



Untersuchung von Funktionellen Dynamiken in DNA-  
Strukturen und DNA-Polymerasen mittels  
Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Markus Richert**

aus Dormagen

Düsseldorf, Juni 2014

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

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

Referent: Prof. Dr. Claus A. M. Seidel

Koreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Dynamisches Verhalten des Klenow-Fragmentes.....	2
1.2 Langsame Kinetik innerhalb von Holliday Strukturen .....	4
2 Theoretischer Hintergrund.....	5
2.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz .....	5
2.2 Fluoreszenzquantenausbeute und –lebensdauer.....	8
2.3 Fluoreszenzanisotropie.....	10
2.4 Förster Resonanz Energietransfer (FRET) .....	11
2.5 Auswahl der optimalen Farbstoffposition .....	16
2.6 „Accessible Volume“ (AV) Simulationen.....	17
2.7 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS).....	21
2.7.1 Gefilterte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und SCCF (“Species Cross Correlation Function“) .....	24
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Geräteliste.....	25
3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	26
3.3 Cysteinreaktive Fluoreszenzfarbstoffe .....	28
3.4 DNA-Oligomere .....	30
4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I.....	31
4.1 Die Klassifizierung der DNA-Polymerasen.....	32
4.1.1 Familie A Polymerasen.....	32
4.1.2 Familie B Polymerasen .....	32
4.1.3 Familie C Polymerasen .....	32
4.1.4 Familie D Polymerasen.....	32
4.1.5 Familie X Polymerasen .....	32
4.1.6 Familie Y Polymerasen .....	33
4.1.7 Reverse Transkriptasen (Familie RT) .....	33
4.2 Struktur-Funktionsbeziehungen im Polymerasezyklus .....	33
4.2.1 Grundlegende Struktur von DNA Polymerasen.....	33
4.2.2 Der Polymerasezyklus („nucleotide insertion pathway“) .....	35
4.2.3 Die Rolle von Tyrosin 766 im Polymerasezyklus .....	39
4.3 Experimentelle Arbeiten .....	41

4.3.1 Klonierung des für das Klenow-Fragment codierende Fragment des <i>polA</i> -Gens aus <i>Escherichia coli</i> in den Expressionsplasmid pQE-30.....	41
4.3.2 Einfügen von Cysteinen und funktionellen Mutationen in die Primärsequenz durch gerichtete Mutagenese .....	45
4.3.3 Induzierte Expression von <i>polA</i> -Varianten in <i>Escherichia coli</i> .....	50
4.3.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	51
4.3.5 Aufreinigung der Klenow-Fragmentvarianten mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) .....	53
4.3.6 Fluoreszenzmarkierung der Klenow-Fragmentvarianten .....	56
4.3.7 Abschätzung des Markierungsgrades.....	62
4.3.8 Bestimmung der Farbstoffposition für den Donor- und Akzeptorfarbstoff.....	66
4.3.9 Bestimmung der Nukleotidaffinität und DNA-Affinität von markiertem Protein .....	68
4.3.10 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung im Molekülensemble (eTCSPC).....	71
4.3.10.1 Datenauswertung.....	72
4.3.10.2 Selektion der Modellfunktion für eTCSPC-Analysen.....	78
4.3.10.3 Ergebnisse der eTCSPC-Experimente Einzelanpassung.....	80
4.3.10.4 Ergebnisse der eTCSPC-Experimente globale Anpassung .....	81
4.3.10.5 Fehlerabschätzung in der eTCSPC-Analyse.....	83
4.3.11 Multiparameterfluoreszenzdetektion (MFD) .....	86
4.3.11.1 Datenanalyse und FRET-Linien .....	88
4.3.11.2 Kurzanleitung zur Interpretation von MFD-Ergebnissen anhand von 2D-Histogrammen .....	91
4.3.11.3 MFD-Ergebnisse .....	92
4.3.12 Gefilterte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Spezies-Kreukorrelationsfunktion (SCCF) .....	102
4.4 Interpretation der Ergebnisse .....	105
4.4.1 Klonierung, Mutagenese, Expression und Fluoreszenzmarkierung des Klenow-Fragmentes.....	105
4.4.2 Nachweis einer bisher unbekannt, kompakten Konformation im Klenow-Fragment .....	106
4.4.3 Die Hydroxylfunktion im Tyrosin 766 als kinetischer „Türöffner“ für die Nukleotidbindung.....	110
4.4.4 Vorschlag eines neuen kinetischen Modells der strukturellen Dynamiken im Klenow-Fragment .....	112

4.4.5 Ansatz zur weiteren Überprüfung des Modells.....	115
5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen.....	116
5.1 TIRF-Mikroskopie/Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie .....	119
5.2 Präparation von Avidin-modifizierten Glasoberflächen.....	121
5.3 Hybridisierung und Immobilisierung der Holliday-Struktur .....	123
5.4 Messbedingungen für die Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie.....	124
5.5 Datenauswertung .....	126
5.6 Ergebnisse und Diskussion .....	128
Zusammenfassung .....	135
Summary .....	137
Danksagung .....	139
Literaturverzeichnis .....	140
Anhänge .....	148
Anhang B: eTCSPC Modellanpassungen .....	148
Freies Enzym Wildtyp .....	148
Freies Enzym Variante Y766S .....	149
Freies Enzym Y766F.....	150
Enzym-DNA-Komplex Wildtyp .....	151
Enzym-DNA-Komplex Y766S .....	152
Enzym-DNA-Komplex Y766F .....	153
Enzym-NTP-Komplex Wildtyp .....	154
Enzym-NTP-Komplex Y766S .....	155
Enzym-NTP-Komplex Y766F .....	156
Korrektes Nukleotid Wildtyp.....	157
Korrektes Nukleotid Y766S.....	158
Korrektes Nukleotid Y766F.....	159
Inkorrektes Nukleotid Wildtyp.....	160
Inkorrektes Nukleotid Y766S .....	161
Inkorrektes Nukleotid Y766F .....	162
Anhang B: SCCF Ergebnisse .....	167
Freies Enzym.....	167
Enzym-DNA-Komplex .....	168
Enzym-NTP-komplex .....	168
Inkorrektes Nukleotid .....	169

Korrektes Nukleotid.....	169
Anhang D: Aminosäuresequenzen.....	170
Klenow-Fragment D548C,G743C .....	170
Klenow-Fragment D548C,G743C,Y766S .....	170
Klenow-Fragment D548C,G743C,Y766F .....	171
Anhang E: Manuskript.....	171

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abstandsmessungen mittels FRET.....	1
Abbildung 2: Kristallstrukturen des zum Klenow Fragment analogen Bacillus Fragment. .....	3
Abbildung 3: Vereinfachtes Jablonski Diagramm. ....	5
Abbildung 4: Überlappungsintegral Alexa 488 und Alexa 647. ....	12
Abbildung 5: Orientierungsfaktor $\kappa^2$ und Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz. .....	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ansatzes der AV-Simulation.....	17
Abbildung 7: Graphische Darstellung der Ergebnisse einer AV-Simulation für die Struktur der DNA Polymerase I aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> . ....	19
Abbildung 8: Strukturvergleich der homologen Enzyme.....	20
Abbildung 9: Simulierter Verlauf der Fluoreszenzautkorrelationsfunktion.....	22
Abbildung 10: Molekülstruktur und spektroskopische Parameter für Alexa Fluor® 488 C <sub>5</sub> Maleimid. ....	28
Abbildung 11: Molekülstruktur und spektroskopische Parameter für Alexa Fluor® 647 C <sub>2</sub> Maleimid. ....	29
Abbildung 12: Röntgenkristallstrukturen verschiedener DNA Polymerasen. ....	34
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Polymerasezyklus ("nucleoide insertion pathway"). ....	35
Abbildung 14: Orientierung der O-Helix in den Konformationen "open", "ajar" und "closed".....	36
Abbildung 15: Rolle der Metallkofaktoren in der Polymerasereaktion.....	38
Abbildung 16: Hypothetische Funktion des konservierten Tyrosins. ....	39
Abbildung 17: Ergebnis der PCR-Reaktion und schematische Darstellung des Konstruktes pQE-30-KF-wt.....	44
Abbildung 18: Reaktionsschema für die Reaktion eines Maleimids mit einem Thiol....	45
Abbildung 19: Schematische Darstellung der „Overlap extensoin PCR“ zur gerichteten Mutagenese. ....	46
Abbildung 20: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese zur Erzeugung der überlappenden Fragmente. ....	47
Abbildung 21: Ergebnis der SDS-PAGE der Überexpression für die Variante KF-D548C- G743C des <i>polA</i> -Fragmentes.....	51

Abbildung 22: Chromatogramm der IMAC-Aufreinigung der Variante KF-D548C-G743C des Klenow-Fragmentes. ....	54
Abbildung 23: Ergebnis der SDS-PAGE der IMAC-Aufreinigung der Variante KF-D548C-G743C des Klenow-Fragmentes. ....	54
Abbildung 24: Vergleich der Arbeitsschritte für „Acceptor first“ und „Donor first“ . ....	58
Abbildung 25: Chromatogramm der Aufreinigung der Variante KF-D548C mittels Gelfiltration des Klenow-Fragmentes nach Donorfarbstoffmarkierung. ....	59
Abbildung 26: Chromatogramm der Aufreinigung der Variante KF-D548C-G743C mittel Ionenaustuschchromatographie des Klenow-Fragmentes nach Donorfarbstoffmarkierung. ....	60
Abbildung 27: Absorptionsspektrum der doppelt markierten Variante KF-D548C-G743C-Y766F. ....	64
Abbildung 28: Ergebnis der Bestimmung der Farbstoffposition mittel enzymatischer Spaltung und SDS-PAGE. ....	67
Abbildung 29: Titrationskurven der Nukleotid- und DNA-Affinitätsbestimmung. ....	69
Abbildung 30: Schematische Darstellung der kinetischen Zusammenhänge zwischen Fluoreszenzlebensdauer und Energietransfer. ....	72
Abbildung 31: Auswirkungen des Energietransfers (rot) auf das zeitabhängige Fluoreszenzsignal des Donor- und Akzeptorfarbstoffes im Vergleich zu reinem Donorfarbstoff bzw. Akzeptorfarbstoffdirektanregung (blau). ....	73
Abbildung 32: Ergebnisse der eTCSPC-Experimente für die Messung der Variante KF-D548C-A488-G743C-A647 in Messpuffer. ....	78
Abbildung 33: Ergebnisse der Fehlerabschätzung für die drei Abstände und die dazugehörigen Spezeisanteile. ....	83
Abbildung 34: 2D-Histogramme der aus der Fehlerabschätzung gewonnenen Abstandsverteilungen. ....	84
Abbildung 35: Schematische Übersicht des verwendeten MFD-Aufbaus. ....	87
Abbildung 36: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Populationen in einem 2D-Histogramm. ....	91
Abbildung 37: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für das freie Enzym. ....	93
Abbildung 38: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-DNA-Komplex. ....	95
Abbildung 39: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-dNTP-Komplex. ....	97



Abbildung 40: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-DNA-dNTP-Komplex mit korrektem Nukleotid.....	98
Abbildung 41: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-DNA-dNTP-Komplex mit inkorrektem Nukleotid.....	100
Abbildung 42: Auswahl der Fluoreszenzereignisse aus dem 2D-Histogramm zur Erstellung von Filtern für die SCCF.....	102
Abbildung 43: Beispiel der Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion und Spezies-Autokorrelationsfunktion der Messung am freien Enzym der Variante KF-D548C-G743C.....	103
Abbildung 44: Schematische Darstellung der präparativen Arbeiten. ....	105
Abbildung 45: Amplitudenvergleich der eTCSPC-Ergebnisse. ....	107
Abbildung 46: Übersicht der Speziesanteile der gefundenen Abstände in Bezug zu den Messbedingungen für das wildtypische Enzym.....	109
Abbildung 47: Amplitudenvergleich der eTCSPC Ergebnisse für das freie Enzym.....	110
Abbildung 48: Kinetisches Modell der Polymerasefunktion mit 5 Zuständen. Links: ...	112
Abbildung 49: Vergleich der Experimentellen Ergebnisse (oben) mit den Simulationen (unten).....	113
Abbildung 50: Vergleich der Kreuzkorrelationskurven für Simulation und Experiment. ....	114
Abbildung 51: Schematische Darstellung der Holliday-Struktur.....	116
Abbildung 52: Kinetisches Modell des Konformationsüberganges. ....	117
Abbildung 53: Schematische Darstellung des verwendeten TIRF-Aufbau.....	120
Abbildung 54: Flussdiagramm der Oberflächenpräparation zur Immobilisierung von biotinylierten Makromolekülen.....	122
Abbildung 55: Markierungspositionen in den beiden Grenzstrukturen und der offenen Struktur der untersuchten Holliday-Struktur.....	123
Abbildung 56: Reaktionsschema der Glukoseoxidase-Katalase Kombination zur Sauerstoffentfernung.....	125
Abbildung 57: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Holliday-Struktur bei 40 mM Magnesium. ....	128
Abbildung 58: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 80 mM Magnesium. ....	129
Abbildung 59: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 120 mM Magnesium. ....	130

Abbildung 60: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 160 mM Magnesium.....	131
Abbildung 61: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 200 mM Magnesium.....	132
Abbildung 62: Experimentell ermittelte Raten und Vergleich mit veröffentlichten Daten.....	134

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorbereitete Varianten des Klenow-Fragmentes.....	16
Tabelle 2: Korrespondierende Farbstoffpositionen Klenow-Fragment und <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	20
Tabelle 3: Ergebnisse der zu erwartenden Abstände nach AV-Simulation.....	21
Tabelle 4: Liste der verwendeten Laborgeräte .....	25
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligonukleotide. ....	30
Tabelle 7: PCR-Ansatz zur Amplifizierung des Klenow-Fragmentes des <i>polI</i> -Gens. ....	41
Tabelle 8: PCR-Programm zur Amplifizierung des Klenow-Fragmentes des <i>polA</i> -Gens. ....	42
Tabelle 9: Liste der Mutagenesepositionen und ihr jeweiliger Verwendungszweck. ...	45
Tabelle 10: PCR-Ansatz für die PCR II zur gerichteten Mutagenese mittels overlap extension PCR.....	48
Tabelle 11: PCR-Programm zur gerichteten Mutagenese mittels overlap extension PCR.....	48
Tabelle 12: Auflistung der erstellten Konstrukte.....	49
Tabelle 13: Verwendete Rezepte für die SDS-PAGE .....	52
Tabelle 14: Pufferzusammensetzung der eingesetzten Pufferlösungen in der Aufreinigung und der Farbstoffmarkierung der Klenow-Fragmentvarianten.....	55
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Proteinvarianten.....	61
Tabelle 16: Verwendete Extinktionskoeffizienten zur Berechnung der Markierungsgrade.....	62
Tabelle 17: Ergebnisse der Bestimmung des Markierungsgrades. ....	65
Tabelle 18: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für die verwendeten Nukleotide und das verwendete DNA-Substrat. ....	70
Tabelle 19: Verwendete Laserlichtquellen und Wellenlängen für eTCSPC-Experimente .....	71
Tabelle 20: Ergebnisse der unterschiedlichen Modelle (1 Abstand: 1R, zwei Abstände: 2R, drei Abstände: 3R) des eTCSPC Datensatz der Variante KF-D548C-A488-G743C-A647. ....	79
Tabelle 21: Ergebnisse der eTCSPC Analyse mittels individueller Abstandsverteilung. Alle Abstände sind in Å angegeben. Die Speziesanteile sind auf eine Summe von 1	

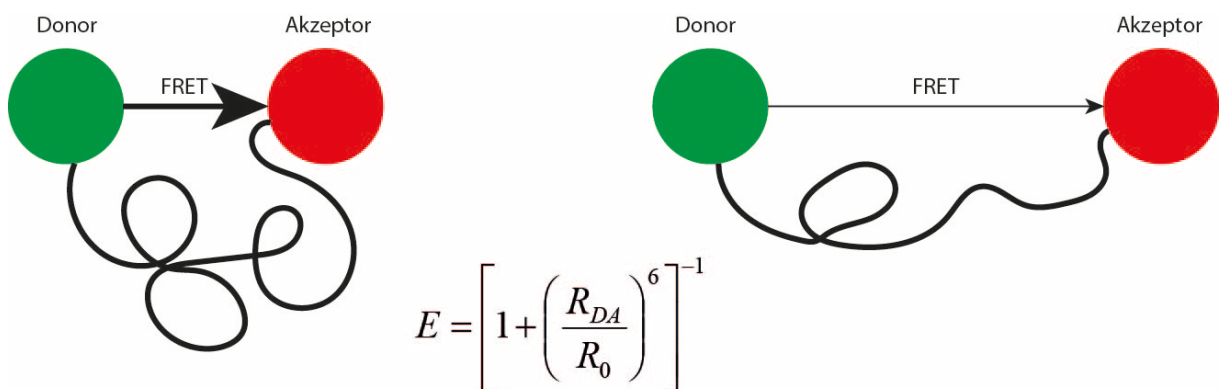
normiert. In der Regel lag der Anteil an freiem Farbstoff zwischen 10 % und 30 % (siehe Anhang B).....	80
Tabelle 22: Anteile der drei Abstände im Molekülensemble der eTCSPC-Messungen. Die Speziesanteile sind auf eine Summe von 1 normiert.....	82
Tabelle 23: Geschätzte Fehler für die Abstände und Speziesanteile für eine Modellfunktion mit drei normalverteilten Abständen mit fixiertem $\sigma$ (6 Å). .....	85
Tabelle 24: Verwendete Funktionen in den dargestellten 2D-Histogrammen und verwendete Messpuffer .....	92
Tabelle 25: Relaxationszeiten aus SCCF.....	104
Tabelle 26: Übersicht der kinetischen Konstanten für den Übergang A/B-Konformer zu A/D-Konformer. ....	133

# 1 Einleitung

## 1 Einleitung

Die Fluoreszenzspektroskopie hat seit der Entwicklung der ersten Spektrofluorometer in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts vor allem in den Biowissenschaften stark an Bedeutung gewonnen. Eine ausführliche Beschreibung von Fluoreszenz erfolgte bereits Mitte des 19. Jahrhunderts durch John Friedrich Herschel (1845), der die Fluoreszenz von Chinin beschrieb. Eine erste Formulierung eines Photolumineszenzmechanismus erfolgte jedoch erst 1935 durch Alexander Jablonski. Mittlerweile stellt die Fluoreszenzspektroskopie ein universelles Werkzeug für die unterschiedlichsten Fragestellungen innerhalb der Biologie und Biochemie dar. Ein großer Vorteil ist dabei die hohe Detektionsempfindlichkeit, die es ermöglicht, selbst geringste Konzentrationen bis hin zu einzelnen Molekülen zu detektieren.

Das Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) Prinzip beruht auf einem strahlungslosen und abstandsabhängigen Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren.



**Abbildung 1: Abstandsmessungen mittels FRET.** Das FRET Prinzip beruht auf dem strahlungslosen Energieübertrag von einem Donorfarbstoff zu einem Akzeptorfarbstoff, dessen Transfereffizienz (E) stark Abhängig ist vom Abstand der Farbstoffe ( $R_{DA}$ ). Der Förster Radius ( $R_0$ ) gibt dabei den Abstand mit 50% Transfereffizienz an.

FRET zwischen Farbstoffmolekülen, die an die Oberfläche von Proteinen gebunden wurden, wurde vielfach erfolgreich für die Analyse von strukturellen Änderungen in Proteinen eingesetzt (Ha et al. 2002; Schuler et al. 2002; Lipman et al. 2003; Margittai et al. 2003). Eine strukturelle Dynamik in Proteinen hat zusätzlich zwangsläufig eine Heterogenität der Struktur im Molekülensemble zur Folge, so dass FRET Experimente mit einzelnen Molekülen sehr vorteilhaft sind, um die Reaktionsabläufe und die damit verbundenen Strukturänderungen zeitlich aufgelöst zu verfolgen.

# 1 Einleitung

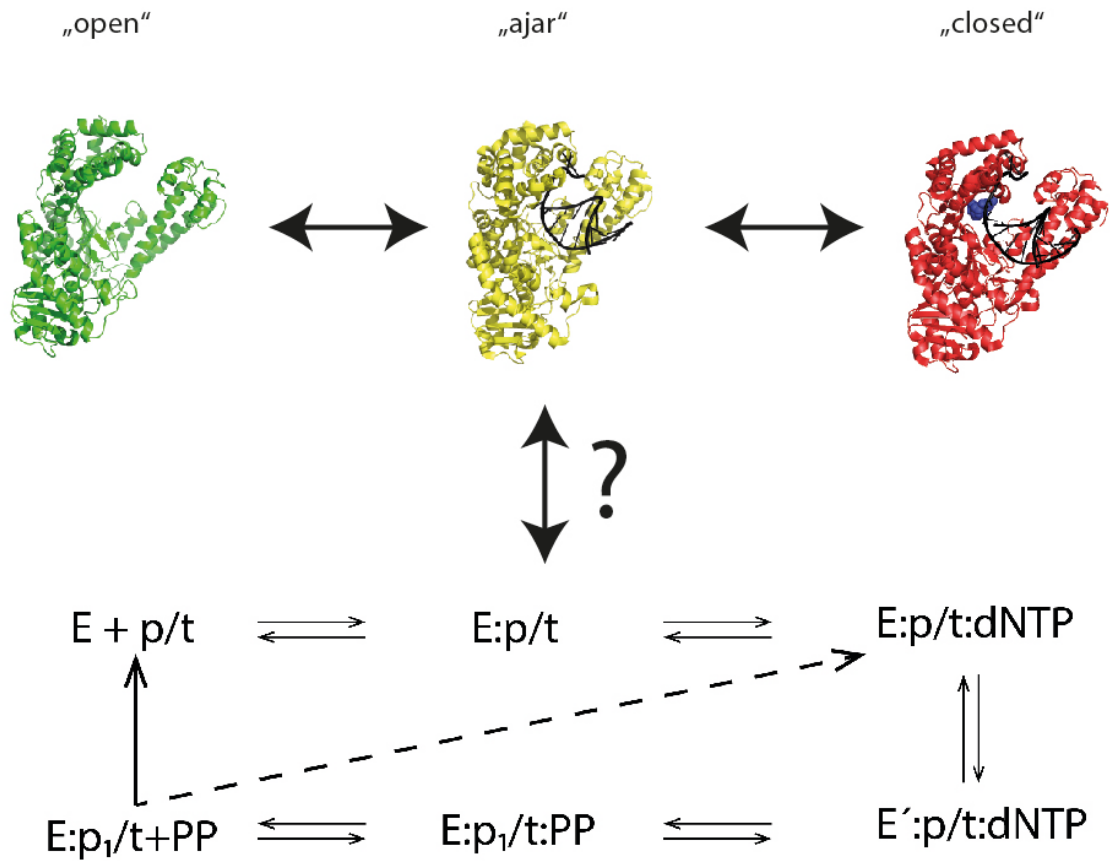
Obwohl die Zahl gelöster Proteinstrukturen stetig steigt, sind Techniken wie Röntgenkristallographie nur bedingt in der Lage, die funktionelle Dynamik eines Proteins zu zeigen. Gerade diese dynamischen Strukturen sind jedoch entscheidend für das Verständnis von Enzymfunktion und Proteinfaltung. Moderne fluoreszenzspektroskopische Verfahren wie Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie ermöglichen durch die Berücksichtigung der Zeit als vierte Dimension genau dies. Da diese Form der Messtechnik die Untersuchung der Probenmoleküle sowohl in Lösung als auch im immobilisierten Zustand erlaubt, sind dynamische Messungen bis zu mehreren 100 Sekunden an einem einzelnen Molekül möglich. Experimente an frei diffundierenden Molekülen erlauben die Messung von schnellen Dynamiken (ns-ms) im Bereich der Diffusionszeit eines Moleküls (ms), während an immobilisierten Molekülen langsame Prozesse (> 10 ms) beobachtet werden können.

