung 4-11c.

Abstand [bp]	$\tau_{D(A)}$ [ns]	τ_D [ns]	E_T	E_T (korr)	Abstand [\AA]	B_G / B_R [kHz]	g_G / g_R	α	E_T (fit)
11	1,95	3,91	0,50	0,57	49,3	3,7/0,8	0,32/0,39	0,013	0,62
13	2,66	3,91	0,32	0,34	57,9	3,9/1,1	0,32/0,39	0,013	0,35
15	3,17	3,91	0,19	0,18	66,5	3,5/0,8	0,32/0,39	0,013	0,25
17	2,16	3,91	0,45	0,50	51,6	3,8/0,8	0,32/0,39	0,013	0,60
18	2,33	3,91	0,40	0,45	53,6	3,8/0,9	0,32/0,39	0,013	0,51
19	2,78	3,91	0,29	0,30	59,7	3,9/1,2	0,32/0,39	0,013	0,29
20	3,07	3,91	0,21	0,21	64,5	4,0/1,3	0,32/0,39	0,013	0,22
21	3,47	3,91	0,11	0,10	74,4	3,5/0,8	0,32/0,39	0,013	0,13
22	3,56	3,91	0,09	0,08	77,8	3,5/0,8	0,32/0,39	0,013	0,10
23	3,63	3,91	0,07	0,06	80,9	3,9/1,0	0,32/0,39	0,013	0,07
25	3,73	3,91	0,05	0,04	87,0	4,0/1,3	0,32/0,39	0,013	0,03
27	3,84	3,91	0,02	0,02	98,2	3,5/0,8	0,32/0,39	0,013	0,02



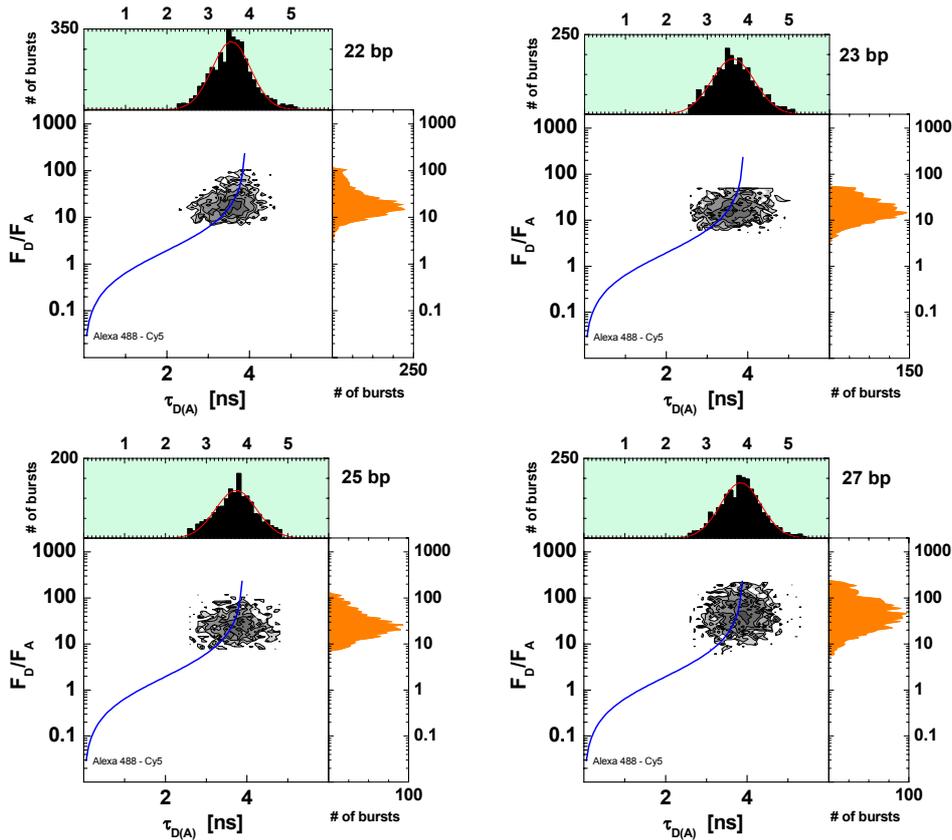
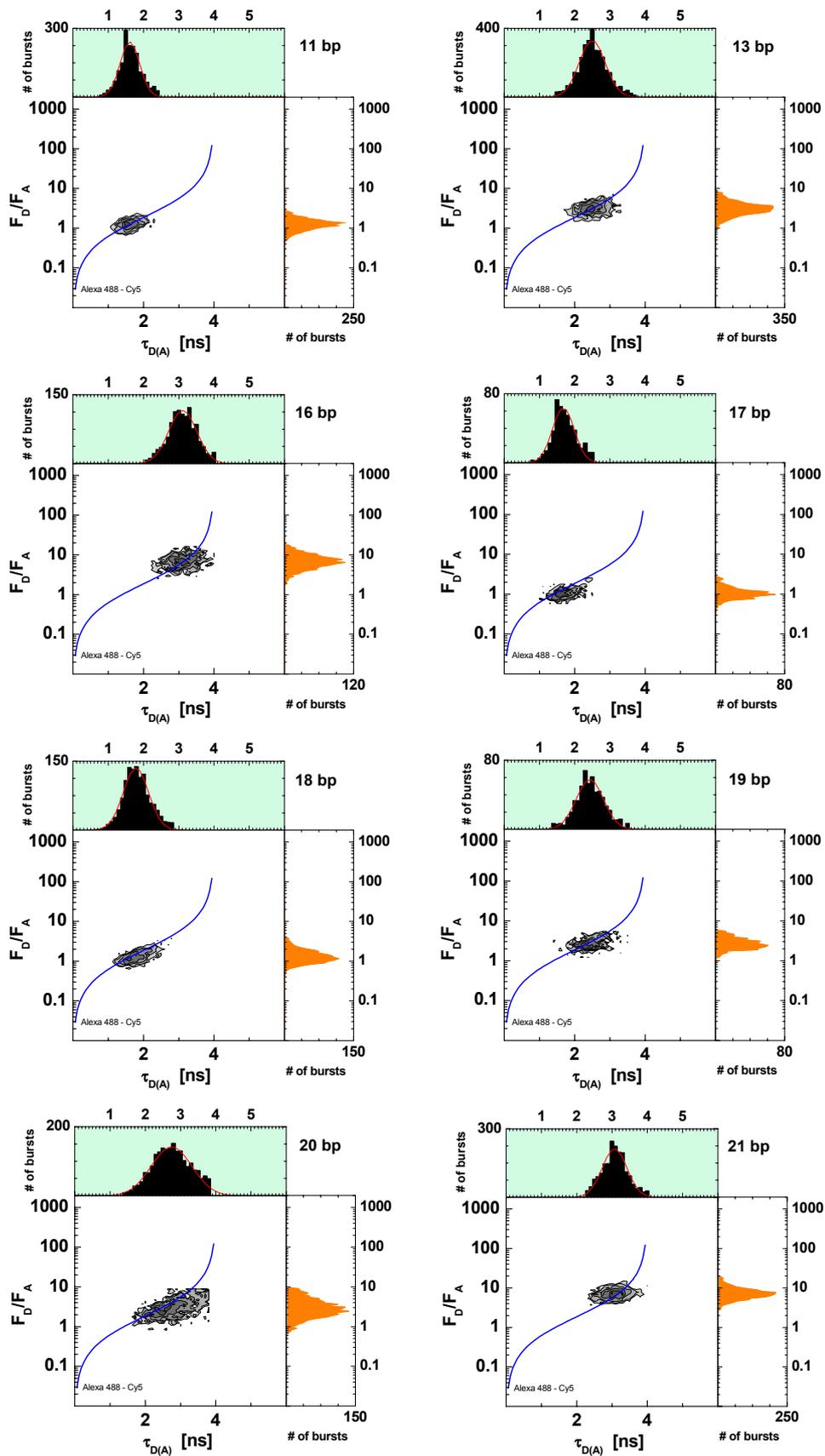


Abbildung 3: 2D-Histogramme der MFD-FRET Messungen der geknickten Helix mit drei ungepaarten Adeninen Die individuellen Korrekturparameter sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Der Schwerpunkt des $\tau_{D(A)}$ -Gaußfits ist ebenfalls in dieser Tabelle aufgeführt. Die Quantenausbeuten betragen $\phi_D = 0,8$ und $\phi_A = 0,43$. Kurve nach Gl. 1. # of bursts: Ereignisanzahl.

Tabelle 10: MFD-Rohdaten und der daraus geleiteten Ergebnisse zur geknickten Helix mit fünf ungepaarten Adeninen (Kapitel 4.1.2) $\tau_{D(A)}$ ist dem Gaußfit der jeweiligen Probe in Abbildung 4 entnommen. τ_D ist in einer nur den Donor enthaltenden Messung bestimmt worden. E_T berechnet sich aus diesen Werten nach Gl. 2-22, zur Korrektur der Transfereffizienz wird Gl. 4-6 herangezogen. Der daraus resultierende Abstand zwischen der mittleren Fluorophorverteilung läßt sich nach Gl. 2-24 mit einem Försterradius von $R_0 = 51,7 \text{ \AA}$ berechnen. Die Quantenausbeuten betragen bei den vorliegenden Messungen $\phi_D = 0,8$ und $\phi_A = 0,43$. Werte zur Abbildung 4-11e.