In dieser Dissertation wurden die Auswirkungen von dynamischen Konformationsänderungen auf die jeweilige Funktion von zwei prototypischen, biologischen Makromolekülen, die eine zentrale Bedeutung für die Vervielfältigung von genetischem Material und dessen Rekombination in Organismen haben, durch fluoreszenzspektroskopische Methoden untersucht. Dabei wurden sowohl Messungen an immobilisierten Molekülen mit Hilfe eines TIRF Aufbaus („Total internal reflection fluorescence“) mit kamerabasierter Detektion durchgeführt, als auch Messungen am konfokalen Mikroskop mit frei diffundierenden Molekülen.

## 1.1 Dynamisches Verhalten des Klenow-Fragmentes

Zentrales Thema dieser Dissertation ist die Untersuchung des Einflusses der Konformationsdynamik auf die Enzymfunktion anhand des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli*. Die fehlerfreie und sichere Vervielfältigung des Erbgutes ist eine Voraussetzung für das Überleben eines Organismus. Um vor allem eine fehlerfreie Vervielfältigung zu gewährleisten, müssen die für die DNA Replikation verantwortlichen DNA-Polymerasen das passende 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dNTP) in Bezug zu einem komplementären DNA-Strang auswählen und schließlich mit dem schon replizierten Teilstück verbinden. Obwohl bereits eine große Zahl an strukturellen Untersuchungen vorliegt (Freemont et al. 1988; Beese et al. 1993; Beese et al. 1993; Wu et al. 2011), ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt, wann und wie die Diskriminierung zwischen einem komplementären und einem nicht-komplementären Nukleotid erfolgt.

## 1 Einleitung



**Abbildung 2: Kristallstrukturen des zum Klenow Fragment analogen Bacillus Fragment.** Von den drei Kristallstrukturen („open“, „ajar“ und „closed“) konnten zwei Strukturen („open“ und „closed“) funktionellen Zuständen zugewiesen werden. Der genaue kinetische Ablauf der enzymatischen Reaktion ist jedoch nicht vollständig geklärt. In schwarz hervorgehoben sind DNA-Substrate, in blau das korrespondierende Nukleotid. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine einfache Form des Polymerasezyklus (siehe **Abbildung 13: Schematische Darstellung des Polymerasezyklus („nucleotide insertion pathway“)**).

Ein in Polymerasen der Familie A konserviertes Tyrosin steht dabei im Fokus. Der Verlust des aromatischen Rings der Tyrosinseitenkette führt zu einem Verlust der Replikationsgenauigkeit (Minnick et al. 1999). Bisher konnte jedoch kein struktureller Nachweis geführt werden, der eine Korrelation dieser Seitenkette mit einer für die fehlerlose Replikation verantwortlichen Konformation verknüpft. Ziel dieser Arbeit war es, mittels zeitaufgelöster Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie von frei diffundierenden Molekülen diese Korrelation zu finden. Neben strukturellen Informationen aus Abstandsmessungen mittels FRET ermöglicht die hohe Zeitauflösung der Experimente einen zusätzlichen Einblick in die kinetischen Zusammenhänge innerhalb des Funktionszyklus der DNA-Polymerasen.

# 1 Einleitung

## 1.2 Langsame Kinetik innerhalb von Holliday Strukturen

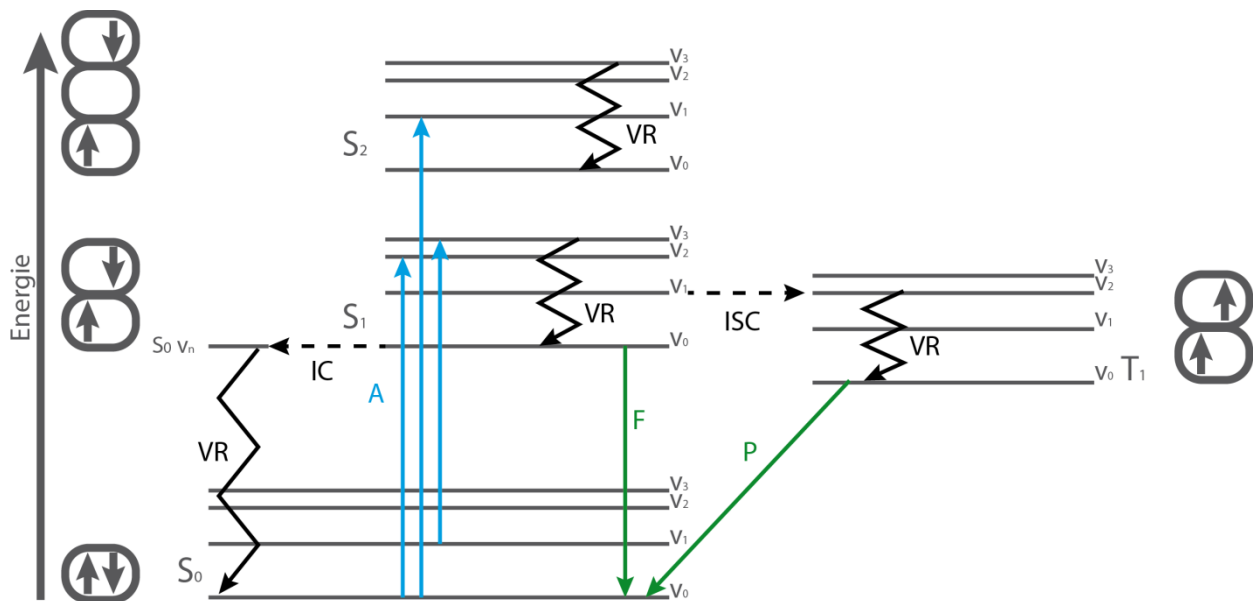
Holliday-Strukturen (Holliday 1964) spielen eine entscheidende Rolle in der Rekombination von DNA-Molekülen und sind somit involviert in die Reparatur von beschädigter Erbinformation als auch in die Neukombination von bereits bestehendem genetischem Material zur Aufrechterhaltung der genetischen Vielfalt (Broker et al. 1971; Sigal et al. 1972; Schwacha et al. 1995). Die zu erwartende Kinetik innerhalb der Struktur wurde bereits mit Hilfe von Einzelmolekülfluoreszenz untersucht und ein einfaches, kinetisches Modell aus drei Konformeren wurde aufgestellt (McKinney et al. 2003). Hierzu wurden Holliday-Strukturen immobilisiert und Relaxationszeiten von mehreren Millisekunden gefunden. Die Kinetik wird dabei direkt durch die Anwesenheit von zweiwertigen Ionen (insbesondere  $Mg^{2+}$ ) beeinflusst. Die dabei verwendete Technik erlaubte jedoch keine Analyse des Verhaltens von Holliday-Strukturen bei sehr niedriger Magnesiumkonzentration ( $\sim \mu M$ ), da die zu erwartende Kinetik außerhalb des zeitlichen Auflösungsvermögens lag. Experimente an frei diffundierenden Molekülen mit höherer Zeitauflösung zeigten jedoch, dass sich das dynamische Verhalten der Holliday-Struktur unter diesen Bedingungen nicht mit dem etablierten Modell erklären lassen (Valeri 2009). Ziel der Arbeit war es, die bereits durchgeführten Arbeiten durch Messungen an immobilisierten Molekülen bei hohen Magnesiumkonzentrationen zu ergänzen und das vorgeschlagene, alternative Modell für die untersuchte Holliday-Struktur zu bestätigen.



### 2 Theoretischer Hintergrund

#### 2.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Die Anregung eines Moleküls aus seinem Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand und die anschließende Relaxation in den Grundzustand unter Abstrahlung von elektromagnetischer Strahlung wird als Lumineszenz bezeichnet. Erfolgte die Anregung dabei durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch das System, spricht man von Photolumineszenz. Die Prozesse zwischen Absorption und Emission werden üblicherweise in einem Jablonski Diagramm dargestellt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Vereinfachtes Jablonski Diagramm.** Dargestellt sind die grundlegenden Prozesse, auf denen die Fluoreszenz und Phosphoreszenz beruhen.  $S_0$ : Singulett Grundzustand;  $S_1$ : erster angeregter Singulett Zustand;  $S_2$ : zweiter angeregter Singulett Zustand;  $T_1$ : erster angeregter Triplett Zustand;  $V_0, V_1, V_2, V_n$ : Schwingungszustände aufsteigender Energie; **IC**: „internal conversion“, strahlungslose Relaxation zwischen zwei Zuständen gleicher Multiplizität; **ISC**: „intersystem crossing“, Übergang zwischen zwei energetisch gleichwertigen Niveaus unterschiedlicher Multiplizität (hier Singulett-Triplett); **VR**: „vibrational relaxation“, Relaxation von höher angeregten Schwingungszuständen in den Schwingungsgrundzustand; **F**: Übergang vom  $S_1$ -Zustand in den  $S_0$ -Zustand unter Emission eines Fluoreszenzphotons; **P**: Übergang vom  $T_1$  in den  $S_0$  unter Emission eines Phosphoreszenzphotons; **A**: Absorptionsprozess mit elektronischer Anregung aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand. Die Boxen mit Pfeilen zeigen die jeweilige Spinausrichtung der Elektronen.

## 2 Theoretischer Hintergrund

Ausgehend von einem elektronischen Singulett-Grundzustand ( $S_0$ ) erfolgt die Anregung des Moleküls in einen elektronischen Singulettzustand höherer Energie ( $S_1, S_2$ ). Jeder dieser elektronischen Zustände existiert zusätzlich in unterschiedlichen Schwingungszuständen ( $v_1, v_2, \dots, v_n$ ). Sowohl die Absorption, als auch die Emission, folgen dabei dem Franck-Condon-Prinzip (Condon 1926; Franck et al. 1926), wonach der elektronische Übergang so schnell erfolgt ( $\sim 10^{-15}$  s), dass die im Vergleich dazu langsame Kernschwingung vernachlässigt werden kann. Die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei Zuständen ist durch die Überlappung der Wellenfunktion der jeweiligen Schwingungszustände gegeben. Aus diesem Grund erfolgt die Anregung aus dem Grundzustand in der Regel in höhere Schwingungszustände eines angeregten Zustandes. Die typische Lebensdauer eines angeregten Zustandes von  $\sim 10^{-8}$  s ermöglicht eine Relaxation der höheren Schwingungszustände in den Schwingungsgrundzustand des ersten, elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$  ( $\sim 10^{-12}$  s), welches als „vibrational relaxation“ (VR) bezeichnet wird. Unter Emission eines Photons erfolgt nun die weitere Relaxation des Moleküls in den  $S_0$ -Zustand. Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet. Dem Franck-Condon-Prinzip folgend erfolgt auch dieser Übergang in einen angeregten Schwingungszustand des  $S_0$ , aus welchem sich innerhalb von  $\sim 10^{-12}$  s ein thermisches Gleichgewicht einstellt. Ein Vergleich der Absorption mit der Emission zeigt, dass das Fluoreszenzlicht zur Absorption üblicherweise langwellig verschoben ist. Dieses Phänomen wurde bereits 1853 von Sir G.G. Stokes beobachtet und wird daher als „Stokes-Shift“ bezeichnet. Des Weiteren erfolgt die Emission aus dem Schwingungsgrundzustand des  $S_1$ , auch im Fall einer Anregung des Moleküls in höhere Zustände. Die Emission ist somit unabhängig von der Absorption und demzufolge sind Fluoreszenzemissionsspektren unabhängig von der gewählten Anregungswellenlänge, was als „Regel von Kasha“ (Kasha 1950) bezeichnet wird. Alle beschriebenen Prozesse laufen im Bereich von Nanosekunden bis Picosekunden ab. Die Abklingkurven eines Fluoreszenzphänomens zeigen daher üblicherweise Lebensdauern von wenigen Nanosekunden, die fluorophortypische Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$ .

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die Fluoreszenzanregung und -emission folgen dabei quantenmechanischen Auswahlregeln (Fermis goldene Regeln): Elektronische Übergänge sind nur zwischen Zuständen gleicher Multiplizität erlaubt, also unter Beibehaltung des Elektronenspins des angeregten Elektrons. Übergänge mit Spinumkehr sind quantenmechanisch „verboten“.

Da die meisten Moleküle in ihrem Grundzustand eine antiparallele Elektronenspinkonfiguration, und somit eine Multiplizität von 1 ( $M=2S+1=1$ , Singulett) zeigen, erfolgt die elektronische Anregung den Auswahlregeln folgend in einen angeregten Singulett-Zustand (üblicherweise  $S_1$ ). Mit niedriger Wahrscheinlichkeit kann es nun zu einer „verbotenen“ Spinumkehr kommen, wobei das Molekül vom Singulett in den Triplett-Zustand ( $M=2S+1=3$ ) mit parallelem Elektronenspin übergeht. Dieser Prozess wird als „intersystem crossing“ (ISC) bezeichnet. Eine Relaxation aus dem angeregten Triplett-Zustand in den Grundzustand des Moleküls muss nun ebenfalls mit einer Spinumkehr erfolgen. Da auch dieser Prozess quantenmechanischen Auswahlregeln widerspricht und somit mit niedriger Wahrscheinlichkeit erfolgt, zeigen diese angeregten Triplett-Zustände ( $T_1$ ) im Vergleich zu Fluoreszenzprozessen verlängerte Lebenszeiten von typischerweise Sekunden bis Minuten. Eine Relaxation in den Grundzustand unter Emission eines Photons erfolgt somit im Vergleich zur Fluoreszenz deutlich zeitverzögert und wird abgrenzend als Phosphoreszenz bezeichnet, was auf den phosphoreszierenden Eigenschaften des weißen Phosphors beruht.

Neben diesen beiden lichtemittierenden Prozessen kann eine Relaxation sowohl über strahlungslose Prozesse innerhalb des Moleküls („internal conversion“, IC), als auch über die Abgabe der Energie an weitere Moleküle, zum Beispiel des Lösungsmittels, erfolgen. Sind diese Prozesse ähnlich schnell wie der konkurrierende Fluoreszenzprozess, so werden die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes beeinflusst.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.2 Fluoreszenzquantenausbeute und –lebensdauer

Die Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_F$ ) und die Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau$ ) sind zwei grundlegende Eigenschaften zur Charakterisierung fluoreszierender Moleküle. Die Fluoreszenzquantenausbeute beschreibt das Verhältnis von Fluoreszenzphotonen zu absorbierten Photonen und liegt somit zwischen 0 und 1 (respektive 0 und 100% Ausbeute)

$$\Phi_F = \frac{\text{Zahl der Fluoreszenzphotonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} \leq 1$$

Formel 1

Bezogen auf die Prozesse, die zu einer Relaxation des  $S_1$  Zustandes führen, lässt sich die Fluoreszenzquantenausbeute mit den jeweiligen, kinetischen Parametern ausdrücken.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nF}} \leq 1$$

Formel 2

Hier beschreibt  $k_F$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und  $k_{nF}$  die Summe der Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Relaxationsprozesse. Farbstoffe mit sehr hohen Quantenausbeuten besitzen dementsprechend wenige Mechanismen für strahlungslose Prozesse bzw. diese Prozesse laufen im Vergleich zur Fluoreszenz sehr langsam ab. Betrachtet man eine Fluorophorlösung ohne Berücksichtigung strahlungsloser Relaxation, so ergibt sich für die zeitabhängige Fluoreszenz  $F(t)$  in Abhängigkeit von  $k_F$  und der Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t=0$ ,  $F(0)$ , folgender Ausdruck:

$$F(t) = F(0) \cdot e^{-k_F \cdot t}$$

Formel 3

Die Zeit, nachdem die Fluoreszenz auf den Bruchteil von  $F(0)/e$  abgeklungen ist, wird als natürliche Lebensdauer  $\tau_n$  bezeichnet.

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die natürliche Lebensdauer ist experimentell nur schwer zu erfassen, da in den meisten Fällen die alternativen, strahlungslosen Prozesse nicht zu vernachlässigen sind. In diesem Fall ergibt sich für die zeitabhängige Fluoreszenz:

$$F(t) = F(0) \cdot e^{-\sum k_i t} \quad \text{Formel 4}$$

wobei hier  $\sum_i k_i = k_F + k_{nF}$  der Summe aller Geschwindigkeitskonstanten entspricht, die zu einem Übergang des Moleküls aus dem  $S_1$  Zustand führen. Analog zur natürlichen Lebenszeit entspricht der Kehrwert aus  $\sum_i k_i$  der sogenannten Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$ . Die Fluoreszenzlebensdauer ist somit kürzer als die natürliche Lebensdauer und mit dieser über die Quantenausbeute verknüpft.

$$\tau_n = \tau / \Phi_F = \frac{k_F + k_{nF}}{k_F \cdot (k_F + k_{nF})} = 1/k_F \quad \text{Formel 5}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer und die Fluoreszenzquantenausbeute sind von sowohl farbstoffspezifischen als auch umgebungsspezifischen Parametern abhängig. Diese sind für die gebräuchlichen Farbstoffe hinreichend bekannt. In heterogenen Gemischen können jedoch unterschiedliche Spezies von Farbstoffen vorliegen, die durch unterschiedliche, lokale Interaktionen des gleichen Farbstoffes mit seiner direkten Umgebung hervorgerufen werden. In diesem Fall ist eine einfache, exponentielle Beschreibung der zeitabhängigen Fluoreszenz nicht ausreichend und Formel 4 muss durch zusätzliche, exponentielle Anteile mit dem jeweiligen Amplitude  $A_i$  der zu der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_i$  gehörenden Speziesanteile  $x_i$  aller fluoreszierender Spezies im Gemisch modifiziert werden.

$$F(t) = \sum_i A_i(0) \cdot e^{-\left(\frac{t}{\tau_i}\right)} \quad \text{Formel 6}$$

$$A_i(0) = F(0) \cdot x_i \quad \text{Formel 7}$$

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.3 Fluoreszenzanisotropie

Fluoreszenzanisotropie basiert auf der bevorzugten Wechselwirkung von Fluorophoren mit Licht, dessen Polarisation parallel zum Übergangsdipolmoment der elektronischen Anregung ausgerichtet ist. Dies führt dazu, dass in einem Gemisch aus willkürlich ausgerichteten Molekülen (isotropes Gemisch) die Anregung bestimmter ausgerichteter Moleküle mit polarisiertem Licht wahrscheinlicher (anisotrop) ist (Photo Selektion). Die Emission des Fluoreszenzphotons erfolgt polarisiert in Abhängigkeit zum Übergangsdipolmoment der Emission. Der Winkel zwischen der Anregungspolarisation und der Emissionspolarisation wird durch die Fluoreszenzanisotropie beschrieben. Der Winkel  $\beta$  zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten definiert die fundamentale Anisotropie  $r_0$  einer Farbstofflösung.

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

Formel 8

Die fundamentale Anisotropie ist somit charakteristisch für einen bestimmten Winkel  $\beta$  und somit charakteristisch für jeden Fluorophor. Der Winkel  $\beta$  kann dabei zwischen 0 und  $\pi/4$  variieren, woraus eine fundamentale Anisotropie zwischen -0.2 und 0.4 resultiert. Die fundamentale Anisotropie lässt sich nur dann direkt bestimmen, wenn keine weiteren Prozesse zu einer Verlagerung des Übergangsdipolmomentes führen, wie zum Beispiel Molekülrotation. Diese Prozesse müssen demzufolge in einem ähnlichen Zeitintervall ablaufen, wie auch die Fluoreszenz selbst. Die Anisotropie  $r$  für frei in Lösung diffundierende Moleküle ist somit abhängig von der Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  und der Rotationskorrelationszeit  $\rho$ , was durch die Perrin Gleichung beschrieben wird (Weber 1952).

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}}$$

Formel 9

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die Rotationskorrelationszeit ist abhängig von der Molekülgröße (molekulares Volumen  $V$ ), der Viskosität des Lösungsmittels  $\eta$  und der Temperatur  $T$  multipliziert mit der Gaskonstante  $R$ . Für biologische Makromoleküle wie Proteine kann oft in guter Näherung von einem kugelförmigen Molekül ausgegangen werden.

$$\rho = \frac{\eta \cdot V}{R \cdot T}$$

Formel 10

Experimentell wird die Fluoreszenzanisotropie mittels Polarisatoren über die Fluoreszenzsignale  $F_{//}$  (parallel zur Anregung polarisierte Emission) und  $F_{\perp}$  (senkrecht zur Anregung polarisierte Emission) ermittelt, wobei systembedingt ein Korrekturfaktor  $g$  für von der Polarisation abhängige Detektionseffizienzen berücksichtigt werden muss.

$$r = \frac{gF_{//} - F_{\perp}}{gF_{//} + 2 \cdot F_{\perp}}$$

Formel 11

### 2.4 Förster Resonanz Energietransfer (FRET)

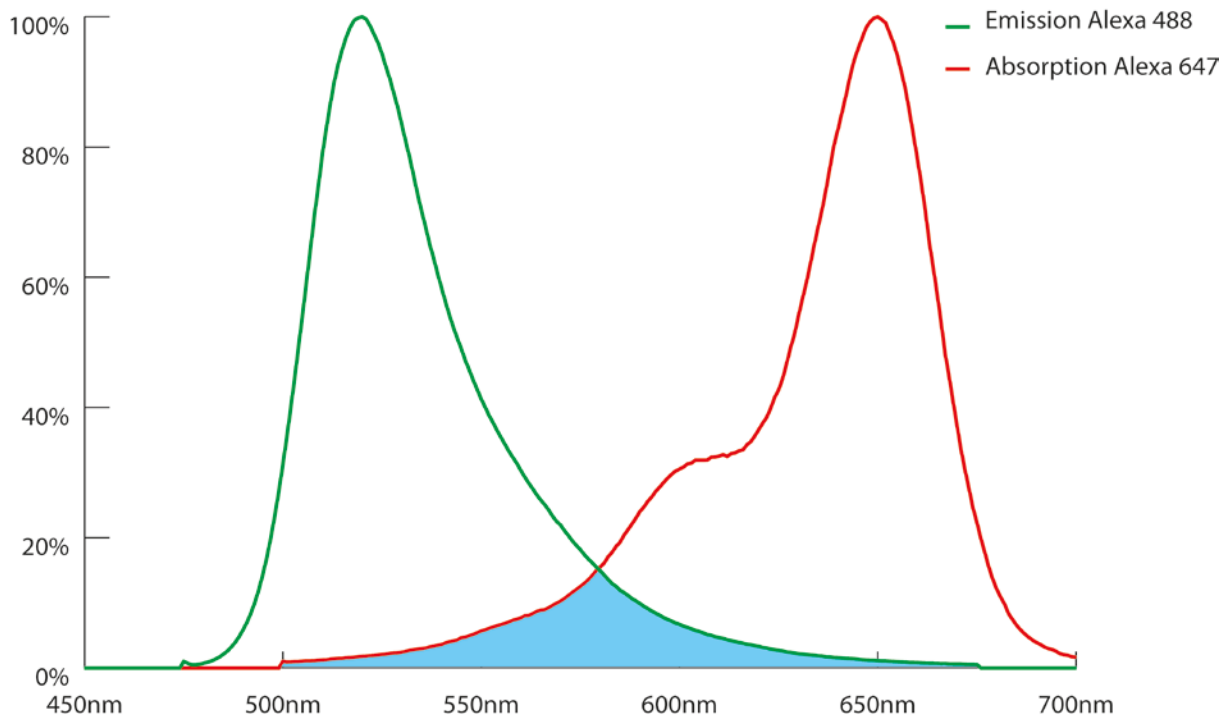
Der Förster Resonanz Energietransfer (FRET) beschreibt den strahlungslosen Energietransfer von einem angeregten Donor-Molekül (kurz Donor) auf ein Akzeptormolekül (kurz Akzeptor). Der Transfer erfolgt dabei über Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Emissionsdipolmoment des Donors und des Absorptionsdipolmoment des Akzeptors (Förster 1948). Die Transferrate  $k_{FRET}$  wird dabei definiert durch den Abstand zwischen Donor und Akzeptor  $R_{DA}$ , dem Orientierungsfaktor  $\kappa^2$ , sowie grundlegenden Parametern des Lösungsmittels und der Farbstoffe (Lakowicz 2006):

$$k_{FRET} = \frac{9000 \ln(10) \Phi_{FD(0)} \kappa^2 J}{128 \pi^5 N n^4 \tau_{D(0)} R_{DA}^6}$$

Formel 12

mit der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{FD(0)}$  und der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(0)}$  des Donors in Abwesenheit eines Akzeptors, dem Brechungsindex  $n$  des Lösungsmittels, der Avogadrozahl  $N$  und dem Überlappungsintegral  $J$ . Dieses beschreibt den spektralen Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Abbildung 4).

## 2 Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 4: Überlappungsintegral Alexa 488 und Alexa 647.** Zur Verdeutlichung des Überlappungsintegrals (dargestellt in blau) wurde sowohl das Emissionsspektrum als auch das Absorptionsspektrum auf ihr jeweiliges Maximum normiert. Aufgetragen ist die relative Intensität gegen die Lichtwellenlänge. Für den mathematisch korrekten Ausdruck siehe **Formel 13**. Spektrale Daten wurden dem Informationsangebot des Farbstoffherstellers (Invitrogen Molecular Probes) entnommen.

Das Überlappungsintegral berechnet sich mittels der flächennormierten Donoremission  $F_D(\lambda)$  und dem wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten des Akzeptors,  $\epsilon_A(\lambda)$ .

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

**Formel 13**

Der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  beschreibt die Position des Emissionsübergangsdipolmoment des Donors zum Absorptionsübergangsdipolmoment des Akzeptors. Er ist definiert durch die Winkel  $\theta_D$  und  $\theta_A$ , die die Winkel zwischen dem entsprechenden Dipolmoment und dem die beiden Farbstoffe verbindenden Abstandsvektor  $\vec{R}_{DA}$  beschreiben, sowie dem Winkel  $\phi$ , der die Ausrichtung der durch die Dipolmomente und den Abstandsvektor aufgespannten Ebenen zueinander beschreibt (Abbildung 5).

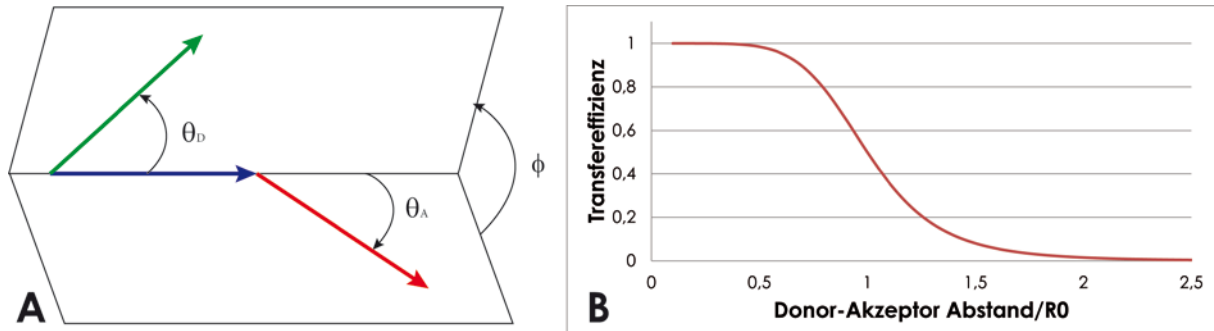
$$\kappa^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

**Formel 14**



## 2 Theoretischer Hintergrund

Für ausreichend schnell rotierende Farbstoffe kann ein Wert von  $2/3$  für  $\kappa^2$  genähert angenommen werden.



**Abbildung 5: Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  und Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz.** **A:** Veranschaulichte Darstellung der Winkelabhängigkeit der Dipol-Dipol Wechselwirkungen zwischen zwei Farbstoffen. Die Farbstoffe werden repräsentiert durch die jeweiligen Vektoren des Übergangsdipolmoment (grün: Donor, rot: Akzeptor). Der Abstandsvektor  $\vec{R}_{DA}$  ist in blau dargestellt. **B:** Abhängigkeit der Transfereffizienz vom Donor-Akzeptor Abstand in Einheiten von  $R_0$  nach Formel 15.

Die Transfereffizienz  $E_{FRET}$  für den Energietransfer kann analog zur Fluoreszenzquantenausbeute mit der Transferrate,  $k_{FRET}$ , berechnet werden

$$E_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{k_F + k_{nF} + k_{FRET}} = \frac{k_{FRET}}{\tau^{-1} + k_{FRET}} \leq 1$$

Formel 15

mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_F$  und  $k_{nF}$  für die Fluoreszenz und die strahlungslosen Relaxationsprozesse (Formel 2), sowie der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$ . Daraus ergibt sich eine Transfereffizienz von 0.5 für  $k_{FRET} = \tau^{-1}$  und nach einsetzen in Formel 12 ein Abstand  $R_{DA}$ , der charakteristisch für das verwendete Farbstoffpaar ist und nach Theodor Förster als Försterradius  $R_0$  bezeichnet wird. Für die Abhängigkeit der Transfereffizienz vom Abstand der beiden Farbstoffe unter Berücksichtigung des Försterradius erhält man

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{DA}^6} \leq 1$$

Formel 16

## 2 Theoretischer Hintergrund

Formel 16 zeigt, dass die Transfereffizienz in einem engen Bereich von Farbstoffabständen um den Försterradius stark variiert (Abbildung 5). Die Abbildung veranschaulicht, dass sich Abstandsänderungen in einem Bereich zwischen  $0.5 R_0$  und  $2 R_0$  messbar auf die Transfereffizienz auswirken.

Die Försterradien für die gängigen Farbstoffkombinationen liegen dabei zwischen  $10 \text{ \AA}$  und  $70 \text{ \AA}$  und entsprechen somit der Größenordnung von biologischen Makromolekülen. Darauf aufbauend wurden FRET-Messungen erfolgreich in dynamischen, biologischen Systemen verwendet (Clegg 1992; Wu et al. 1994; Wallrabe et al. 2005; Vogel et al. 2006).

Ausgehend von den Definitionen der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzquantenausbeute (2.2 Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer) ergeben sich für die Donorfluoreszenzlebensdauer und die Donorfluoreszenzquantenausbeute in Anwesenheit eines Akzeptors,  $\tau_{D(A)}$  und  $\Phi_{FD(A)}$ ,

$$\tau_{D(A)} = \frac{1}{k_F + k_{nF} + k_{FRET}} \quad \text{Formel 17}$$

$$\Phi_{FD(A)} = \frac{k_F}{k_F + k_{nF} + k_{FRET}} \leq 1 \quad \text{Formel 18}$$

Experimentell sind sowohl die Fluoreszenzlebensdauer, als auch die Fluoreszenzintensitäten bevorzugte Parameter zur Bestimmung der Transfereffizienz

$$E_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{k_F + k_{nF} + k_{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_{D(0)}} = 1 - \frac{F_{D(A)}}{F_{D(0)}} = \frac{F_A/\Phi_{FA}}{F_D/\Phi_{FD(0)} + F_A/\Phi_{FA}} \quad \text{Formel 19}$$

mit der Fluoreszenzlebenszeit des Donors ohne Akzeptor,  $\tau_{D(0)}$ , der Quantenausbeute des Donors ohne Akzeptor,  $\Phi_{FD(0)}$ , der Fluoreszenzintensitäten des Donors in Ab- und Anwesenheit des Akzeptors,  $F_{D(0)}$  und  $F_{D(A)}$ , den korrigierten Fluoreszenzintensitäten des Donors und Akzeptors,  $F_D$  und  $F_A$ , und der Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors,  $\Phi_{FA}$ .

## 2 Theoretischer Hintergrund

Aus Formel 18 wird ersichtlich, dass neben dem gemessenen Signal auch intrinsische Farbstoffgrößen eine entscheidende Rolle zur Berechnung der FRET-Effizienz spielen. Hinzu kommen noch gerätespezifische Größen wie z.B. Detektionseffizienzen und Hintergrundsignale. Oftmals sind diese Größen jedoch nicht zugänglich bzw. die Berechnung der exakten FRET-Effizienz ist für eine Analyse nicht notwendig. In diesem Fall wird auf die apparente Transfereffizienz zurückgegriffen ( $E_{App}$ ; alternativ „proximity factor“, PF).

$$E_{App} = \frac{S_A}{S_A + S_D} = \frac{S_A}{S_G}$$

Formel 20

Die apparente Transfereffizienz berechnet sich aus dem Quotienten aus dem hintergrundkorrigierten Akzeptorfluoreszenzsignal  $S_A$  und dem hintergrundkorrigierten Gesamtfluoreszenzsignal  $S_G$ , die sich wiederum aus der Summe des hintergrundkorrigierten Donorfluoreszenzsignales  $S_D$  und des hintergrundkorrigierten Akzeptorfluoreszenzsignales  $S_A$  ergibt. Die so gewonnene Transfereffizienz ist nur bedingt für eine Umrechnung in einen Abstand zwischen Donor und Akzeptor geeignet, genügt jedoch für eine Abschätzung. Dies gilt insbesondere für Messungen an immobilisierten Molekülen, da hierbei Auswirkungen der Immobilisierung auf intrinsische Farbstoffeigenschaften und die Beweglichkeit des Farbstoffes nicht auszuschließen sind.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.5 Auswahl der optimalen Farbstoffposition

Die Auswahl der Farbstoffposition erfolgte anhand folgender Überlegungen:

- Der Donorfärbstoff Alexa 488 sollte wenn möglich nur geringe Umgebungsänderungen erfahren, um durch eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften keine Artefaktmessungen zu erzeugen. Daher wurde eine Position in der Daumendomäne gesucht, in der sich zwischen den Konformationen nur geringe Änderungen ergeben (bezogen auf die Kristallstrukturen)
- Die Konformationsänderung sollte einen möglichst großen Hub erzeugen, um eine entsprechende Auflösung der Bewegung in Einzelmolekülexperimenten zur gewährleisten. Da die Bewegung vorrangig in der Fingerdomäne stattfindet, wurde für den Akzeptorfärbstoff eine Position in der Fingerdomäne gesucht.

Folgende Varianten wurden erstellt, wobei im weiteren Verlauf der Arbeit nur auf die verwendete Variante KF-D548C-G743C eingegangen wird.

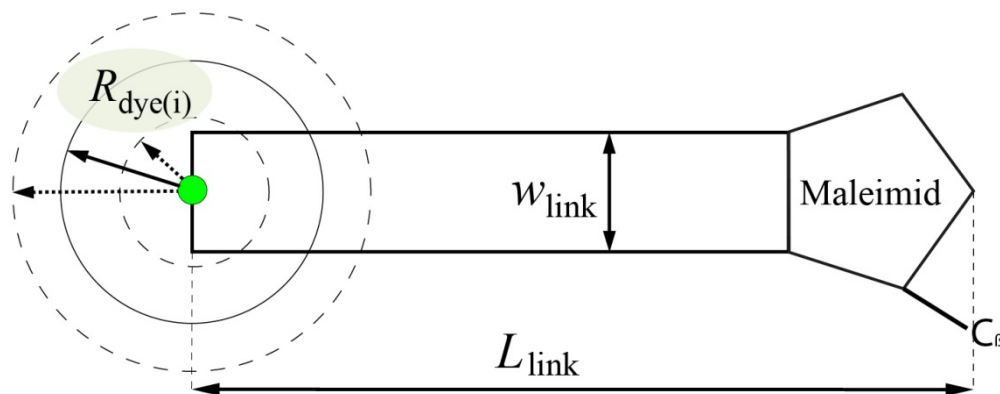
**Tabelle 1: Vorbereitete Varianten des Klenow-Fragmentes**

Fingerdomäne	Daumendomäne	Kloniert	Expression	Kommentar
<b>747</b>	<b>548</b>	ja	ja	Sehr geringer Signalhub im Experiment. Variante wurde verworfen
<b>747</b>	<b>891</b>	ja	ja	Sehr geringer Signalhub im Experiment. Variante wurde verworfen
<b>747</b>	<b>697</b>	ja	ja	Reservevariante, keine Experimente durchgeführt
<b>743</b>	<b>548</b>	ja	ja	Verwendete Variante
<b>743</b>	<b>697</b>	ja	ja	Reservevariante, keine Experimente durchgeführt
<b>743</b>	<b>891</b>	ja	ja	Reservevariante, keine Experimente durchgeführt
<b>744</b>	<b>550</b>	ja	nein	Reservevariante, keine Experimente durchgeführt

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.6 „Accessible Volume“ (AV) Simulationen

Um die Abstandsinformationen aus MFD-Messungen mit strukturbiologischen Informationen in Form von Kristallstrukturen vergleichen zu können, muss beachtet werden, dass in FRET-Experimenten nur der Abstand der verwendeten Farbstoffe zugänglich ist. Aufgrund der Anbindung der Farbstoffe über entsprechende Linkermoleküle ist dieser nicht direkt vergleichbar mit dem Abstand zwischen den Seitenketten der Aminosäuren, die als Ankerpunkte für die Farbstoffe dienen. In „Accessible Volume“-Simulationen (AV-Simulationen) wird der Farbstoff vereinfacht als harte Kugel mit einem flexiblen, zylindrischen Linker angenommen (Abbildung 6) (Sindbert et al. 2011). Die verwendeten Parameter sind dabei abhängig von der Struktur des verwendeten Farbstoffes. Für Alexa 488 wurde eine Länge des C5-Linkers von 20 Å, eine Breite von 4.5 Å und ein Farbstoffradius von 3.5 Å angenommen. Für Alexa 647 entsprechen die Parameter: Linkerlänge = 22 Å, Linkerbreite = 4.5 Å und Farbstoffradius = 3.5 Å. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode finden sich in der Literatur (Cai et al. 2007; Muschielok et al. 2008; Kalinin 2012).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ansatzes der AV-Simulation.** Die Linkerlänge,  $L_{\text{link}}$  (ausgehend vom  $C_{\beta}$  der gekoppelten Aminosäure), die Linkerbreite,  $w_{\text{link}}$ , und der Farbstoffradius  $R_{\text{dye}}$  sind entsprechend hervorgehoben und stellen Farbstoffspezifische Parameter dar. Für die Markierung der Klenowvarianten wurden ausschließlich thiolreaktive Maleimidfarbstoffe verwendet.

Das Ergebnis einer solchen Simulation ist eine wolkenähnliche Aufenthaltsverteilung der jeweiligen Farbstoffe. Um die aus der Simulation zugänglichen Farbstoffpositionen mit den Ergebnissen der unterschiedlichen fluoreszenzspektroskopischen Methoden vergleichen zu können, ist die Berechnung eines mittleren Abstands sinnvoll. Hierbei werden drei Methoden der Mittelung unterschieden.