Abstand [bp]	$\tau_{D(A)}$ [ns]	τ_D [ns]	E_T	E_T (korr)	Abstand [\AA]	B_G / B_R [kHz]	g_G / g_R	α	E_T (fit)
11	1,6	4,01	0,60	0,70	45,0	4,2/1,8	0,31/0,39	0,018	0,73
13	2,5	4,01	0,38	0,41	55,0	3,5/1,0	0,31/0,39	0,018	0,42
15	3,11	4,01	0,22	0,22	63,8	3,4/0,9	0,31/0,39	0,018	0,29
17	1,67	4,01	0,58	0,68	45,7	3,3/0,9	0,31/0,39	0,018	0,83
18	1,75	4,01	0,56	0,65	46,6	3,3/0,9	0,31/0,39	0,018	0,77
19	2,43	4,01	0,39	0,43	54,1	3,8/1,6	0,31/0,39	0,018	0,48
20	2,6	4,01	0,35	0,38	56,2	3,8/1,4	0,31/0,39	0,018	0,39
21	3,07	4,01	0,23	0,23	63,1	3,4/0,9	0,31/0,39	0,018	0,22
22	3,16	4,01	0,21	0,21	64,8	3,4/0,9	0,31/0,39	0,018	0,19

23	3,2	4,01	0,20	0,20	65,5	3,4/0,9	0,31/0,39	0,018	0,13
25	3,57	4,01	0,11	0,10	74,8	3,8/1,6	0,31/0,39	0,018	0,05
27	3,88	4,01	0,03	0,03	91,4	3,4/0,9	0,31/0,39	0,018	0,03