## 2 Theoretischer Hintergrund

Neben dem Abstand der mittleren Farbstoffpositionen  $R_{mp}$

$$R_{mp} = \left| \left\langle \vec{R}_{D(i)} \right\rangle - \left\langle \vec{R}_{A(j)} \right\rangle \right| = \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \vec{R}_{D(i)} - \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \vec{R}_{A(j)} \right|$$

Formel 21

mit allen möglichen Positionen der Fluorophore,  $\vec{R}_{D(i)}$  und  $\vec{R}_{A(i)}$ , besteht noch die Mittelung aller Abstände zwischen den beiden Farbstoffen.

$$\langle R_{DA} \rangle = \left| \left\langle \vec{R}_{D(i)} - \vec{R}_{A(j)} \right\rangle \right| = \frac{1}{nm} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left| \vec{R}_{D(i)} - \vec{R}_{A(j)} \right|$$

Formel 22

Dieser Abstand ist direkt vergleichbar mit gemessenen Abständen aus eTCSPC-Experimenten. Für einen Vergleich mit MFD-Experimenten wird dagegen der fluoreszenzgemittelte Abstand benötigt.

$$\langle R_{DA} \rangle_E = R_0 \cdot (\langle E \rangle^{-1} - 1)^{1/6}$$

Formel 23

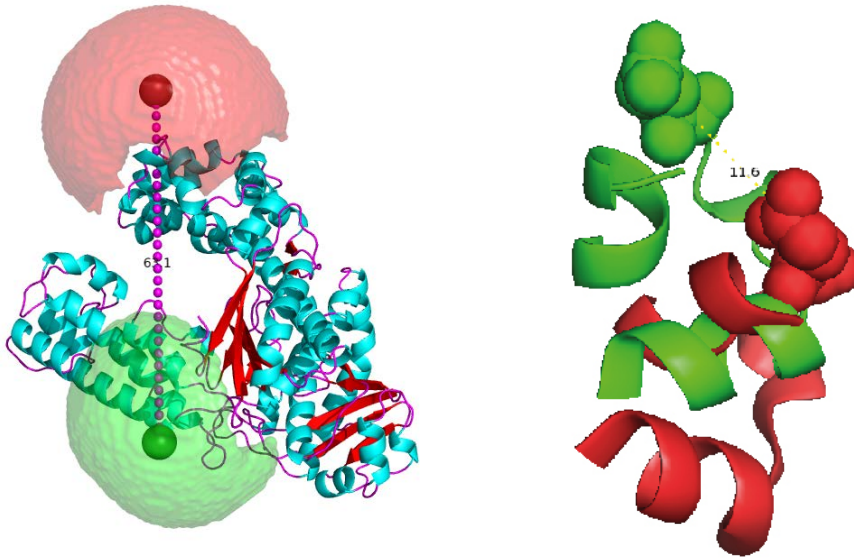
mit dem Försterradius  $R_0$  des verwendeten Farbstoffpaares und der mittleren Transfereffizienz  $\langle E \rangle$ , für die gilt:

$$\langle E \rangle = \frac{1}{nm} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left( \frac{1}{1 + \frac{|R_{A(j)} - R_{D(i)}|^6}{R_0^6}} \right)$$

Formel 24

## 2 Theoretischer Hintergrund

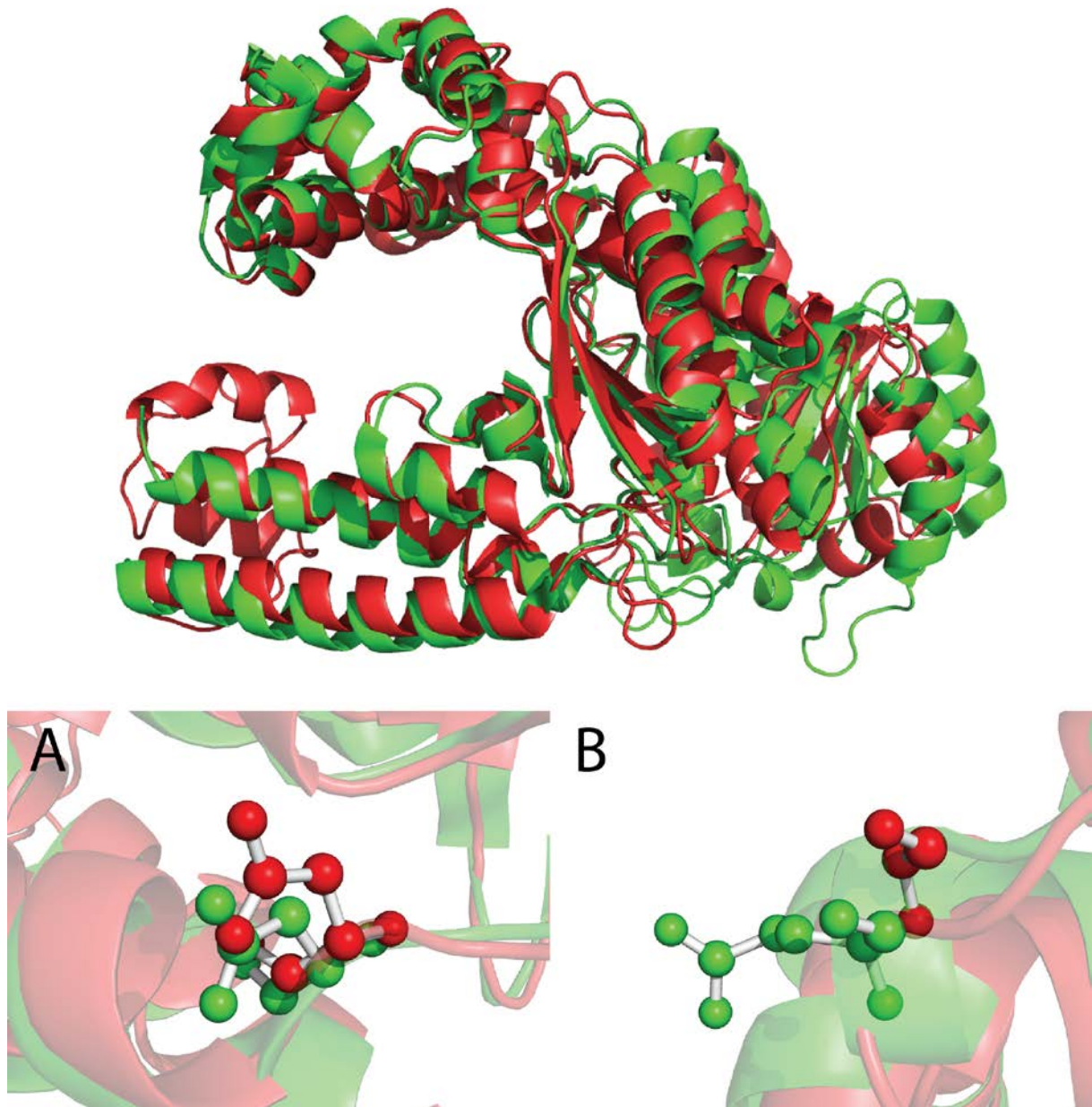
Abbildung 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis der AV-Simulation für die Kristallstruktur der DNA Polymerase I aus *Bacillus stearothermophilus* für das freie Enzym (PDB ID: 1XWL).



**Abbildung 7: Graphische Darstellung der Ergebnisse einer AV-Simulation für die Struktur der DNA Polymerase I aus *Bacillus stearothermophilus*.** Verwendet wurde die Kristallstruktur des substratfreien Enzyms (PDB ID: 1XWL). Die Ankerpositionen der Farbstoffe wurden entsprechend der verwendeten Positionen im Klenow-Fragment gewählt. Die verwendeten Farbstoffparameter sind im Text erläutert. Links: in grün ist die Simulation des Donorfarbstoffes an der Position 548 (Aminosäuresequenz) dargestellt. In rot die Simulationsergebnisse des Akzeptorfarbstoffes an Position 743 (Aminosäuresequenz). Durch eine gestrichelte Linie eingetragen ist der erwartete Abstand  $R_{mp}$  von 63,1 Å. Rechts: Positionsvergleich der Aminosäure, an dem der Akzeptorfarbstoff gebunden ist. In grün die offene Konformation, in rot die geschlossene Konformation. Der Abstand von 11,6 Å entspricht der simulierten Abstandsänderung.

Die Ergebnisse der AV-Simulation für die zu erwartenden Abstände sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Abstandsberechnungen beruhen dabei auf Kristallstrukturen der DNA Polymerase I aus *Bacillus stearothermophilus*, da für das Klenow-Fragment nicht alle strukturellen Zustände mittels Röntgenkristallographie charakterisiert sind. Die verwendeten Kopplungspositionen für die Farbstoffe wurden anhand eines Strukturvergleichs zwischen den Strukturen des freien Enzyms ausgewählt und weichen im Strukturvergleich um 0,9 Å (Donorposition Aminosäure 548) bzw. 1,9 Å (Akzeptorposition Aminosäure 743) voneinander ab (Abbildung 8). Die beiden Strukturen wurden überlagert und anhand der Überlagerung wurden die für die jeweilige Farbstoffposition im Klenow-Fragment homologen Aminosäuren in der Sequenz der Polymerase I aus *Bacillus stearothermophilus* ausgewählt (Tabelle 2).

## 2 Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 8: Strukturvergleich der homologen Enzyme.** Die Abbildung zeigt die beiden Strukturen für das Klenow-Fragment (rot) und das homologe Enzym aus *Bacillus stearothermophilus* (grün). Zu erkennen ist eine gute Übereinstimmung der Strukturen. Diese wird deutlich, wenn man die Donorpositionen (Teilabbildung A) und die Akzeptorpositionen (Teilabbildung B) betrachtet. Der Strukturvergleich wurde mit dem Programm pymol und dem Befehl „super“ durchgeführt.

**Tabelle 2: Korrespondierende Farbstoffpositionen Klenow-Fragment und *Bacillus stearothermophilus***

<b>Position Klenow-Fragment (PDB ID: 1kfd)</b>	<b>Position <i>Bacillus stearothermophilus</i>(PDB ID: 1xwl)</b>
D548C (Donor)	D496C
G743C (Akzeptor)	Q691C



## 2 Theoretischer Hintergrund

**Tabelle 3: Ergebnisse der zu erwartenden Abstände nach AV-Simulation.** Neben den drei unterschiedlich gemittelten Abständen ist zusätzlich die erwartete Transfereffizienz (E) für die verwendeten Farbstoffe angegeben.

Struktur (PDB ID)	Konformation	$R_{mp}/\text{Å}$	$\langle R_{DA} \rangle / \text{Å}$	$\langle R_{DA} \rangle_E / \text{Å}$	E
1XWL	„open“	63.1	65.4	62.6	0.247
1L3U	“open”+DNA	65.2	67.5	64.8	0.211
3HP6	“ajar”	63	65.2	62.3	0.252
2HVI	„closed“	53.4	55.6	54.4	0.433

### 2.7 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Bei der FCS handelt es sich um eine Rauschanalyse eines zeitabhängig gemessenen Fluoreszenzsignales (Fluoreszenzfluktuationen). Die FCS ist folglich eine Methode zur Untersuchung von Moleküleigenschaften, die zu Hell- und Dunkelzuständen führen. Dazu gehört unter anderem die Beweglichkeit des Moleküls. Mit der FCS können zudem Diffusionszeiten und Diffusionskoeffizienten gemessen werden und damit auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen, die deren Beweglichkeit beeinflussen (Magde et al. 1972; Ehrenberg et al. 1974). Die Entwicklung von konfokalen Fluoreszenzmikroskopen, die kleine Anregungs- und Detektionsvolumen in der Größenordnung von 1-10 fl sowie ein hohes Signal-zu-Hintergrundverhältnis besitzen, bildet die Grundlage für diese Art der Spektroskopie, da im Idealfall die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls detektiert wird.

Beobachtet man das Rauschen eines einzelnen Fluoreszenzsignales, so spricht man von Fluoreszenzautokorrelation, die durch Formel 25 formal beschrieben wird. Die Korrelationsfunktion  $G^2(t_c)$  berechnet sich aus dem mittleren Produkt der Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$ , mit der Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t + t_c$ ,  $\langle F(t) \cdot F(t + t_c) \rangle$  und dem Quadrat der mittleren Fluoreszenz  $\langle F(t) \rangle^2$

$$G^2(t_c) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + t_c) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

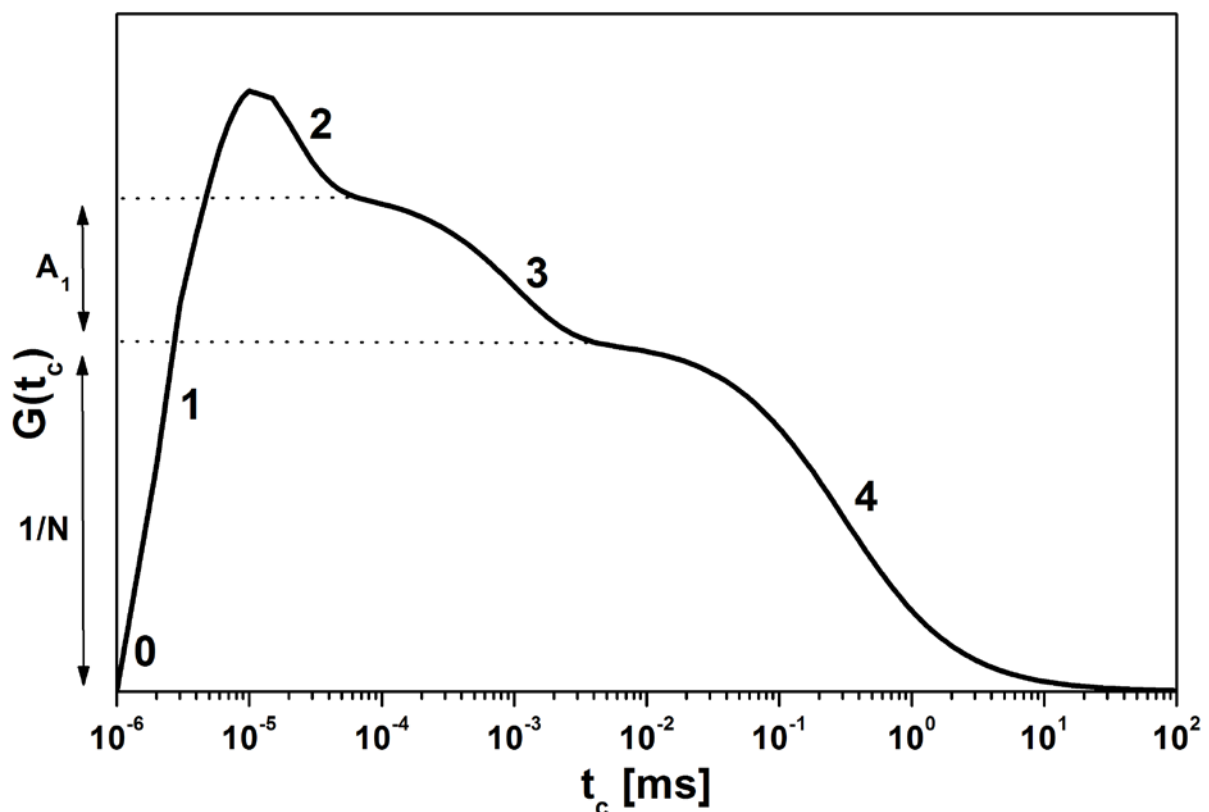
Formel 25

## 2 Theoretischer Hintergrund

Beobachtet man dagegen die zeitliche Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen zueinander, spricht man von Fluoreszenzkreuzkorrelation, deren Korrelationsfunktion sich aus dem mittleren Produkt des einen Fluoreszenzsignals zum Zeitpunkt  $t$  mit dem anderen Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt  $t + t_c$ ,  $\langle F_1(t) \cdot F_2(t + t_c) \rangle$ , und dem Produkt der gemittelten Fluoreszenzsignale,  $\langle F_1(t) \rangle \cdot \langle F_2(t) \rangle$  berechnet (Formel 26).

$$G^2(t_c) = \frac{\langle F_1(t) \cdot F_2(t + t_c) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \cdot \langle F_2(t) \rangle}$$

Formel 26



**Abbildung 9: Simulierter Verlauf der Fluoreszenzautokorrelationsfunktion.** Emission eines Photons [0], Antibunching [1], Rotationsdiffusion [2], Triplettkinetik [3] oder Isomerisierungsreaktion und translative Diffusion [4] (Berger 2001).  $1/N$  bezeichnet hierbei die Zahl der simultan im Mittel detektierten Moleküle,  $A_1$  zeigt die Amplitude der Triplettkinetik.

Abbildung 9 zeigt die simulierte Fluoreszenzautokorrelationsfunktion einer konfokal detektierten Fluorophor Lösung. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wird vom Fluorophor ein Photon emittiert [0]. Die Wahrscheinlichkeit der Detektion eines zweiten Photons steigt für kurze Korrelationszeiten im Nanosekundenbereich rasch an, was als „antibunching“ bezeichnet wird (1). Jeder Prozess, der zu einem Abklingen des Fluoreszenzsignals führt, wird durch ein Abfallen der Funktionsamplitude sichtbar, was als „bunching“ [22]

## 2 Theoretischer Hintergrund

bezeichnet wird (2, 3, 4). Bei logarithmischer X-Achsenkalierung (Zeitachse) können durch die Amplitude (proportional zum Kehrwert der Molekülnzahl im Anregungsvolumen) und die Wendepunkte der Korrelationskurve die charakteristischen kinetischen Parameter des jeweiligen Prozesses bestimmt werden, sofern die unterschiedlichen Prozesse zeitlich ausreichend getrennt sind.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.7.1 Gefilterte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und SCCF (“Species Cross Correlation Function“)

Gefilterte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Böhmer et al. 2002; Felekyan et al. 2012) unterscheidet sich prinzipiell von standard FCS (Elsom et al. 1974) und FRET-FCS (Felekyan et al. 2013) durch die Zuordnung von Fluoreszenzsignal zu vorher definierten Zuständen und die entsprechende Korrelation zwischen den Zuständen anstelle von einer Korrelation der reinen Zählraten. Die Korrelation wird dabei durch die Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion (SCCF) beschrieben.

$$G^{(i,m)}(t_c) = \frac{\langle F^{(i)}(t) \cdot F^{(m)}(t+t_c) \rangle}{\langle F^{(i)}(t) \rangle \cdot \langle F^{(m)}(t+t_c) \rangle} = \frac{\left\langle \left( \sum_{j=1}^{d \cdot L} w_j^{(i)} \cdot S_j(t) \right) \cdot \left( \sum_{j=1}^{d \cdot L} w_j^{(m)} \cdot S_j(t+t_c) \right) \right\rangle}{\left\langle \sum_{j=1}^{d \cdot L} w_j^{(i)} \cdot S_j(t) \right\rangle \cdot \left\langle \sum_{j=1}^{d \cdot L} w_j^{(m)} \cdot S_j(t+t_c) \right\rangle}$$

Formel 27

Mit den beiden Spezies ( $i$ ) und ( $m$ ) einer definierten Mischung, dem Signal  $S$ , der Zeit  $t$  und entsprechenden Korrelationszeit  $t_c$ . Die Zuordnung des Signals zu den entsprechenden Zuständen wird durch geeignete Filterfunktionen  $w$  erreicht.  $L$  und  $d$  beschreiben den Detektionskanal ( $L$ ) bzw. indizieren das Signal eines bestimmten Detektors  $d$ . Als Modellfunktion zur Anpassung der experimentellen Ergebnisse wurde folgende Formel verwendet

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot G_{diff}(t_c) \cdot [1 - G_K(t_c)]$$

Formel 28

Mit  $G_K(t_c)$ :

$$G_K(t_c) = \sum_{t_{Ri}}^{t_{Rn}} A_{Ki} \exp(-t_c / t_{Ri})$$

Formel 29

Mit der Amplitude  $A_{Kt}$  und der Relaxationszeit  $t_{Rt}$  der beteiligten Prozesse.

## 3 Material und Methoden

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräteliste

Tabelle 4: Liste der verwendeten Laborgeräte

Geräte-Typ	Geräte-Name	Hersteller
Autoklav	Systemec VE-150	Systemec
Elektrophorese (SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN II	Biorad
Fluoreszenzspektrometer	FluoroMax®-4	Horiba Scientific
FPLC-System	ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare
Gel/Fluoreszenz-Imager	Stella 3200	Raytest
Gel-Imager UV	Doc-Print II	Vilber Lourmat
Inkubationsschüttler	Minitron	Infors HT
Kammerdeckgläser	Nunc Lab-Tek II Chambered Coverglass, 8-Kammern (155409),	Thermo Scientific
Küvetten	105.250-QS	Hellma
Magnetrührer mit Heizplatte	VMS-A	VWR
PCR-Thermocycler	Primus 96 advanced	peqlab
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Schüttler	Orbitalschüttler 4010	Köttermann
Sonifikator	Sonopuls HD 2200, MS 72	Bandelin
Spektrometer (Zelldichte)	Photometer CO8000 Cell Density Meter	WPA Biowave
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Plasma Cleaner	Femto	Electronic Diener
UV/Vis-Spektrometer	Cary 4000 Bio Spectrophotometer	Varian Inc.
Zentrifuge	Sorvall EvolutionRC	Thermo Scientific
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus

### 3 Material und Methoden

#### 3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. Für weitere Informationen bezüglich ausgewählter Chemikalien siehe Anhang E.**

<b>Name</b>	<b>Hersteller, Artikelnummer</b>	<b>ggf.</b>
10x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer	Biorad	
30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1	Biorad, 161-0154	
50x TAE-Puffer	Merck, 106174	
Agar	Becton, Dickinson & Company	
Agarose	Roth, 3810	
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	Sigma-Aldrich, 238813	
D-(+) Glucose	Sigma-Aldrich, G8270	
Dichlormethan	VWR, 23354.292	
Katalase	Sigma-Aldrich, C40	
Glukose Oxidase	Sigma-Aldrich, G7141	
NHS-PEG-OMe	Iris biotech, PEG2300	
NHS-PEG-Biotin	Iris Biotech, PEG1057	
Neutraavidin	Invitrogen, A-2666	
Triethylamin	Fluka, 17924	
Aktivkohle	Merck	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck	
Bis-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Bis-Tris)	Roth, 6999.2	
dNTP-Mix	Fermentas	
dNTPs (ATP, GTP, TTP, CTP), 100 mM	Sigma-Aldrich, DNTP100	
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas	
Glycerin	Roth	
Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Company	
HiFi DNA Polymerase	NEB	
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen	
Hydroxy(tetramethylchroman)carbonsäure (Trolox)	Sigma-Aldrich	
Imidazol	Appli Chem	
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, CN08	

### 3 Material und Methoden

---

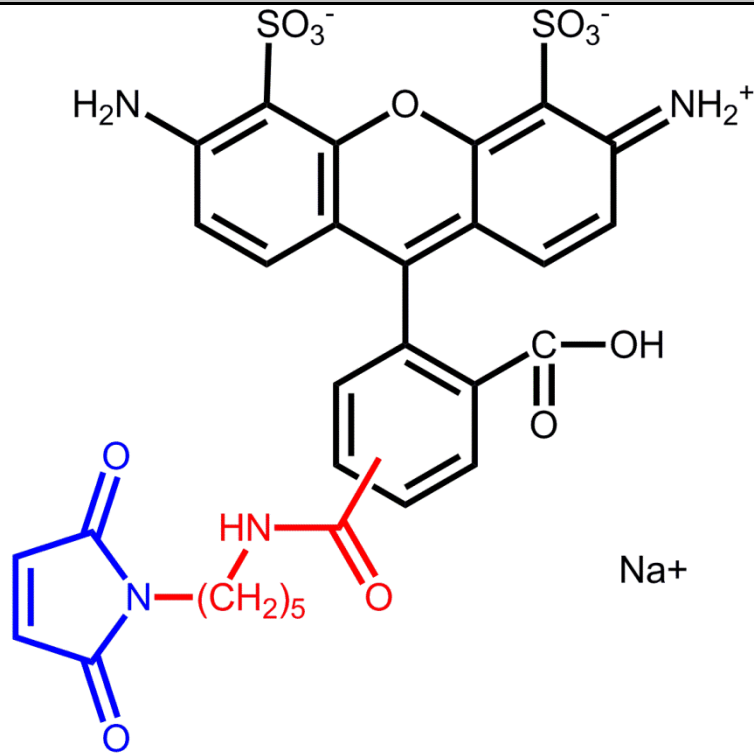
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, T9281
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumhydroxid (NaOH, Pellets)	J.T.Baker
NucleoSpin Tissue	Macherey Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Salzsäure 37%-ige (HCl)	VWR
SimplyBlue™ SafeStain	Invitrogen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	VWR, 71003-494
Trypton	Becton, Dickinson & Company
Zentrifugal-Filter (Centricon, Amicon Ultra)	Millipore
$\beta$ -Mercaptoethanol (BME)	Roth

---

### 3.3 Cysteinreaktive Fluoreszenzfarbstoffe

**Donorfarbstoff: Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub> Maleimid**

Anregungsmaximum [nm]	494
Emissionsmaximum [nm]	519
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum $\epsilon$ [cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	73000
Fluoreszenzquantenausbeute $\phi$	0.92
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	4.1
Korrekturfaktor (cf) für $\lambda = 280$ nm	0.11
Nettoladung	-1
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C5/A10
Invitrogen-Bestellnummer	A-10254



**Abbildung 10: Molekülstruktur und spektroskopische Parameter für Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub> Maleimid.** Die Angaben wurden dem Informationsmaterial des Herstellers entnommen.