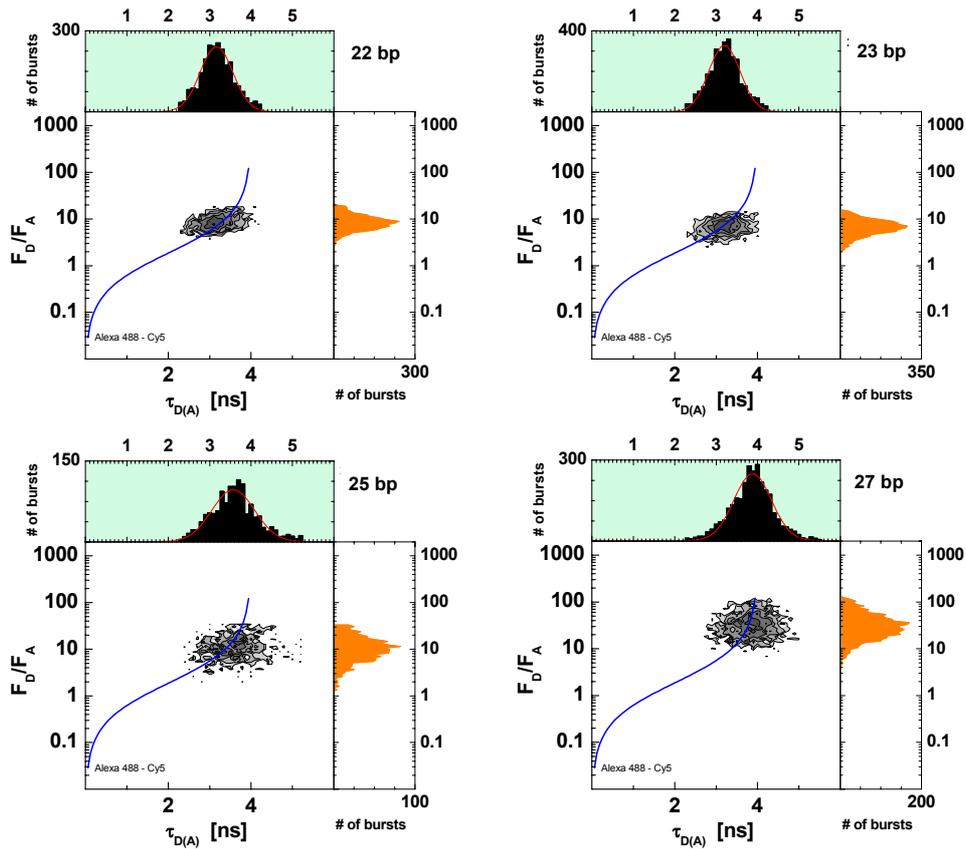
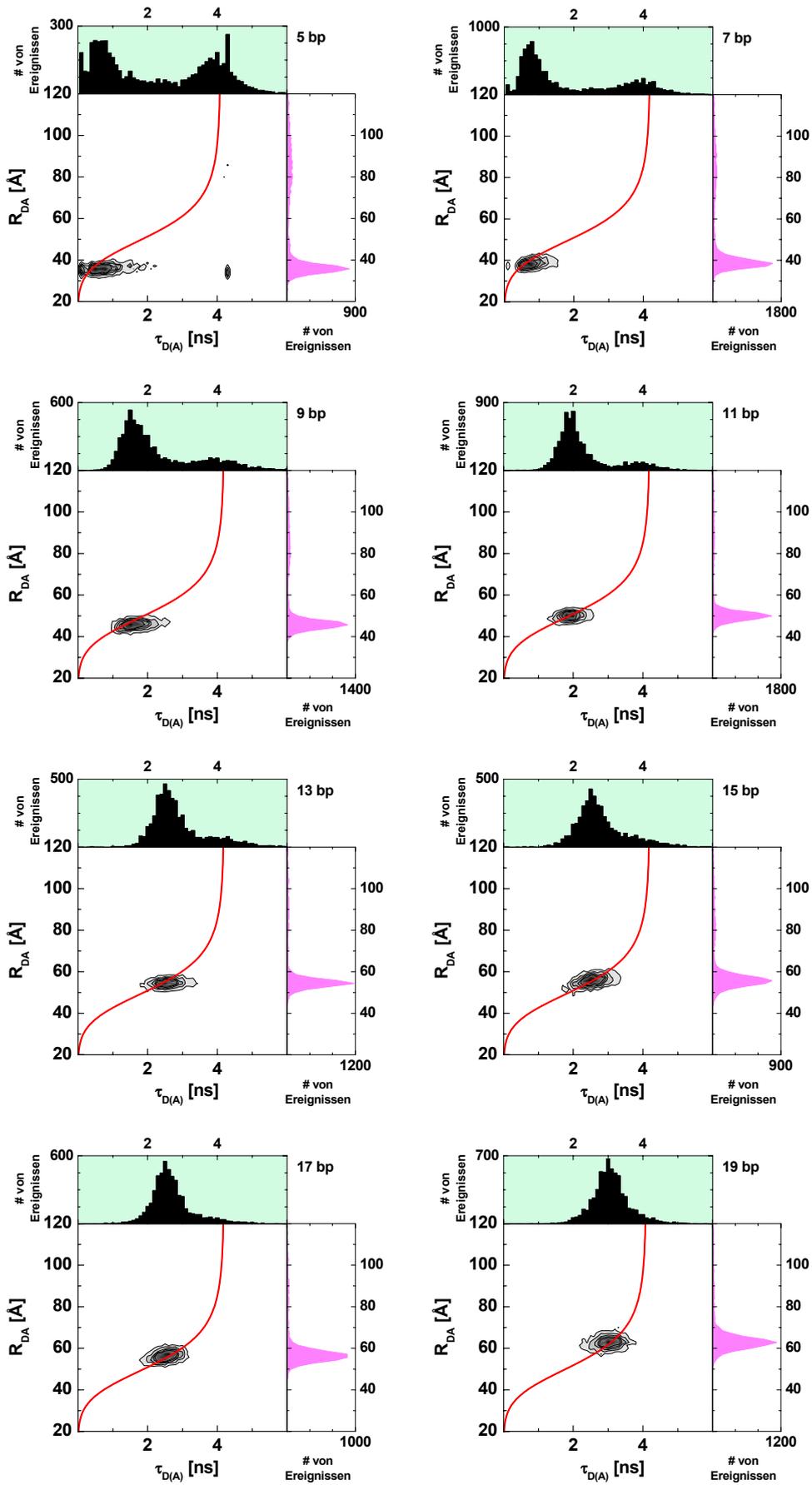


Abbildung 4: 2D-Histogramme der MFD-FRET Messungen der geknickten Helix mit fünf ungepaarten Adeninen Die individuellen Korrekturparameter sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Der Schwerpunkt des $\tau_{D(A)}$ -Gaußfits ist ebenfalls in dieser Tabelle aufgeführt. Die Quantenausbeuten betragen $\phi_D = 0,8$ und $\phi_A = 0,43$. Kurve nach Gl. 1. # of bursts: Ereignisanzahl.

Kapitel 4.2

Tabelle 11: MFD-Rohdaten und der daraus geleiteten Ergebnisse zur RNA-Helix $R_{DA}(F_D/F_A)$ ist einem Gaußfit der jeweiligen Probe in Abbildung 5 entnommen. E_T berechnet sich aus diesen Werten nach Gl. 2-22, zur Korrektur der Transfereffizienz wird die Gleichung aus Abbildung 4-26 herangezogen. Der daraus resultierende Abstand zwischen der mittleren Fluorophorverteilung läßt sich nach Gl. 2-24 mit einem Försterradius von $R_0 = 51,7 \text{ \AA}$ berechnen. Werte zur Abbildung 4-19, 4-22 und 4-23. Die in grau aufgeführten Werte sind nicht zur Auswertung herangezogen worden.

Abstand [bp]	$\tau_{D(A)}$	τ_D	E_T	R_{DA}	E_T	E_T (korr)	Abstand [\AA]
5	0,43	4,07	0,89	35,8	0,90	0,98	25,64
7	0,71	4,07	0,83	38,4	0,86	0,99	24,99
9	1,51	4,07	0,63	45,8	0,67	0,92	36,94
11	1,91	4,15	0,54	49,9	0,55	0,81	41,49
13	2,56	4,15	0,38	54,7	0,42	0,63	49,25
15	2,56	4,15	0,38	55,6	0,39	0,59	49,25
17	2,54	4,15	0,39	56,2	0,38	0,57	49,00
19	3,03	4,15	0,27	62,7	0,24	0,33	55,94
21	3,46	4,15	0,17	68,4	0,16	0,18	65,40



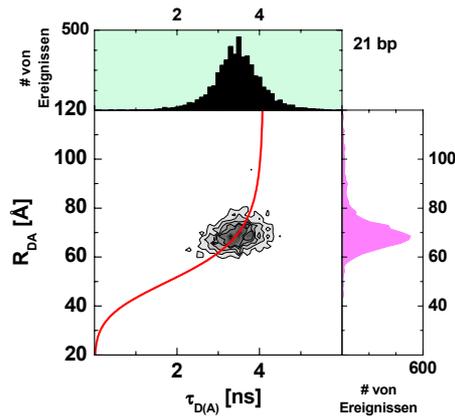


Abbildung 5: 2D-Histogramme der MFD-FRET Messungen der RNA-Helix Die Korrekturparameter für die MFD-Daten sind: $B_G = 2,9$ kHz, $B_R = 0,9$ kHz, $g_G = 0,36$, $g_R = 0,53$, $\alpha = 0,019$. Die Quantenausbeuten betragen $\phi_D = 0,8$ und $\phi_A = 0,48$. Weitere Daten siehe Tabelle 11. Kurve nach Gl. 3-3.

Tabelle 12: Auswirkung von Mittelungsregimes auf die Transfereffizienz Anwendung von Gl. 4-2 (helikales Modell), 4-4 (schnelle Rotation) und 4-5 (langsame Diffusion) auf den RNA MD-Datensatz. Werte zur Abbildung 4-20.

Abstand [bp]	helikales Modell	schnelle Rotation	langsame Diffusion
5	0,99	0,98	0,88
7	0,98	0,95	0,81
9	0,95	0,89	0,72
11	0,86	0,79	0,60
13	0,73	0,67	0,48
15	0,57	0,55	0,38
17	0,43	0,43	0,30
19	0,31	0,32	0,23
21	0,20	0,23	0,17

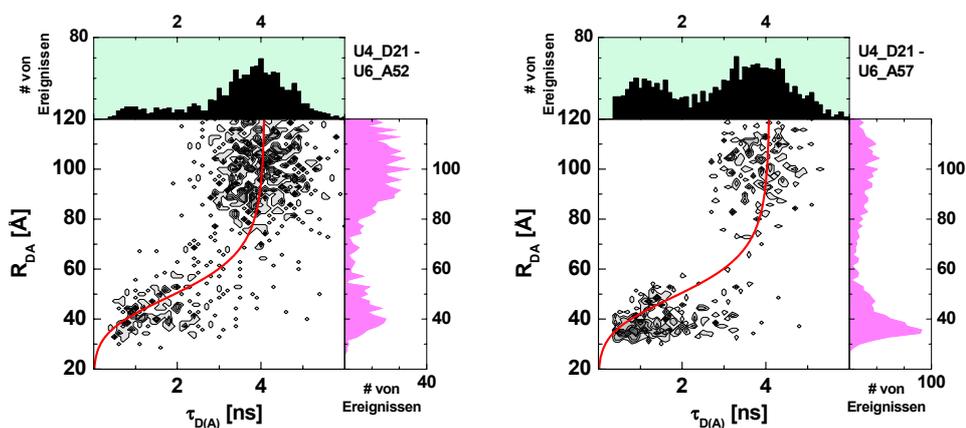
Tabelle 13: Auswirkung von Mittelungsregimes auf die Transfereffizienz/Wobbling-in-a-cone-Fit Anwendung von Gl. 4-2 (helikales Modell), 4-4 (schnelle Rotation) und 4-5 (langsame Diffusion) auf Subpopulation des RNA MD-Datensatzes (Abb. 4-21). Werte zur Abbildung 4-22.