### 3 Material und Methoden

#### Akzeptorfarbstoff: Alexa Fluor® 647 C<sub>2</sub> Maleimid

Anregungsmaximum [nm]	651
Emissionsmaximum [nm]	672
Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum $\epsilon$ [cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	250000
Fluoreszenzquantenausbeute $\phi$	0.33
Fluoreszenzlebensdauer [ns]	1
Korrekturfaktor (cf) für $\lambda = 280$ nm	0.03
Nettoladung	-3
Linkerlänge (Anzahl der C-Atome/Atomanzahl gesamt)	C2/A12
Invitrogen-Bestellnummer	A-20347

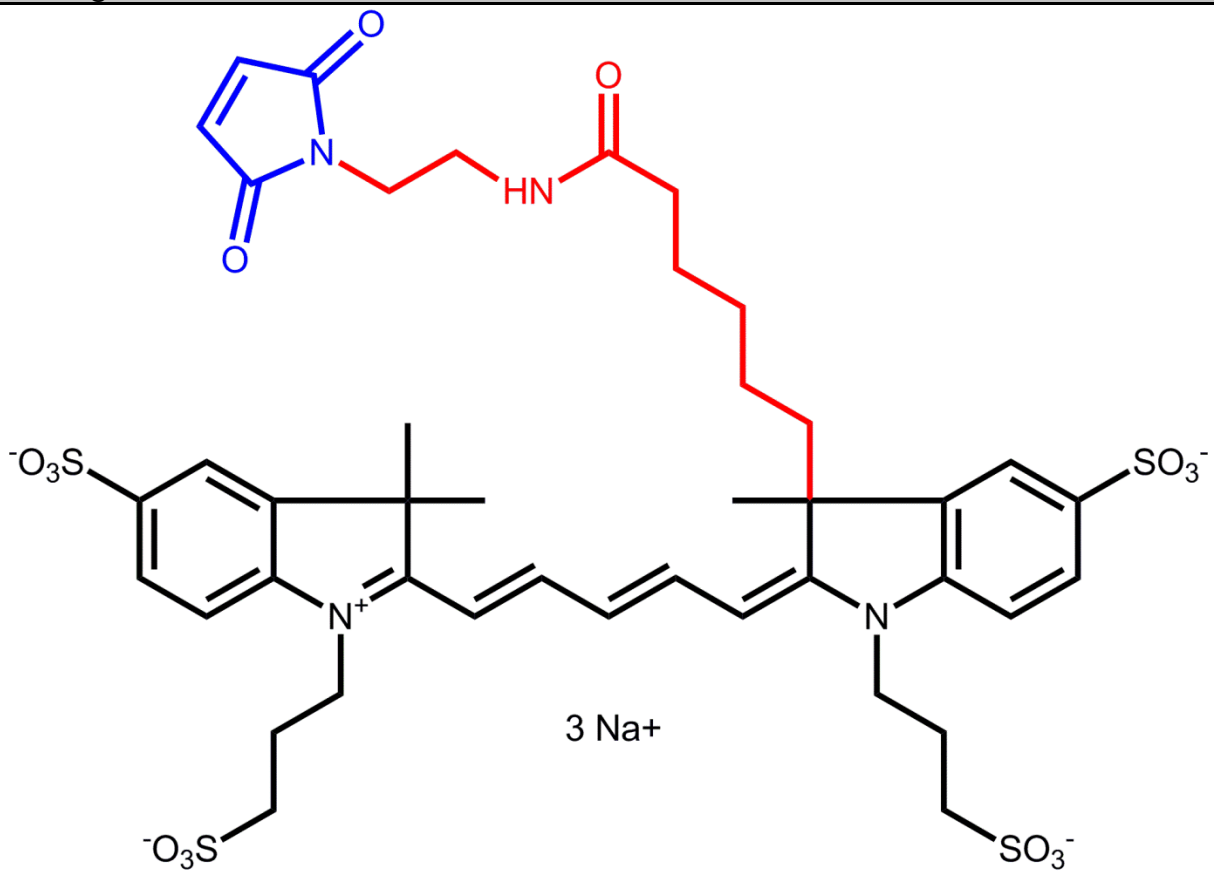


Abbildung 11: Molekülstruktur und spektroskopische Parameter für Alexa Fluor® 647 C<sub>2</sub> Maleimid. Die Angaben wurden dem Informationsmaterial des Herstellers entnommen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.4 DNA-Oligomere

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligonukleotide.** Aufgelistet sind die zur Klonierung und Mutagenese verwendeten DNA-Primer als auch für Experimente mit DNA-Polymerase verwendete Substrate. Endonukleaseschnittstellen sind grün hervorgehoben, Mutagenesepositionen gelb.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Funktion
<b>Klenow forward BamHI</b>	CAC <b>GGATCC</b> ACGGCAACGGTGATTCT TATGAC	Klonierung
<b>Klenow reverse PstI</b>	CCC <b>CTGCAG</b> GTTAGTGCGCCTGATCC CAGTTT	Klonierung
<b>G743C mut for</b>	ACGGCGGCAGAAG <b>TGT</b> TTTGTTGCCA CTGGAAACCGTC	Mutagenese/ Markierung
<b>G743 mut rev</b>	GACGGTTCCAGTGGCAA <b>ACAAAACA</b> CTTCTGCCGCCGT	Mutagenese/ Markierung
<b>D548C mut for</b>	GGTGTGAAGATC <b>TGT</b> CCGAAAGTG	Mutagenese/ Markierung
<b>D548C mut rev</b>	CAC TTCGG <b>ACA</b> GATG TTCACACC	Mutagenese/ Markierung
<b>Y766S mut for</b>	ATCAACTTTGGTCTGATT <b>TCT</b> GGCATGAG TGCTTTCGGT	Mutagenese/ Funktion
<b>Y766S mut rev</b>	ACCGAAAGCACTCATGCC <b>AGA</b> AATCA GACCAAAGTTGAT	Mutagenese/ Funktion
<b>Y766F mut for</b>	ATCAACTTTGGTCTGATT <b>TTT</b> GGCATGAGT GCTTTCGGT	Mutagenese/ Funktion
<b>Y766F mut rev</b>	ACCGAAAGCACTCATGCC <b>AAA</b> AATCA GACCAAAGTTGAT	Mutagenese/ Funktion
<b>primerKF_ddC</b>	GTCGCAGCCTACCGT(2',3'-ddC)	DNA-Substrat
<b>templateKF</b>	TGGTAAATCTCTCTAGACGGTAGGCTGC GAC	DNA-Substrat

### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die fehlerfreie und sichere Vervielfältigung des Erbgutes ist eine Voraussetzung für das Überleben eines Organismus. Um eine fehlerfreie Vervielfältigung zu gewährleisten, müssen die für die Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Replikation verantwortlichen DNA-Polymerasen das gemäß der Watson-Crick-Basenpaarung passende 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dNTP) zu einem komplementären DNA-Strang auswählen und schließlich mit dem schon replizierten Teilstück verbinden. Die Fehlerquote liegt dabei bei  $10^{-6}$  Fehlern pro Basenpaar (Echols et al. 1991). Dieses hohe Maß an Genauigkeit wird dabei durch mehrere Mechanismen gewährleistet. Eine erste Selektion erfolgt während der Polymeraseaktivität durch die korrekte Auswahl des passenden Nukleotids durch die Polymerase selbst. Im Falle einer fehlerhaften Insertion kann das Nukleotid unmittelbar nach der Insertionsreaktion durch 3'-5' Exonukleasen wieder entfernt werden. Wird die Fehlpaarung nicht sofort entfernt, existieren weitere Reparaturmechanismen, die die fehlerhaft gepaarte Base entfernen und ersetzen. Den größten Anteil dieser drei grundlegenden Mechanismen an der fehlerfreien Replikation von DNA hat dabei die Auswahl des passenden Nukleotids in der Polymerase selbst. Diese Selektion des korrekten dNTPs kann dabei nicht allein über die Basenpaarung nach dem Modell von Watson und Crick erfolgen, sondern muss durch weitere Mechanismen gewährleistet sein, da die Unterscheidung von korrekter und inkorrekt gepaarter Basenpaarung über die Energie der Wasserstoffbrückenbindungen alleine nur eine Fehlerquote von  $10^{-2}$  Fehlern pro Basenpaar ermöglicht (Watson et al. 1953; Watson et al. 1953; Loeb et al. 1982). Weitere Ansätze zu einer Erklärung der hohen Replikationsgenauigkeit beziehen daher mögliche Wechselwirkungen des Basenpaares mit der Enzymoberfläche im aktiven Zentrum der Polymerase mit ein (Sloane et al. 1988). Ausgehend von Sequenzanalysen der Aminosäuresequenzen und der Auswertung vorhandener Kristallstrukturen wurden die unterschiedlichen Polymerasen in sieben verschiedene Proteinfamilien eingeteilt (Braithwaite et al. 1993; Joyce et al. 1994), die nachfolgend kurz vorgestellt werden (siehe 4.1 Die Klassifizierung der DNA-Polymerasen). Detailliertere Beschreibungen der Polymerasefamilien und entsprechende Vergleiche finden sich in der Literatur (Rothwell et al. 2005).

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.1 Die Klassifizierung der DNA-Polymerasen

#### 4.1.1 Familie A Polymerasen

Polymerasen der Familie A beinhalten mit der bakteriellen DNA Polymerase I zentrale Enzyme zur DNA-Reparatur und -Prozessierung. Wichtigste Funktion in diesem Zusammenhang ist das Entfernen von Okazaki-Fragmenten und das Auffüllen der so entstandenen Lücken. Die Polymerasen zeigen daher neben der Polymerasefunktion auch 5'-3'-Exonukleaseaktivität, sowie eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur direkten Korrektur von Basenfehlpaarungen. Virale Polymerasen aus Bakteriophagen (T3, T5, T7) zählen ebenfalls zur Familie A.

#### 4.1.2 Familie B Polymerasen

Die Vervielfältigung der DNA während der Zellteilung in Eukaryonten wird maßgeblich durch Familie B Polymerasen katalysiert (eukaryontische Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Zur direkten Korrektur von Basenfehlpaarungen enthalten auch Familie B Polymerasen eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die im Vergleich zu Familie A Polymerasen jedoch deutlich stärker ausgeprägt ist.

#### 4.1.3 Familie C Polymerasen

Die Replikation von bakterieller, chromosomaler DNA erfolgt hauptsächlich durch Familie C Polymerasen in Form von Proteinkomplexen mit >10 Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit beinhaltet dabei die Polymeraseaktivität.

#### 4.1.4 Familie D Polymerasen

Polymerasen der Familie D finden sich in Archaea und sind heterodimere Enzyme. Es sind nur wenige Details bekannt, wobei man von einer zentralen Rolle in der DNA-Replikation ausgeht (Uemori et al. 1997).

#### 4.1.5 Familie X Polymerasen

Chemische Veränderungen an der DNA wie Desaminierung, Oxidation und Alkylierung werden durch die Basenexzisionsreparatur („base excision repair“, BER) behoben. Familie X Polymerasen spielen eine zentrale Rolle in der BER von einzelnen Basen und katalysieren in der Regel nur den Austausch einer einzelnen Base. Zu diesem Zweck besitzen Familie X Polymerasen, wie die eukaryontische Polymerase  $\beta$ , eine 5'-Deoxyribosephosphatlyaseaktivität.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.1.6 Familie Y Polymerasen

Neben der Familie X wurde Anfang des Jahrtausends mit der Familie Y eine weitere Polymerasekategorie eingeführt, die für die Reparatur von beschädigter DNA verantwortlich ist. Die Polymerasen IV und V aus *E. coli* wurden dieser Familie zugeordnet und beheben Schäden an der DNA, die durch Mutagene und Strahlung (z.B. UV-Crosslinking) hervorgerufen werden. Sie zeigen eine geringe Replikationsgenauigkeit auf unbeschädigter DNA und besitzen keine 3'-5'-Exonukleasefunktion.

### 4.1.7 Reverse Transkriptasen (Familie RT)

Neben viralen Reversetranskriptasen (RTs) beinhaltet die Familie RT die eukaryontischen Telomerasen. Alle Vertreter dieser Familie synthetisieren DNA auf der Basis von einzelsträngiger RNA. Bei retroviralen RTs erfolgt die Spaltung der RNA während der Katalyse durch eine RNaseH Domäne. Telomerasen enthalten integrierte RNA, die als Matrize während der Synthese der Telomere fungiert.

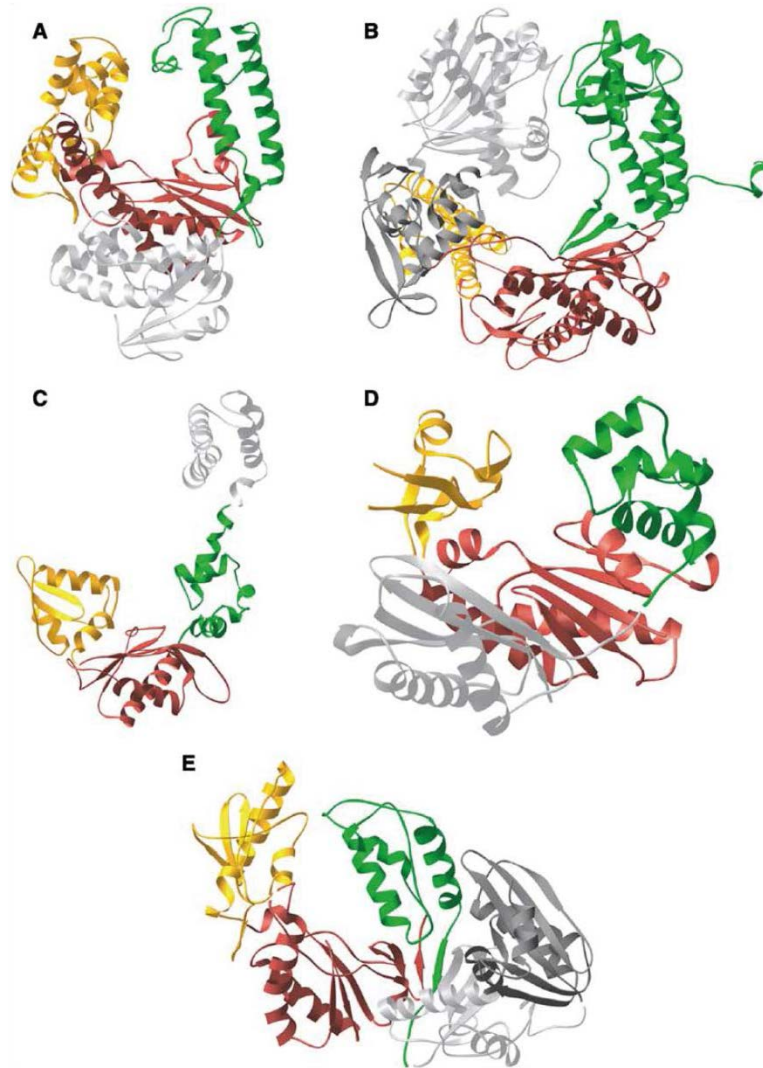
## 4.2 Struktur-Funktionsbeziehungen im Polymerasezyklus

### 4.2.1 Grundlegende Struktur von DNA Polymerasen

Die erste Beschreibung der DNA-Polymeraseaktivität erfolgte 1956 (Bessman et al. 1956). Das gefundene Enzym wurde als DNA Polymerase I bezeichnet bzw. entsprechend dem Ursprungsorganismus als *E. coli* DNA Polymerase I (*E. coli* Pol I). Weitere Studien zeigten, neben der Polymerasefunktion, 5'-3'-Exonukleaseaktivität sowie eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. 1970 wurde gezeigt, dass sich das Enzym enzymatisch in zwei Fragmente spalten lässt, ohne die Funktion der einzelnen Fragmente zu beeinträchtigen (Klenow et al. 1970). Die Polymerasefunktion sowie die 3'-5'-Exonukleasefunktion befinden sich C-terminal auf dem sogenannten Klenow-Fragment, während die 5'-3'-Exonukleasefunktion auf dem N-terminalen Fragment liegt. Das Klenow-Fragment konnte als erste Polymerase 1985 kristallisiert und die Struktur aufgeklärt werden (Ollis et al. 1985). Es folgten weitere Röntgenkristallstrukturen, die das Klenow-Fragment im Komplex mit unterschiedlichen Substraten zeigt (Freemont et al. 1988; Beese et al. 1993; Beese et al. 1993). Die Struktur wird analog zur menschlichen rechten Hand in drei Domänen unterteilt, die als „Finger“, „Daumen“ und „Handfläche“ bezeichnet werden. Die Handfläche beinhaltet die für die Polymeraseaktivität erforderlichen katalytischen Seitenketten. Die Finger und der Daumen sind jeweils verantwortlich für die Substratbindung.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Während die Daumendomäne die DNA nach erfolgter Bindung umschließt, bindet das Nukleotid in der Fingerdomäne, wobei die Bindung über das Triphosphat des Nukleotids erfolgt. Die Nomenklatur der unterschiedlichen Domänen wurde auf die weiteren Polymerasefamilien übertragen. Abbildung 12 zeigt eine Übersicht über die unterschiedlichen Strukturen der verschiedenen Polymerasefamilien.

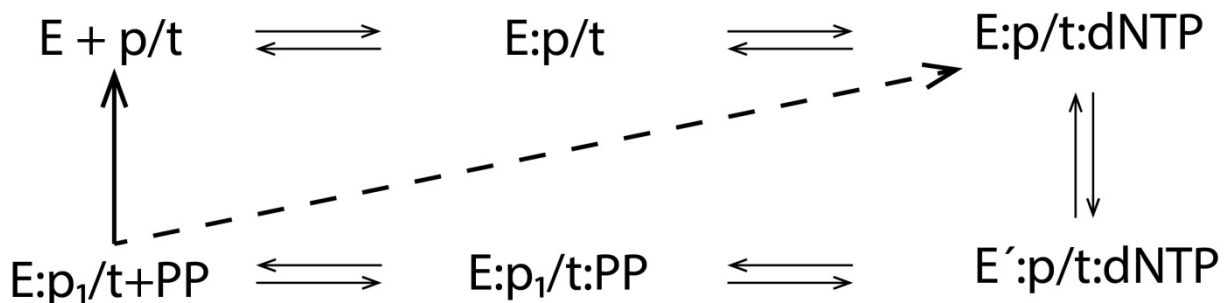


**Abbildung 12: Röntgenkristallstrukturen verschiedener DNA Polymerasen.** Die Domänen sind farblich hervorgehoben (Finger, gelb; Daumen, grün; Handfläche, rot, weitere, nicht direkt mit der Polymeraseaktivität verbundene Domänen sind in Grautönen dargestellt). **A:** Polymerase I aus *T. aquaticus* (Familie A). **B:** RB69 Polymerase (Familie B). **C:** Eukaryontische Polymerase  $\beta$  (Familie X). **D:** Dpo4 DNA Polymerase (Familie Y). **E:** p66 Untereinheit der Reverse Transkriptase (HIV). Die Abbildung wurde entnommen aus (Rothwell et al. 2005).

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.2.2 Der Polymerasezyklus („nucleotide insertion pathway“)

Die Zuordnung zu sieben verschiedenen Polymerasefamilien zeigt die Vielfalt innerhalb dieser Enzyme, sowohl was die spezifische Funktion betrifft, als auch bezüglich der Struktur. Parallel zum Strukturmodell einer rechten Hand, welches sich auf den Großteil der Polymerasen anwenden lässt, haben kinetische Analysen unterschiedlicher Polymerasen zu einem einheitlichen Modell der Polymerasefunktion geführt (Kuchta et al. 1987; Kuchta et al. 1988; Patel et al. 1991; Kati et al. 1992; Rothwell et al. 2005). Das Modell geht von einem geordneten Kreisprozess aus (Abbildung 13).

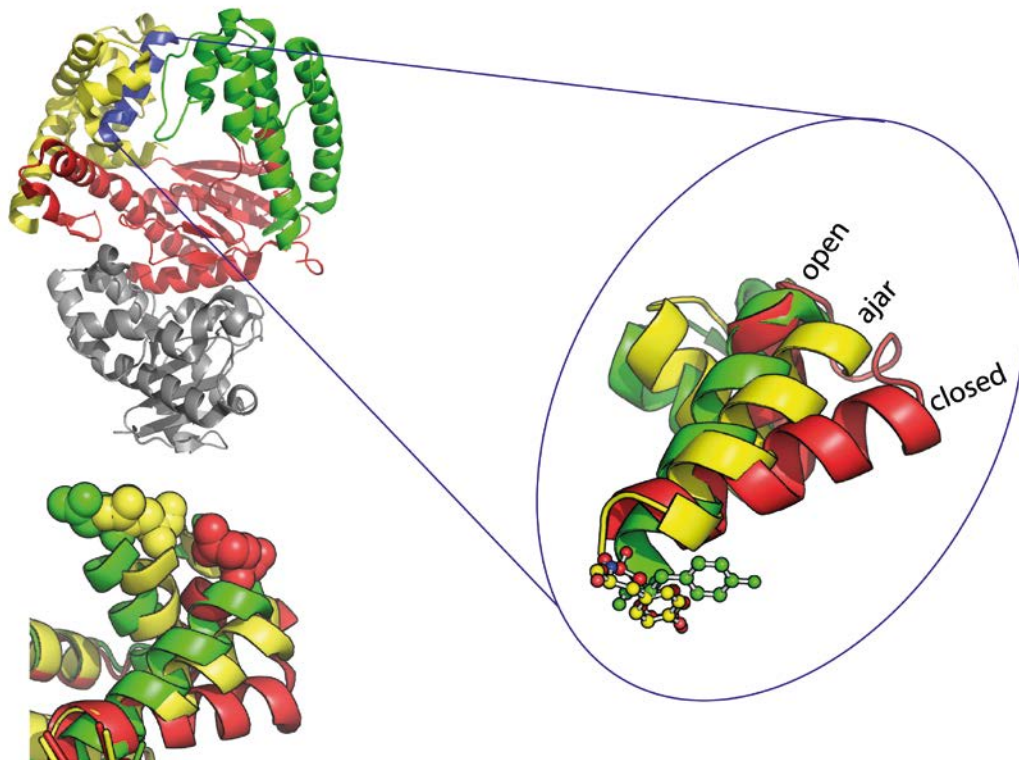


**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Polymerasezyklus ("nucleotide insertion pathway").** E: Enzym; p/t: DNA Substrat („primer“ und „template“); E:p/t: binärer Komplex; E:p/t:dNTP: ternärer Komplex nach Nukleotidbindung zum binären Komplex; E':p/t:dNTP: aktivierter, ternärer Komplex; E:p<sub>1</sub>/t:PP: Verlängertes DNA Konstrukt mit gebundenem Pyrophosphat. Nach Dissoziation des Pyrophosphates erfolgt entweder die Dissoziation des Enzym-DNA Komplexes (durchgezogener Pfeil, dissoziativ) oder die weitere Verlängerung des DNA Substrates durch erneute Bindung eines Nukleotides (gestrichelter Pfeil, prozessiv). Erläuterung siehe Text.