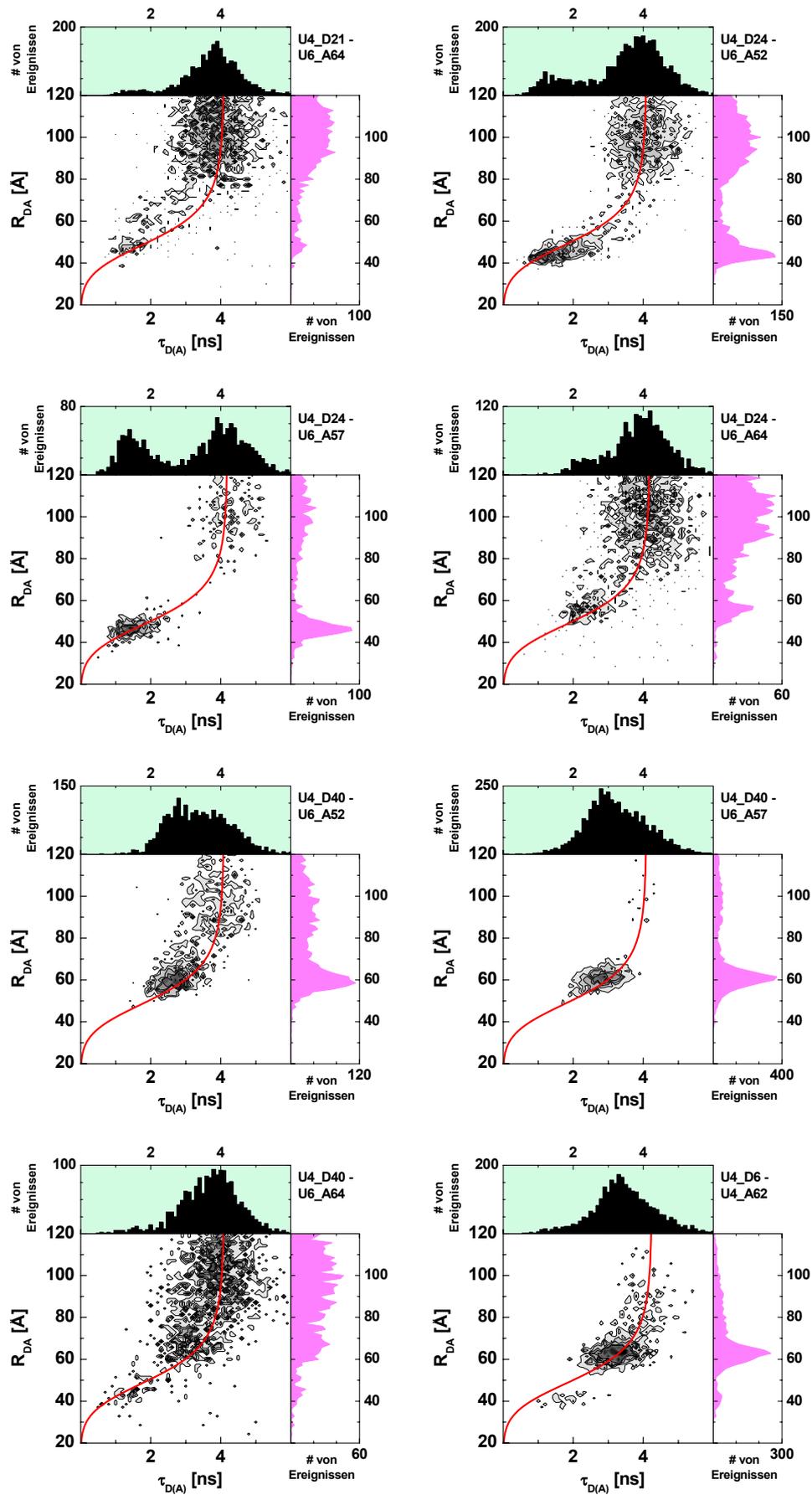
Abstand [bp]	helikales Modell	schnelle Rotation	langsame Diffusion	wobbling-in-a-cone-Fit
5	0.98	0.98	0.88	0,84
7	0.97	0.96	0.85	0,80
9	0.92	0.91	0.76	0,72
11	0.85	0.83	0.69	0,61
13	0.63	0.63	0.52	0,46
15	0.47	0.47	0.39	0,37
17	0.38	0.39	0.34	0,33
19	0.26	0.26	0.23	0,25
21	0.16	0.17	0.16	0,18

Kapitel 4.3.1

Tabelle 14: MFD-Rohdaten und der daraus geleiteten Ergebnisse zur RNA-Helix $R_{DA}(F_D/F_A)$ ist der MFD-Messung der jeweiligen Probe in Abbildung 6 entnommen. E_T berechnet sich aus diesen Werten nach Gl. 2-22, zur Korrektur der Transfereffizienz wird die Gleichung aus Abbildung 4-26 herangezogen. Der daraus resultierende Abstand zwischen der mittleren Fluorophorverteilung läßt sich nach Gl. 2-24 mit einem Försterradius von $R_0 = 51 \text{ \AA}$ berechnen. Rohdaten zur Tabelle 4-7. Die individuellen Quantenausbeuten finden sich in Tabelle 4-6.

Duplex	R_{DA} [\AA]	E_T	E_T (korr)	Abstand [\AA]	B_G/ B_R	g_G/ g_R	α	E_T (fit)
U4_D21 – U6_A52	38,8	0,84	0,99	24,2	2,04/0,76	0,36/0,54	0,019	0,54
U4_D21 – U6_A57	34,3	0,92	0,98	26,6	2,04/0,76	0,36/0,54	0,019	0,33
U4_D21 – U6_A64	46,3	0,64	0,89	35,7	2,13/0,76	0,36/0,54	0,019	0,25
U4_D24 – U6_A52	42,3	0,75	0,97	29,0	2,30/0,68	0,36/0,54	0,019	0,34
U4_D24 – U6_A57	44,8	0,69	0,93	33,3	2,50/0,70	0,40/0,54	0,019	0,26
U4_D24 – U6_A64	54,0	0,42	0,62	46,9	2,50/0,70	0,40/0,54	0,019	0,16
U4_D40 – U6_A52	59,3	0,29	0,42	53,9	2,54/0,71	0,40/0,54	0,019	0,11
U4_D40 – U6_A57	60,4	0,27	0,38	55,3	2,21/0,70	0,40/0,54	0,019	0,08
U4_D40 – U6_A64	66,4	0,17	0,21	63,9	2,14/0,72	0,40/0,54	0,019	0,06
U4_D6 – U4_A62	62,5	0,23	0,31	58,2	3,40/1,35	0,42/0,53	0,029	0,04
U4_D40 – U4_A62	78,0	0,07	0,02	98,4	3,20/1,20	0,36/0,53	0,023	0,03
U4_D24 – U4_A62	54,2	0,41	0,62	47,1	3,20/1,20	0,36/0,53	0,023	0,02





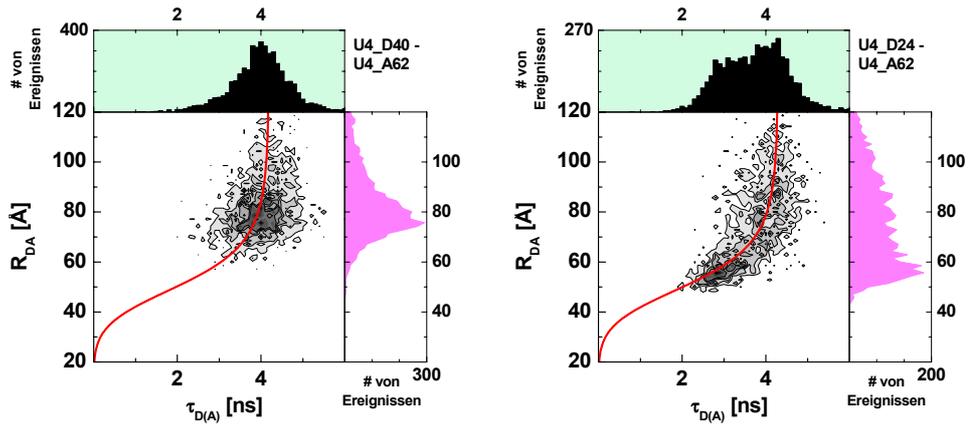


Abbildung 6: 2D-Histogramme der MFD-FRET Messungen der RNA-Helix Die Korrekturparameter für die MFD-Daten sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Die individuellen Quantenausbeuten finden sich in Tabelle 4-6. Weitere Daten siehe Tabelle 14. Kurve nach Gl. 3-3.