In einem ersten Schritt bindet das Enzym (E) das DNA Substrat („primer/template“, p/t) und bildet einen binären Komplex (E:p/t). Anhand Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass sich in Familie A Polymerasen, durch eine Rotationsbewegung der Daumen nach erfolgter Bindung, ein geschlossener Zylinder um die DNA bildet (Li et al. 1998). Die Bewegung erfolgt in einem Strukturmotiv an der Spitze der Daumendomäne, welches in der Struktur des freien Enzyms ungeordnet ist, was für eine hohe Flexibilität in dieser Region des Daumens spricht. Schritt 2 im Zyklus ist die Bindung des Nukleotids in der Finger Domäne des Enzyms innerhalb der sogenannten O-Helix. Ausgehend von Kristallstrukturen für das Enzym im Komplex mit dNTPs ohne DNA Substrat konnte die Bindestelle innerhalb der Domäne identifiziert werden (Beese et al. 1993).

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die Bindung erfolgt dabei über das Triphosphat des Nukleotides und die Bindestelle selbst zeigt ein für Triphosphat-Bindestellen charakteristisches Verhalten gegenüber entsprechenden Markern (Basu et al. 1987). Während die genaue Struktur dieses Komplexes lange Zeit unbekannt war, haben kristallographische Studien den Komplex darstellen können und eine Konformationsänderung von einer offenen („open“) in eine halbgeschlossene Konformation („ajar“) gezeigt (Abbildung 14) (Wu et al. 2011). Einzelmolekülstudien sowohl an immobilisierten, als auch an in Lösung befindlichen Molekülen, konnten zeigen, dass dieser halboffene Zustand eine mögliche Option für einen Zwischenzustand darstellt, der entscheidend für die hohe Replikationsgenauigkeit der Polymerassen ist (Berezhna et al. 2012; Hohlbein et al. 2013; Rothwell et al. 2013).



**Abbildung 14: Orientierung der O-Helix in den Konformationen "open", "ajar" und "closed".** Die Abbildungen basieren auf den Kristallstrukturen der DNA Polymerase I aus *B. stearothermophilus*. Links eine Übersicht der Polymerase (PDB ID: 1L3U) mit „Daumen“ (grün), „Finger“ (gelb) und „Handfläche“ (rot). Die o-Helix ist blau hervorgehoben. Rechts ein Vergleich der Lage der O-Helix in den drei strukturellen Zuständen (PDB ID: open: 1L3U, grün; ajar: 3HP6, gelb; closed: 2HVI, rot). Mit der Orientierung der O-Helix verbunden ist eine Lageänderung des konservierten Tyrosins (in Stäbchenmodell Abbildung rechts). Das Tyrosin zeigt ähnliche Orientierungen in „ajar“ und „closed“, was darauf hindeutet, dass die Rotation der O-Helix möglicherweise der Schließbewegung der Finger-Dömäne vorangeht. Die Bewegung der Fingerdomäne geht mit einer Positionsänderung der Markierposition (In Kalottendarstellung) des Akzeptorfarbstoffes einher (Abbildung links unten). Die Abbildung wurde erstellt mit Pymol (Schrodinger 2010).

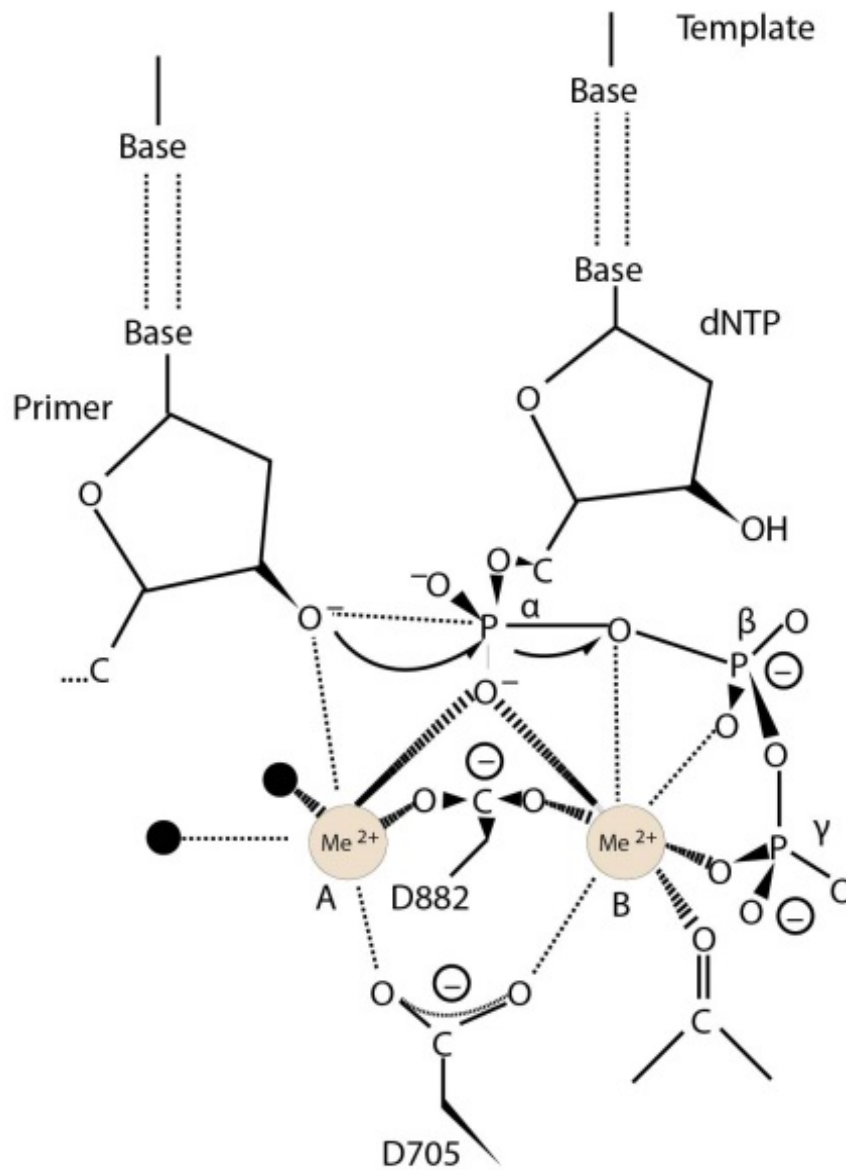


#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Der dritte Schritt überführt den Komplex in die aktive Form und bringt die Finger-Domäne in einen geschlossenen Zustand („closed“). Für viele Jahre war diese strukturelle Änderung der Finger-Domäne als ratenlimitierender Schritt definiert. Kinetische Analysen dieser Bewegung haben jedoch gezeigt, dass der Übergang von einer offenen in eine geschlossene Konformation sehr schnell im Vergleich zur Reaktionsrate des Enzyms ist und somit nicht als limitierender Schritt in Frage kommt (Vande Berg et al. 2001; Rothwell et al. 2005). Einzelmolekülexperimente konnten zudem zeigen, dass Familie A Polymerasen bereits im substratfreien Zustand mehrere Konformationen einnehmen und eine Dynamik im Bereich von Mikrosekunden zeigen (Santoso et al. 2010; Torella et al. 2011). Das in Abbildung 5 gezeigte Schema muss folglich erweitert werden, wobei die genauen strukturellen und funktionalen Zusammenhänge weiterer Zwischenzustände immer noch unklar sind. Abbildung 14 zeigt einen Vergleich der O-Helix in den drei kristallographisch gelösten Strukturen „open“, „ajar“ und „closed“.

Die Transferreaktion stellt den vierten Schritt im Polymerasezyklus dar. Der Mechanismus wurde analog der 3'-5'-Exonukleasefunktion der Familie A Polymerasen beschrieben (Steitz et al. 1994; Steitz 1998) und anhand von kristallographischen Studien sowohl in Familie A Polymerasen als auch in Familie B und RT Polymerasen für die zentrale Polymerasefunktion bestätigt (Kohlstaedt et al. 1992; Sousa et al. 1993; Wang et al. 1997; Doublie et al. 1998). Zentralelemente sind zwei Magnesiumionen, die die Phosphatgruppen des Nukleotides mit Seitenketten des aktiven Zentrums koordinieren (Me B), und die 3'-Hydroxylfunktion der Ribose im zu verlängernden DNA-Strang mit einer Aspartat-Seitenkette im Enzym koordinieren (Me A). Me A sorgt für eine Stabilisierung des deprotonierten 3'-Sauerstoffs der Ribose im zu verlängernden Strang und ermöglicht somit die nukleophile Substitution am  $\alpha$ -Phosphat, während Me B die Dissoziation des entstehenden Pyrophosphates ermöglicht. Beide Ionen spielen eine stabilisierende Rolle im fünffach kovalenten Übergangszustand (Abbildung 15). Der Reaktion folgt eine weitere Konformationsänderung, welches dem entstandenen Pyrophosphat erlaubt, den Komplex zu verlassen.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

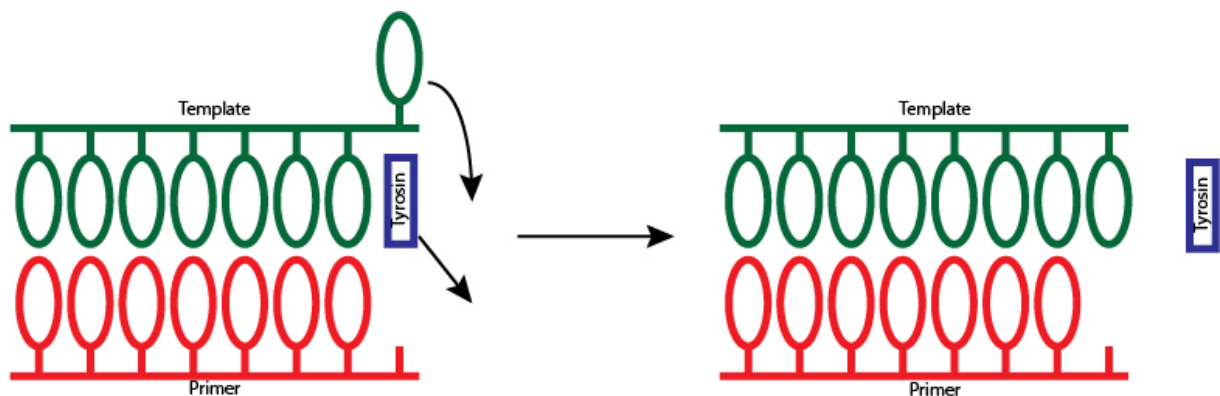


**Abbildung 15: Rolle der Metallkofaktoren in der Polymerasereaktion.** Die beiden Metallionen A und B und ihre Umgebung im aktiven Zentrum einer DNA/RNA Polymerase. Wassermoleküle sind als schwarze Punkte dargestellt. Der nukleophile Angriff des 3'-Riboserestes der DNA (links) des Primers erfolgt am  $\alpha$ -Phosphat des Nucleotides (dNTP). Die Abbildung zeigt den fünffach kovalenten Übergangszustand. Der Reaktionsverlauf ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die Aminosäurenomenklatur (D882 und D705) entspricht der T7 DNA Polymerase. Die Abbildung wurde entnommen aus (Steitz 1998).

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.2.3 Die Rolle von Tyrosin 766 im Polymerasezyklus

Familie A Polymerasen besitzen ein konserviertes Tyrosin (Tyr, Y) am C-Terminus der O-Helix (Tyr671 in *Thermus aquaticus*, Tyr714 in *Bacillus stearothermophilus*, Tyr766 in *Escherichia coli*), welches sich im binären Komplex parallel zum ersten Basenpaar der DNA ausrichtet und die erste ungepaarte Base verdrängt. Aus Funktionsstudien ist bekannt, dass ein Austausch dieses Tyrosins gegen ein Serin nicht zu einem Funktionsverlust des Enzyms führt, die Replikationsgenauigkeit jedoch stark herabsetzt (Bell et al. 1997; Minnick et al. 1999). Die mit der Konformationsänderung in die geschlossene Konformation einhergehende Rotation der O-Helix führt zu einer Neuausrichtung der Tyrosinseitenkette. Damit verbunden ist eine Ausrichtung der ungepaarten Base, so dass diese innerhalb des aktiven Zentrums gegenüber dem Nukleotid positioniert wird (Abbildung 16). Die Tyrosinseitenkette könnte somit als molekularer Schalter dienen, der einen bisher nicht charakterisierten Zustand ermöglicht und somit zur Differenzierung zwischen korrektem und inkorrektem Nukleotid im Polymerasezyklus führt. Die erfolgreiche Kristallisation der halboffenen Konformation zeigt jedoch keinen strukturellen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Proteinvariante, in der das Tyrosin durch ein Serin ersetzt wurde und der eine erhöhte Fehlerrate auf struktureller Ebene erklären könnte (Wu et al. 2011). Daher ist die funktionelle Rolle des Tyrosins immer noch unklar.



**Abbildung 16: Hypothetische Funktion des konservierten Tyrosins.** Das Tyrosin (blau) blockiert den Platz der Template-Base im enzymatischen Zentrum. Erst nach der Domänenbewegung und dem damit einhergehenden „Flip“ des Tyrosins steht zur Verlängerung des Primers wieder eine gegenüberliegende Base zur Verfügung.

Die unterschiedliche Positionierung des Tyrosins in Bezug zum DNA-Substrat in der offenen und geschlossenen Konformation ist zudem ein möglicher Mechanismus für die Verschiebung der DNA innerhalb des prozessiven Polymerasezyklus. Die mit einer erneuten Nukleotidbindung verbundene, offene Konformation bringt die Tyrosin-

#### **4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I**

Seitenkette in einen sterischen Konflikt mit dem neu synthetisierten Basenpaar. Eine Verschiebung der DNA würde dem entgegen wirken, setzt jedoch eine Beweglichkeit der DNA innerhalb des Enzyms voraus. Die DNA-Bindestelle liegt dabei innerhalb eines stark positiv geladenen Bereiches des Enzyms, welcher einen schnellen Austausch von elektrostatischen Wechselwirkungen ermöglichen könnte und somit die DNA entlang ihrer Längsachse beweglich macht (Guajardo et al. 1997). Das Öffnen der Finger-Domäne und eine erneute Ausrichtung der Tyrosin-Seitenkette parallel des letzten Basenpaares würde die DNA wieder fixieren und den nächsten katalytischen Zyklus ermöglichen.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3 Experimentelle Arbeiten

#### 4.3.1 Klonierung des für das Klenow-Fragment codierende Fragment des *polA*-Gens aus *Escherichia coli* in den Expressionsplasmid pQE-30.

Ausgangspunkt für die erfolgreiche Klonierung war die Isolierung der genomischen DNA aus *Escherichia coli*. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit einer Probe des *E.coli* Stamm XL2-Blue MRF beimpft und in einem Inkubator (Minitron, Infors HT) für 16 h bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Tissue Laborkits (Macherey-Nagel) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die so gewonnene DNA diente als Ausgangspunkt für die Vervielfältigung des *polA*-Genfragmentes mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Hierbei wird aus einer DNA-Matrize und kurzen, komplementär dazu bindenden Oligonukleotidprimern durch eine DNA-Polymerase das gewünschte, doppelsträngige DNA-Fragment erstellt und vervielfältigt (Mullis et al. 1987). Die PCR erfolgte unter Verwendung der HiFi-DNA-Polymerase (New England Biolabs) und den mitgelieferten Reaktionspuffern im PCR-Automaten (Primus 96 advanced, Peqlab). Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes und das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst. Die dabei verwendeten Primer enthielten zum Zielvektor (pQE-30, Qiagen) kompatible Restriktionsendonukleaseschnittstellen in flankierender Position.

**Tabelle 7: PCR-Ansatz zur Amplifizierung des Klenow-Fragmentes des *polI*-Gens.** Die Konzentration der eingesetzten Primer betrug 100  $\mu$ M.

Volumen	Reagenz
0.5 $\mu$ l	genomische <i>E.coli</i> DNA (~5 fmol)
1 $\mu$ l	Nukleotidmix (10mM je Nukleotid)
10 $\mu$ l	5x Polymerasepuffer HF
1 $\mu$ l	Klenow for BamHI Primer (Sense)
1 $\mu$ l	Klenow rev NcoI Primer (Antisense)
0.5 $\mu$ l	HiFi-DNA-Polymerase (2U/ $\mu$ l)
36 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
50 $\mu$ l	<b>Gesamtvolumen</b>

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

**Tabelle 8: PCR-Programm zur Amplifizierung des Klenow-Fragmentes des *polA*-Gens.** Rot hinterlegte Schritte wurden insgesamt 35x wiederholt.

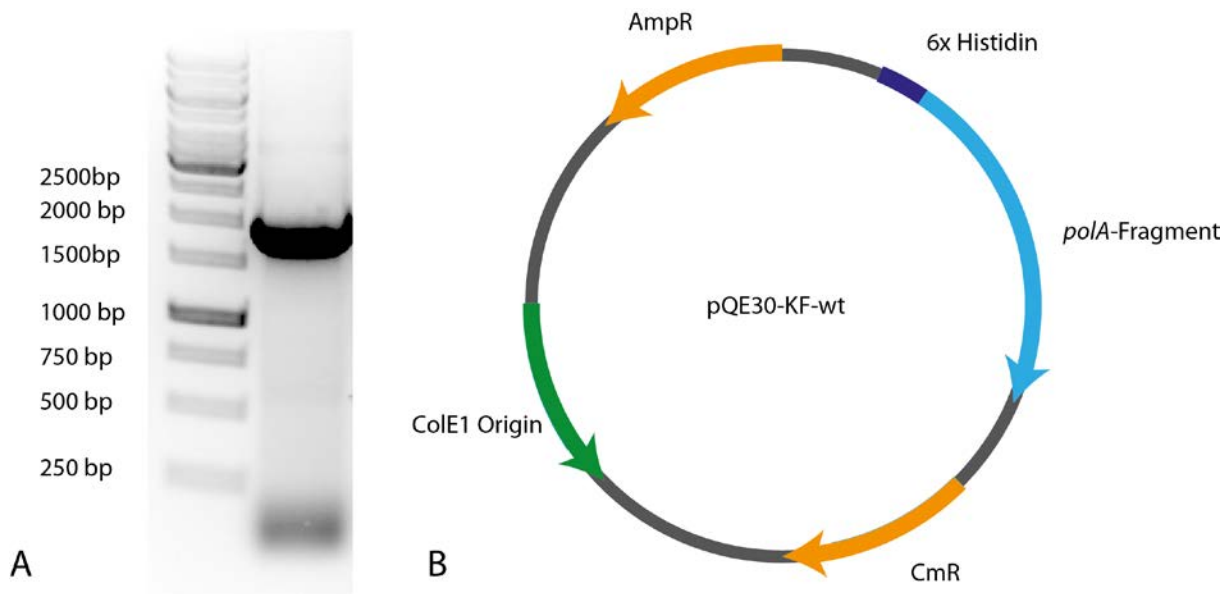
Zeit	Temperatur	Vorgang
	105°C	Deckelheizung
<b>5:00 min</b>	98°C	Initiale Denaturierung
<b>0:45 min</b>	98°C	Denaturierung
<b>0:30 min</b>	65°C	Anlagerung Primer-Template
<b>1:30 min</b>	72°C	Doppelstrangsynthese
<b>10:00</b>	72°C	Abschließende Doppelstrangsynthese
<b>∞</b>	4°C	Programmabschluss und Lagerung

Nach Abschluss der PCR wurde der Ansatz mittel Agarosegelelektrophorese der Fragmentgröße nach getrennt und das amplifizierte Genfragment passender Größe (~1800 basenpaare) aus dem Gel isoliert. Hierzu wurden Gele aus 1% Agarose und TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA, Merck) verwendet und mit 0.1-0.5 µg Ethidiumbromid/ml Gel versetzt. In die durch einen Kamm ins Gel eingefügten Taschen wurden sowohl die DNA-Proben, welche zuvor mit 6x Blaumarker versetzt wurden, als auch ein Längenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V Gleichspannung für ca. 30 Minuten. Die negativ geladene DNA wanderte dabei in Richtung Anode. Die Agarosegelmatrix fungiert als molekulares Sieb und trennt DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Die Detektion der DNA erfolgte mittels UV-Anregung des Interkalators und der Detektion der Interkalatorfluoreszenz mit einer Kamera (DOC-Print 2, Vilbert Lourmat). Das DNA-Fragment passender Größe wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Labor-Kits (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben aus der Agarosematrix isoliert. Das so gewonnene DNA-Fragment wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und NcoI gemäß den Anweisungen des Enzymherstellers (Fermentas) verdaut. Parallel dazu erfolgte der enzymatische Verdau der Plasmid-DNA (pQE-30, Qiagen).