TCSPC-QUANTENAUSBEUTEMESSUNGEN

Daten zur in der Arbeit benutzten Fluoreszenzquantenausbeuten aus TCSPC-Ensemblemessungen. Die Werte berechnen sich aus den experimentell bestimmten Lebensdauern nach Gl. 3-2. Im Falle der Cy5 Proben sind die Lebensdauern sowohl monoexponentiell als auch biexponentiell angepaßt worden. Aus ersteren ist die Quantenausbeute berechnet worden, letztere liefern die bessere Anpassung und sind aus diesem Grunde der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 15: TCSPC-Lebensdauerdaten der Donoren Referenz: Alexa488 im Puffer, $\phi = 0,80$, Lebensdauer 4,07 ns

<i>Donorprobe im Doppelstrang</i>	<i>Lebensdauer [ns]</i>	Φ_{FD}
1a_D11	4,08	0,80
3a_D13	4,07	0,80
5a_D15	4,08	0,80
RNA_D13	4,07	0,80
RNA_D15	4,04	0,79
U4_D6	3,78	0,74
U4_D21	3,73	0,73
U4_D24	3,73	0,73
U4_D40	3,72	0,73

Tabelle 16: TCSPC-Lebensdauerdaten der Akzeptoren Referenz: Cy5 im Puffer, $\phi = 0,35$, Lebensdauer 0,90 ns

<i>Akzeptorprobe im Doppelstrang</i>	<i>Lebensdauern (biexp) [ns]</i>	<i>Anteil [%]</i>	<i>Lebensdauer (monoexp) [ns]</i>	Φ_{FD}
RNA_A20	0,78/1,34	26/74	1,19	0,46
RNA_A26	0,86/1,55	41/59	1,26	0,48
RNA_A32	0,82/1,44	35/66	1,22	0,47
U4_A62	0,82/1,76	16/84	1,61	0,62
U6_A52	0,82/1,67	25/75	1,45	0,56
U6_A57	0,94/2,2	28/72	1,83	0,70
U6_A64	0,78/1,46	27/73	1,27	0,51

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits folgendermaßen präsentiert und publiziert:

Publikationen

WOŹNIAK, A.K., NOTTROT, S., KÜHN-HÖLSKEN, E., SCHRÖDER, G.F. , GRUBMÜLLER, H., LÜHRMANN, R., SEIDEL, C.A.M., OESTERHELT, F., "Detecting protein-induced folding of the U4 snRNA Kink-turn by single-molecule multiparameter FRET measurements." (2005), *RNA*, **11(10)**, 1545-1554.

Vorträge

"Single Molecule FRET of Spliceosomes *in vitro* and *in vivo*."

Workshop on Single Molecule Detection, 27 April - 01 Mai 2003, Altleiningen.

"Analysing Protein-Induced Structural Changes in RNA by Single-Molecule FRET."

10th International Workshop on Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences, 22 – 24 September 2004, Berlin.

Poster

WOŹNIAK, A., SCHWEINBERGER, E., NOTTROT, S., KÜHN, E., SEIDEL, C.A.M., LÜHRMANN, R., F. OESTERHELT, F., "Single Molecule FRET and Multi-parameter Fluorescence Detection of Spliceosomal Particals in *in vitro* and *in vivo*." 8th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 24 – 27 August 2003, Prag, Tschechische Republik.

WOŹNIAK, A., NOTTROT, S., SEIDEL, C.A.M., LÜHRMANN, R., F. OESTERHELT, F., "Single molecule FRET of spliceosomal particles *in vitro* and *in vivo*", 9th International Workshop on Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences, 24 – 26 September 2003, Berlin.

WOŹNIAK, A., NOTTROT, S., SCHRÖDER, G., GRUBMÜLLER, H., R. LÜHRMANN, R., SEIDEL, C.A.M., OESTERHELT, F., "Single-Molecule FRET as a Tool for Absolute Distance Measurements." 228th ACS National Meeting, Subdivision Biophysical Chemistry and Novel Imaging of Single Molecules and Single Cells, 22 – 26 August 2004, Philadelphia.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die Promotion mit dem Thema

„Multiparameter-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur molekularen Dynamik an einzelnen Oligonukleotiden“

am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Jun.Prof. Dr. Filipp Oesterhelt eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

Es existieren keine vorherigen Promotionsversuche.

Düsseldorf, den