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die Isolierung der verdauten Fragmente und der Plasmid-DNA aus den Restriktionsansätzen erfolgte ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion mit Hilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Labor-Kits (Macherey-Nagel). Ca. 5 fmol der verdauten Plasmid-DNA wurden mit einem vierfachen Überschuss an *polA*-Fragment-DNA zur Ligation eingesetzt. Die Ligrationsreaktion wurde gemäß den Angaben des Ligaseherstellers durchgeführt (T4-DNA-Ligase, Fermentas). Nach erfolgter Ligation wurden chemisch kompetente *E.coli* XL2-Blue MRF Zellen (Stratagen) mit 2 µl des Ligrationsansatzes transformiert. Hierzu wurden 200 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligrationsansatzes für 30 bis 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser Transformationsansatz für 30 Sekunden auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und für ca. 2 Minuten auf Eis inkubiert (Hanahan 1983). Aufgrund der im Plasmid codierten Ampicillinresistenz entfiel eine eventuelle phänische Expression in Flüssigkultur und der Transformationsansatz konnte direkt auf LB-Agarplatten (1.5% Agar, 100 µg/mL Ampicillin) ausplattiert werden, welche anschließend ca. 16 h bei 37°C inkubiert wurden. Mit jeweils einer nach der Inkubation erkennbaren Bakterienkolonie wurden 5 x 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 37°C und 150 rpm für ca. 16 h inkubiert. Aus den so gewonnenen Kulturen wurde mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep“ Labor-Kits (Qiagen) die Plasmid-DNA gemäß Arbeitsanweisung des Hersteller isoliert und durch einen Restriktionsendonukleasenverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese auf das gewünschte Konstrukt überprüft. Positive Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. (GATC-Biotech, Konstanz, Deutschland). Ein positiv getestetes und sequenziertes Konstrukt wurde für eine erneute Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* XL2-Blue Zellen benutzt und der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten (1.5% Agar, 100 µg/mL Ampicillin) ausplattiert. 150 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden daraufhin mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde zur Präparation der Plasmid-DNA mittels „HiSpeed Plasmid Midi“ Labor-Kits (Qiagen) gemäß Herstelleranweisung verwendet. Das so erhaltene Konstrukt pQE-30-KF-wt bildete die Grundlage für die weiteren, molekularbiologischen Arbeiten. Abbildung 17 zeigt eine schematische Darstellung des Plasmides sowie das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach erfolgter Polymerasekettenreaktion.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 17: Ergebnis der PCR-Reaktion und schematische Darstellung des Konstruktes pQE-30-KF-wt.** Teilabbildung A zeigt das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach erfolgter PCR-Reaktion. Anhand des verwendeten Größenstandards lässt sich die Länge des DNA-Fragmentes auf ca. 1800 Basenpaare schätzen, was mit der zu erwartenden Größe des *polA*-Fragmentes von 1846 Basenpaaren übereinstimmt. Teilabbildung B zeigt schematisch das resultierende Konstrukt pQE-30-KF-wt. Hervorgehoben sind das *polA*-Fragment mit N-terminalem Histidinanker (6x Histidin), die auf dem Plasmid codierten Antibiotikaresistenzen (AmpR, CmR) und der Replikationsursprung (ColE1 Origin).



## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.2 Einfügen von Cysteinen und funktionellen Mutationen in die Primärsequenz durch gerichtete Mutagenese

Für die Charakterisierung des Klenow-Fragmentes mittels Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie wird das Enzym mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Hierzu gibt es eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Farbstoffen mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen zur Kopplung an ein Protein. Unter milden Bedingungen wie neutralem pH (6.5 – 7.5) und wässrigem Puffer hat sich die Kopplung mittels eines Maleimids und einer Thiolgruppe bewährt.

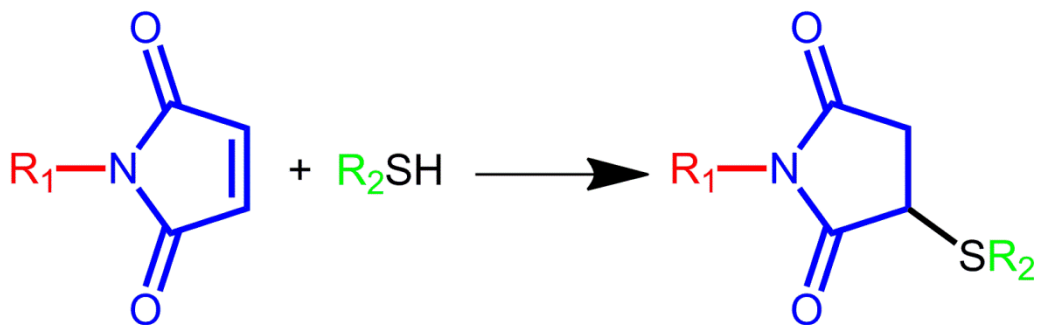


Abbildung 18: Reaktionsschema für die Reaktion eines Maleimids mit einem Thiol

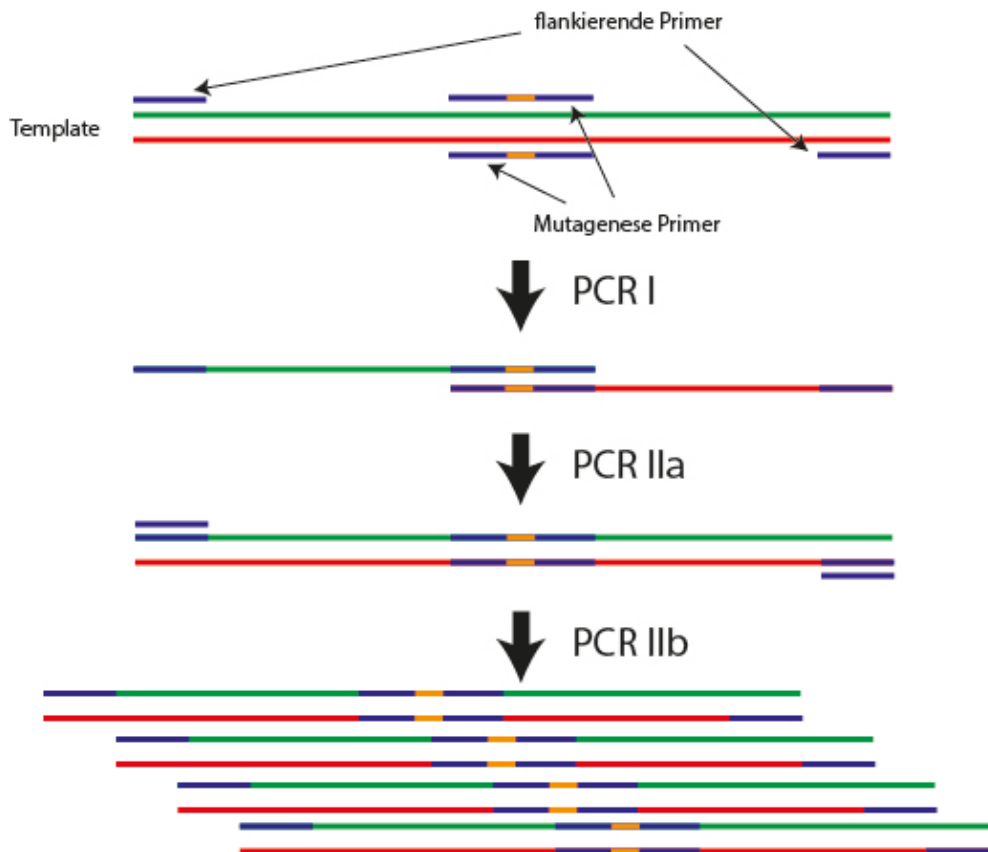
Für die Kopplungsreaktion wurden mittels gerichteter Mutagenese Aminosäuren durch Cysteine in der Primärsequenz ausgetauscht. Die Position der Cysteine orientierte sich dabei an bereits veröffentlichten Ergebnissen, die zeigten, dass eine Mutation in diesen Bereichen des Enzyms keine bzw. nur geringe Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat und für die Anwendung in der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie in Frage kommt (Santoso et al. 2010). Neben dem Einfügen von Cysteinen für die Farbstoffmarkierung des Enzyms wurden zudem funktionelle Mutationen zur Erzeugung von Enzymvarianten ohne konserviertes Tyrosin (siehe 4.2.3 Die Rolle von Tyrosin 766 im Polymerasezyklus) eingefügt.

**Tabelle 9: Liste der Mutagenesepositionen und ihr jeweiliger Verwendungszweck.** Die Nomenklatur nennt die ursprüngliche Aminosäure im Einbuchstabencode zuerst, dann die Position der Aminosäure in der Primärsequenz und am Ende die neue Aminosäure im Einbuchstabencode.

Mutation	Verwendungszweck
D548C	Farbstoffmarkierung
G743C	Farbstoffmarkierung
Y766F	Funktionelle Mutation
Y766S	Funktionelle Mutation

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

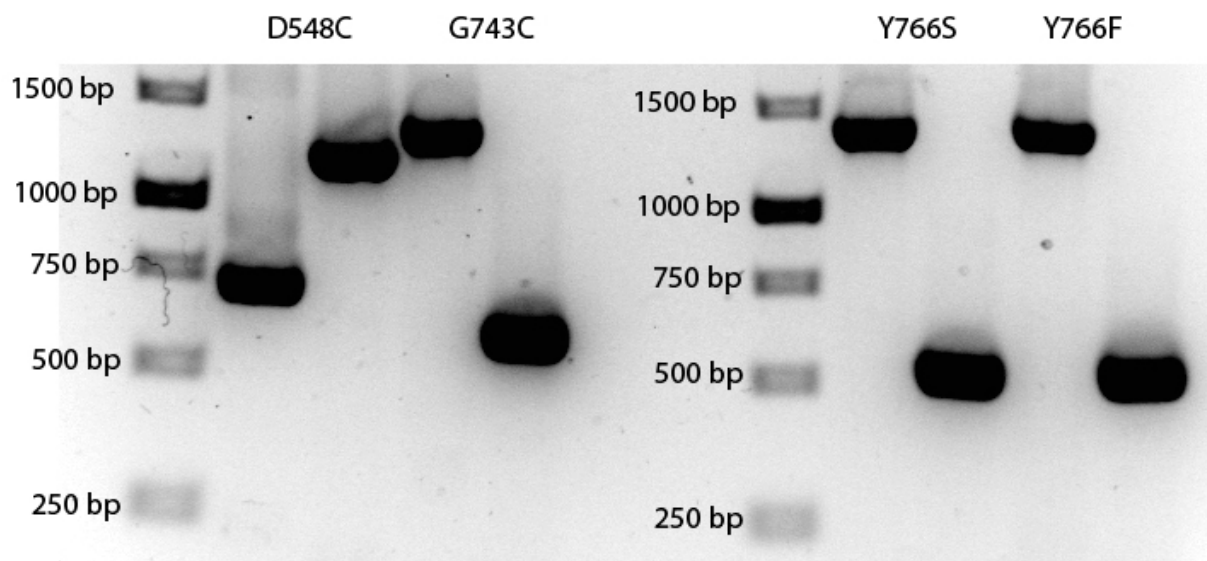
Ausgangspunkt für die gerichtete Mutagenese war das Konstrukt pQE-30-KF-wt. Die gerichtete Mutagenese erfolgte mittels „overlap extension PCR“ (Ho et al. 1989; Herlitz et al. 1990). Für die Mutagenese wurden insgesamt vier Oligonukleotidprimer benötigt, die in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Ansätzen eingesetzt wurden. In einer ersten Synthesereaktion entstanden zwei einzelsträngige DNA-Fragmente, die sich im Bereich der Mutationsstelle überlappen. Der verwendete Ansatz sowie das PCR-Programm entsprachen dabei im Wesentlichen denen der Klonierung des pQE-30-KF-wt Konstruktes (Tabelle 7, Tabelle 8), wobei jeweils ein flankierender Primer durch den entsprechenden Mutageneseprimer (Tabelle 6) ersetzt wurde. In einer zweiten PCR wurden nachfolgend die beiden Fragmente eingesetzt, komplementär vervollständigt und schließlich durch Zugabe der flankierenden Oligonukleotidprimer amplifiziert. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der „Overlap extension PCR“ zur gerichteten Mutagenese.** In grün und rot sind Leit- und Folgestrang dargestellt. Die Primer DNA ist blau dargestellt. In orange ist eine putative Mutationsstelle hervorgehoben. Nach dem ersten PCR Ansatz (PCR I) erhält man zwei Fragmente, die sich im Bereich der Mutagenese Primer überlappen. In einem zweiten PCR-Ansatz werden zunächst die beiden Fragmente komplementär vervollständigt (PCR IIa) und abschließend durch eine erneute Zugabe der flankierenden Primer amplifiziert (PCR IIb).

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die PCR-Ansätze zur Erstellung der Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und die entsprechenden Fragmente aus der Gelmatrix isoliert (siehe 4.3.1 Klonierung des für das Klenow-Fragment codierende Fragment des *polA*-Gens aus *Escherichia coli* in den Expressionsplasmid pQE-30.). Die daran anschließende, zweite PCR wurde nach insgesamt 20 Wiederholungen pausiert und der Ansatz mit jeweils 1 µl flankierender Oligonukleotidprimerlösung versetzt, bevor das Programm wieder gestartet wurde. Die PCR Ansätze wurden anschließend wiederum über Agarosegelelektrophorese analysiert und das die Mutation tragende *polA*-Fragment konnte wie unter 4.3.1 beschrieben mittels Restriktionsendonukleasen verdaut und zur Ligation in den Vektor pQE30 verwendet werden. Eine abschließende Kontrolle erfolgte ebenfalls über eine Sequenzierung der in den Vektor eingebrachten DNA (GATC Biotech, Konstanz) nach Amplifizierung und Isolierung der Plasmid-DNA. Tabelle 10 und Tabelle 11 zeigen den verwendeten Ansatz und das verwendete PCR-Programm. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach der ersten Polymerasekettenreaktion mit den dabei synthetisierten Fragmenten.



**Abbildung 20: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese zur Erzeugung der überlappenden Fragmente.** Die Abbildung zeigt jeweils eine Spalte Größenstandard gefolgt von vier Spalten DNA-Proben. Die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen sind: D548C: 1168 bp und 707 bp; G743C: 589 bp und 1296 bp; Y766S/Y766F: 520 bp und 1365 bp. Die experimentellen Ergebnisse zeigen Banden passend zu den erwarteten Größen.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

**Tabelle 10: PCR-Ansatz für die PCR II zur gerichteten Mutagenese mittels overlap extension PCR.** Die Konzentration der eingesetzten Primer betrug 100 µM

Volumen	Reagenz
X µl	Fragmentmischung aus PCRI (Im Verhältnis 3:1, ca. 50 fmol))
1 µl	Nukleotidmix (10mM je Nukleotid)
10 µl	5x Polymerasepuffer HF
0.5 µl	HiFi-DNA-Polymerase (2U/µl)
36.5-X µl	H <sub>2</sub> O
<b>Zugabe in Programmpause</b>	
1 µl	Klenow for BamHI Primer (Sense)
1 µl	Klenow rev NcoI Primer (Antisense)

**Tabelle 11: PCR-Programm zur gerichteten Mutagenese mittels overlap extension PCR.** Rot hinterlegte Schritte wurden insgesamt 20x wiederholt, grün hinterlegte Schritte wurden 30x wiederholt.

Zeit	Temperatur	Vorgang
	105°C	Deckelheizung
5:00 min	98°C	Initiale Denaturierung
0:45 min	98°C	Denaturierung
0:30 min	65°C	Hybridisierung Primer-Template
1:30 min	72°C	Doppelstrangsynthese
10:00	72°C	Abschließende Doppelstrangsynthese
<b>Programmpause</b>		
5:00 min	98°C	Initiale Denaturierung
0:45 min	98°C	Denaturierung
0:30 min	65°C	Hybridisierung Primer-Template
1:30 min	72°C	Doppelstrangsynthese
10:00	72°C	Abschließende Doppelstrangsynthese
∞	4°C	Programmabschluss und Lagerung

Durch wiederholte Mutagenese konnten die in Tabelle 9 aufgelisteten Positionen entsprechend kombiniert werden. Tabelle 12 zeigt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

**Tabelle 12: Auflistung der erstellten Konstrukte.** Die Nomenklatur nennt den verwendeten Plasmid, das Kürzel des Proteins (KF für Klenow-Fragment) sowie eventuell eingefügte Mutationen. Mutationen sind beschrieben durch die Nennung der ursprünglichen Aminosäure (Einbuchstabencode), der Position in der Aminosäureprimärsequenz und der Nennung der ersetzenden Aminosäure (Einbuchstabencode). „wt“ zeigt die wildtypische Variante des Proteins an.

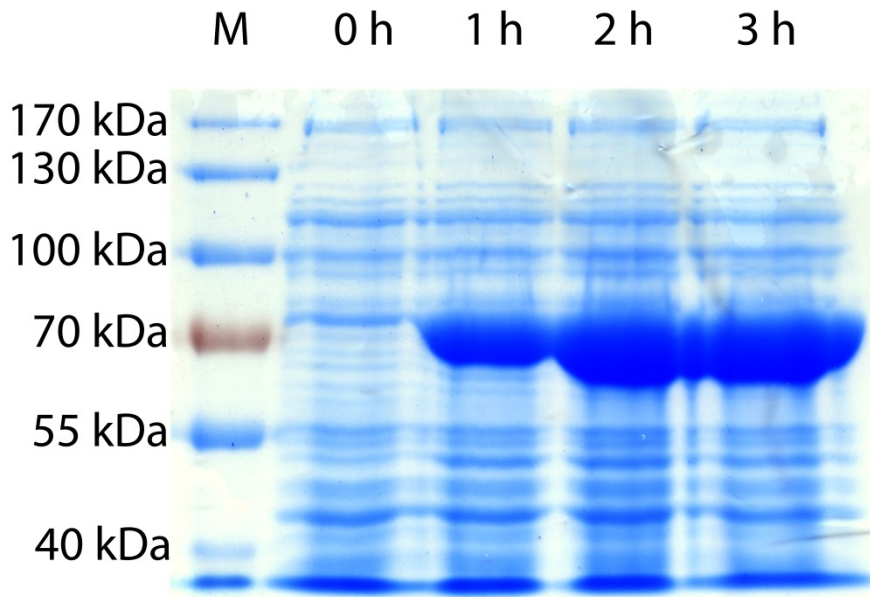
Konstrukt	Beschreibung
<b>pQE-30-KF-wt</b>	Expressionsplasmid für wildtypisches Klenow-Fragment mit 6xHistag
<b>pQE-30-KF-D548C</b>	Expressionsplasmid für eine Cysteinvariante des Klenow-Fragment mit einem zusätzlichen Cystein und 6x His-tag
<b>pQE-30-KF-G743C</b>	Expressionsplasmid für eine Cysteinvariante des Klenow-Fragment mit einem zusätzlichen Cysteinen und 6x His-tag
<b>pQE-30-KF-D548C-G743C</b>	Expressionsplasmid für eine Cysteinvariante des Klenow-Fragment mit zwei zusätzlichen Cystein und 6x His-tag
<b>pQE-30-KF-D548C-G743C-Y766S</b>	Expressionsplasmid für eine Cysteinvariante des Klenow-Fragment mit zwei zusätzlichen Cysteinen und 6x His-tag, sowie funktioneller Mutation des Tyrosin 766
<b>pQE-30-KF-D548C-G743C-Y766S</b>	Expressionsplasmid für eine Cysteinvariante des Klenow-Fragment mit zwei zusätzlichen Cysteinen und 6x His-tag, sowie funktioneller Mutation des Tyrosin 766

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.3 Induzierte Expression von *polA*-Varianten in *Escherichia coli*

Für die Expression der in den Expressionsplasmid pQE-30 klonierten Varianten des *polA*-Fragmentes wurden *Escherichia coli* XL2 Blue MRF Zellen verwendet. In einem ersten Schritt wurden kompetente Zellen mit dem jeweiligen Konstrukt transformiert (siehe 4.3.1 Klonierung des für das Klenow-Fragment codierende Fragment des *polA*-Gens aus *Escherichia coli* in den Expressionsplasmid pQE-30.). Mit jeweils einer Bakterienkolonie wurde eine Vorkultur aus 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 37°C und 150 rpm für ca. 16 h inkubiert. Ausgehend von dieser Vorkultur wurden 2 Liter LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit 20 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) zur Kultur mit einer finalen Konzentration von 1mM bei einer optischen Dichte der Kultur von 0.5 bis 0.7, gemessen bei 600 nm Wellenlänge ( $OD_{600}$ ). Die Expression erfolgte über einen Zeitraum von 3 Stunden. Die Expressionskultur wurde anschließend mittels Zentrifugation (10000 g, 10 Minuten) pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 30 ml Lysispuffer (50 mM BisTris-HCL pH 7, 5 % Glycerol, 250 mM NaCl) resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde erneut pelletiert (5000 g, 20 Minuten) und bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren. Der Verlauf der Genexpression wurde durch eine stündliche Probenentnahme von 1 ml Kulturproben und einer Analyse mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kontrolliert (siehe 4.3.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)). Hierzu wurden die entnommenen Proben zunächst pelletiert (10000 g für 5 Minuten) und in Wasser mit finaler Konzentration von  $OD_{600}$  0.1/10 µl resuspendiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit 1/5 des Volumens an 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 98°C für 5 Minuten inkubiert. Abbildung 21 zeigt den Verlauf einer Expression anhand der Ergebnisse einer SDS-PAGE für die Produktion der Variante KF-D548C-G743C des Klenow-Fragmentes.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 21: Ergebnis der SDS-PAGE der Überexpression für die Variante KF-D548C-G743C des polA-Fragmentes.** Das Bild zeigt eine deutliche Zunahme einer Proteinbande bei ca. 70 kDa vom Zeitpunkt vor der Induktion (0 h) bis 3 Stunden nach erfolgter Induktion (3 h). Die Bande entspricht der zu erwartende Bande für das Klenow-Fragment (68 kDa). Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet (M).

### 4.3.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine besitzen unterschiedliche Nettoladungen, abhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung und dem pH-Wert der Lösung. Um eine Größenabschätzung mittels Elektrophorese durchführen zu können, muss eine relativ zur Molekularmasse gleichgewichtete Ladung eingebracht werden. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat („sodiumdodecylsulfate“, SDS) denaturiert Proteine, indem es sich entlang des Aminosäurerückrates anlagert. Zusätzlich überlagert die durch das SDS eingebrachte Ladung die native Ladung des Proteins. Im Zusammenspiel mit einer porösen Polyacrylamidmatrix, die als molekulares Sieb fungiert, trennt die SDS-PAGE Proteingemische anhand ihrer Molekulargewichte auf (Rehm 2002). Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) System. Hierbei wurden diskontinuierliche Gele aus Sammel- und Trenngel verwendet (Laemmli 1970). Die Rezepturen zur Herstellung der beiden Gelkomponenten sowie die Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers sind in Tabelle 13 aufgeführt. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-SDS-Puffer verwendet (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS). Durch die Anlegung einer elektrischen Spannung erfolgte die Auftrennung der Proben (200 V für 40-45 min).

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die Gele wurden anschließend mit SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) nach Herstellerangaben gefärbt und mit einer Geldokumentationsanlage (Stella, Raytest) digitalisiert.

**Tabelle 13: Verwendete Rezepte für die SDS-PAGE**

<b>Chemikalie</b>	<b>Trenngel (12%)</b>	<b>Sammelgel (5%)</b>	<b>5x SDS Probenpuffer</b>
Acrylamid (30%, 29:1)	4 ml	830 µl	---
1 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 ml	---	---
1 M Tris-HCl, pH 6.8	---	626 µl	500 µl
dH <sub>2</sub> O	2.09 ml	3.459 ml	auf 10 ml auffüllen
SDS (20%)	50 µl	25 µl	4 % (m/v)
APS (10%)	100 µl	50 µl	---
TEMED	10 µl	10 µl	---
B-Mercaptoethanol	---	---	2 % (v/v)
Bromphenolblau	---	---	0.03 % (m/v)
Glycerin	---	---	1 ml
<b>Gesamtvolumen</b>	10 ml	5 ml	10 ml

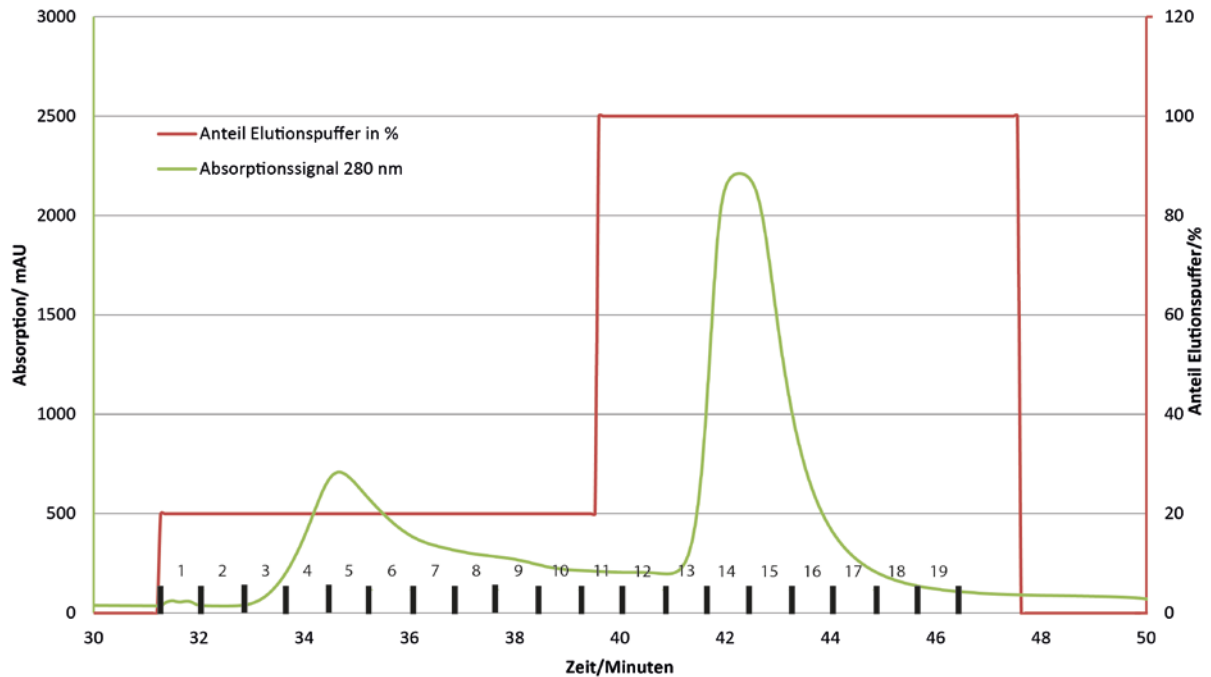


## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

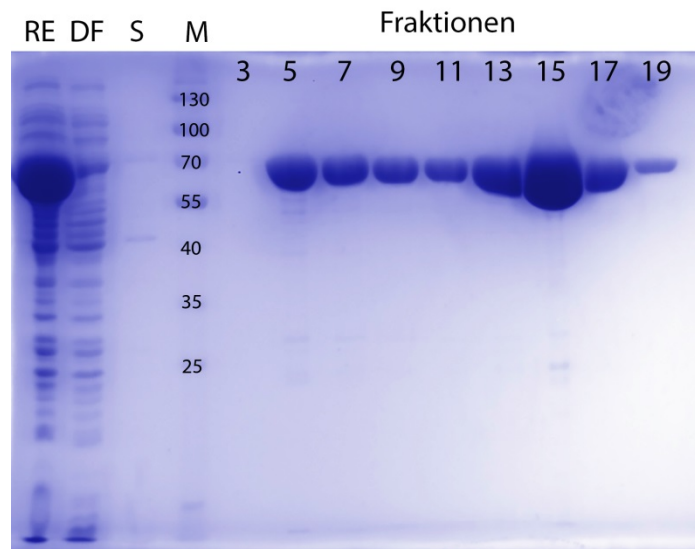
### 4.3.5 Aufreinigung der Klenow-Fragmentvarianten mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)

Die produzierten Varianten des Klenow-Fragmentes besitzen einen N-terminalen Polyhistidinanker (His-tag), der die Aufreinigung des Proteins mittels IMAC ermöglicht. Hierbei wird die Affinität des Histidinankers zu einem durch die feste Chromatographiephase teilweise komplexierten, Schwermetallion (hier  $\text{Ni}^{2+}$ ) genutzt, um das entsprechende Protein aus dem Zellysate zu isolieren (Hochuli et al. 1988). Tabelle 14 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer. Die aus der Expression gewonnenen Zellpellets wurden in 20 mL Lysispuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (Sonoplus HD 2200 mit MS 72 Sonotrode, Bandelin). Die resuspendierten Pellets wurden jeweils 3x 30 Sekunden mit 30 Sekunden Ruhephase bei 50 % Pulsrate und 50% der Maximalleistung sonifiziert. Die anschließende Trennung der löslichen Fraktion des Rohextraktes von unlöslichen Bestandteilen und Zelltrümmern erfolgte durch Zentrifugation bei 30000 g für 10 Minuten. Die Zielproteine wurden unter der Verwendung einer ÄKTaprime™ plus (GE Healthcare) und zwei hintereinander geschalteten 5 ml HisTrap™ FF Column (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 5 ml/min aus der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses isoliert. Im ersten Schritt erfolgte die Äquilibration der Säulen mit ca. 5 Säulenvolumen Lysispuffer. Die lösliche Fraktion wurde über die Pufferleitung A auf die Säule geleitet und der Durchfluss (DF) gesammelt. Im Anschluss daran wurde die Säule mit Lysispuffer gespült. Der Spülvorgang wurde solange durchgeführt, bis das beobachtete Absorptionssignal bei 280 nm eine vergleichbare Intensität wie vor der Beladung der Säule aufwies. Schwach gebundene Proteine wurden durch einen Waschriff mit einer Mischung 80/20 Lysispuffer/Elutionspuffer von der Säule gewaschen. Die Elution der Zielproteine erfolgt wiederum nach Erreichen einer Signalbasislinie mit 100% Elutionspuffer. Das Eluat wurde während des Beladens und Spülens der Säule manuell in 50 ml Reaktionsgefäßen, während des Waschriffes und des Elutionsschrittes automatisiert in 4 ml Fraktionen gesammelt. Proben des Rohextrakt, der Spülfraction und der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Chromatogramm einer typischen Aufreinigung und die dazugehörige SDS-PAGE sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 22: Chromatogramm der IMAC-Aufreinigung der Variante KF-D548C-G743C des Klenow-Fragmentes.** Abgebildet ist das Chromatogramm für den Waschvorgang (20 % Elutionspuffer) und die Elution (100 % Elutionspuffer). Die Abbildung zeigt das Absorptionssignal bei 280 nm in relativen Einheiten („Arbitrary units“, AU) in grün und die Zusammensetzung des Puffers durch den Anteil des Elutionspuffer in % in rot. Die gesammelten Fraktionen sind in schwarz nummeriert. Man erkennt einen Signalpeak während des Waschens. Der Peak hat sein Maximum bei Fraktion 5 und eine Schulter bis ca. Fraktion 9. Die Elution erfolgt in einem scharfen Peak, der sich über die Fraktionen 13 bis 17 erstreckt.



**Abbildung 23: Ergebnis der SDS-PAGE der IMAC-Aufreinigung der Variante KF-D548C-G743C des Klenow-Fragmentes.** Aufgetragen sind die lösliche Fraktion des Rohextrakts (RE), der Durchfluss (DF), die Spülfraction (S), Größenstandard (M, Angaben in kDa) sowie die entsprechend nummerierten Fraktionen der Wasch- und Elutionsfraction. Zu erkennen ist, dass bereits während des Waschens Protein der erwarteten Molmasse von der Säule eluiert, dieses jedoch noch Verunreinigungen enthält. Im Elutionspeak dagegen sind nur noch minimale Verunreinigungen vorhanden.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Tabelle 14: Pufferzusammensetzung der eingesetzten Pufferlösungen in der Aufreinigung und der Farbstoffmarkierung der Klenow-Fragmentvarianten.

	<b>Lysispuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>	<b>Niedrigsalzpuffer</b>	<b>Hochsalzpuffer</b>
<b>BisTris-HCl</b>	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
<b>NaCl</b>	250 mM	250 mM	-	250 mM
<b>Imidazol</b>	-	250 mM	-	-
<b>pH (RT)</b>	7.0	7.0	7.0	7.0
<b>Arbeitsschritt</b>	<b>IMAC-Aufreinigung</b>		<b>Ressource Q Ionenaustauscher</b>	

Die proteinhaltigen Fraktionen der Elution wurden vereinigt und mittels Zentrifugalfilter auf ein finales Volumen von ca. 2 ml eingeengt. Verwendet wurden 50 kDa Ausschlussfilter (Millipore), um zusätzlich noch niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen. Die Zentrifugation erfolgte in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) bei 4°C und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (rcf) von 4300 für 20 min und wurde bei Bedarf wiederholt. Das Proteinkonzentrat wurde daraufhin erneut mit Lysispuffer zehnfach verdünnt und die Lösung erneut mittels Zentrifugalfilter konzentriert, um die finale Konzentration von Imidazol zu verringern.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.6 Fluoreszenzmarkierung der Klenow-Fragmentvarianten

Die Fluoreszenzmarkierung der Proteine erfolgte über die Reaktion von thiolreaktiven Farbstoffen mit den in der Mutagenese eingebrachten Cysteinen der Klenow-Fragmentvarianten. Hierzu wurden mit einer Maleimidgruppe modifizierte Farbstoffe verwendet (Abbildung 18). Durch die Kopplung des Farbstoffes an das Protein können sich fundamentale Fluoreszenzeigenschaften ändern (Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer). Für quantitative fluoreszenzspektroskopische Analysen mit hoher Auflösung müssen diese Parameter bekannt sein, so dass zusätzlich zur FRET-markierten Probe noch eine Donor-markierte Probe und die Möglichkeit, entsprechende Parameter für den Akzeptorfarbstoff zu extrahieren, benötigt wird. Verunreinigungen der Probe sowie fehlerhaft oder unzureichend mit Farbstoff markierte Probenmoleküle stellen zusätzlich für die weitere Analyse der Messungen eine Fehlerquelle dar. Für optimale Ergebnisse ist somit eine hohe Reinheit der Proben und ein möglichst hoher Markierungsgrad („degree of labeling“, DOL) für beide Farbstoffe anzustreben. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Verwendung von unterschiedlichen reaktiven Gruppen mittels unnatürlicher Aminosäuren dem hier verwendete Verfahren mit zwei thiolreaktiven Farbstoffen vorzuziehen (Loscha et al. 2012). Die Markierung mittels unnatürlicher Aminosäuren benötigt jedoch Bedingungen wie niedrige pH-Werte oder hohe Temperaturen während der Reaktion, die die Aktivität und Stabilität vieler Proteine und Enzyme beeinflussen. Hinzu kommen spezielle Zusätze im Nährmedium während der Proteinexpression. Das hier verwendete Verfahren einer sequentiellen Markierung des Proteins mit zwei thiolreaktiven Farbstoffen erfolgte dagegen unter milden pH-Bedingungen (pH 7) bei niedrigen Temperaturen (4°C). Hierbei wird das Protein zunächst mit einem Farbstoff markiert, die einfach markierte Fraktion von in der Reaktion auftretenden Nebenprodukten wie unmarkiertem und doppelt markiertem Protein getrennt und anschließend mit dem zweiten Farbstoff markiert. Prinzipiell erfolgt die Aufreinigung der einfach markierten Proteine mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie. Die eingesetzten Farbstoffe tragen in der Regel eine geringe Ladung und haben somit einen Einfluss auf die Affinität des Proteins zur stationären Phase des Ionentauschers.

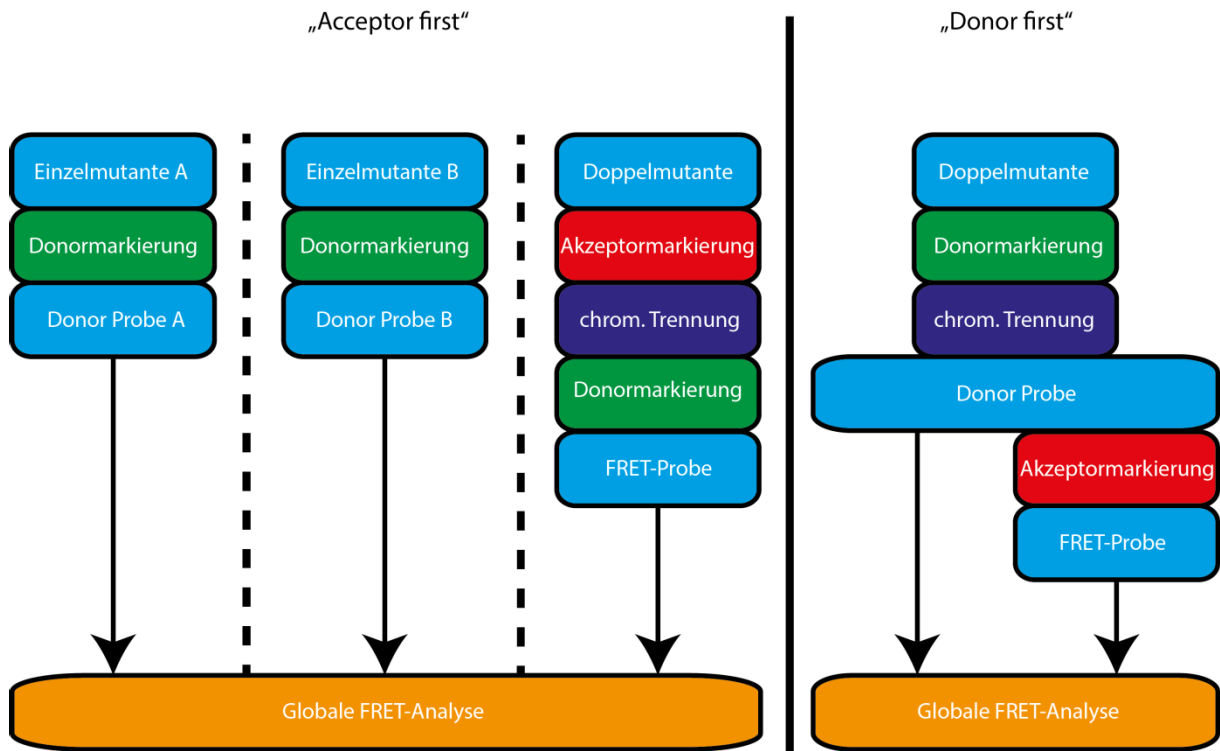
#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die Art des Ionentauschers wird durch die Nettoladung des Proteins bestimmt. Je nach Ladung des Farbstoffes ergeben sich somit vier Elutionsprofile für die Elution eines Proteins:

- (1) Kationisches Protein mit kationischem Farbstoff: Kationenaustauscher. Erwartet wird zuerst das unmarkierte Protein, gefolgt von einfach markiertem Protein und schließlich doppelt markiertes Protein.
- (2) Kationisches Protein mit anionischem Farbstoff: Kationenaustauscher. Erwartet wird doppelt markiertes Protein, dann einfach markiertes Protein und schließlich unmarkiertes Protein.
- (3) Anionisches Protein mit kationischem Farbstoff: Anionenaustauscher. Erwartet wird doppelt markiertes Protein, dann einfach markiertes Protein und schließlich unmarkiertes Protein.
- (4) Anionisches Protein mit anionischem Farbstoff: Anionenaustauscher. Erwartet wird zuerst das unmarkierte Protein, gefolgt von einfach markiertem Protein und schließlich doppelt markiertes Protein.

Zusätzlich ergeben sich bezüglich der beiden verwendeten Farbstoffe zwei methodische Ansätze der Markierungsreihenfolge. Die Markierung mit Akzeptorfarbstoff und die anschließende Markierung des Proteins mit Donorfarbstoff („Acceptor first“), die zusätzliche präparative Arbeiten für ein einfach Donor markiertes Protein benötigt oder eine Markierung mit Donorfarbstoff und anschließende Markierung mit Akzeptorfarbstoff („Donor first“), bei der eine entsprechende Donorprobe während der Markierung anfällt (Abbildung 24). Die Auswahl der Markierungsreihenfolge ist abhängig von den verwendeten Farbstoffen und dem Trennverhalten der Probe in der Ionenaustauschchromatographie. Für das Farbstoffpaar Alexa 488 und Alexa 647 vereinfacht die erhöhte Ladung des Farbstoffes Alexa 647 die Aufreinigung von einfach markiertem Protein. Für stark ionische Protein wäre in diesem Fall eine Markierung „Acceptor first“ erfolversprechender. Für das hier untersuchte Klenow-Fragment war eine Aufreinigung des einfach Donor markierten Proteins möglich, so dass hier die präparativ weniger aufwändigen Methode „Donor first“ verwendet wurde.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

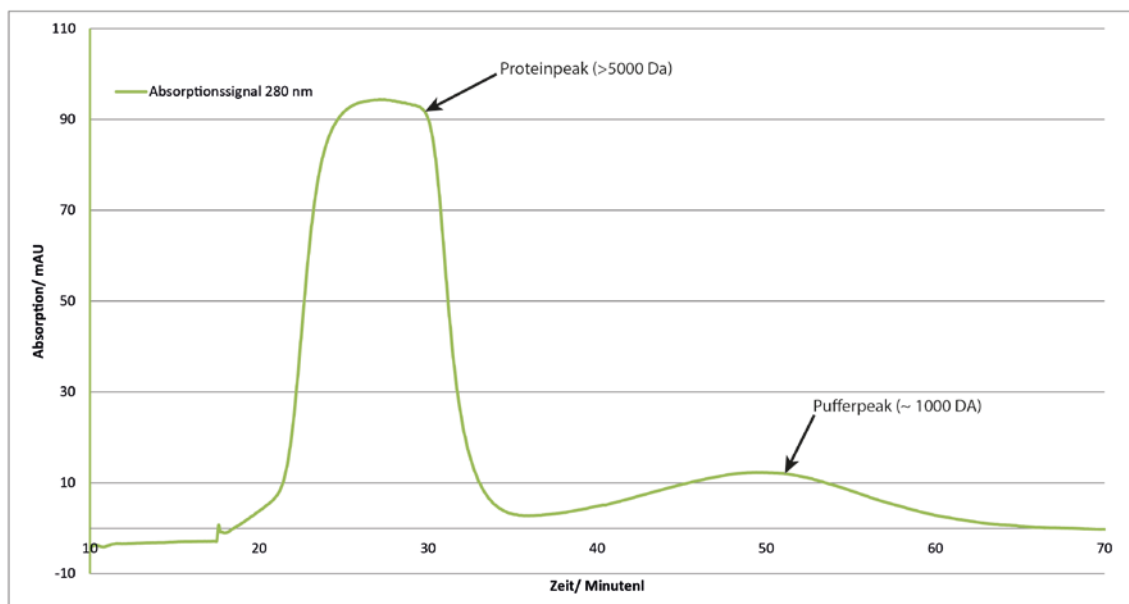


**Abbildung 24: Vergleich der Arbeitsschritte für „Acceptor first“ und „Donor first“.** Das Fließschema zeigt die Arbeitsschritte für beide Markierungsvarianten, ausgehend vom präparierten Protein. Protein/Proben sind blau hinterlegt. Markierungsschritte grün (Donor) oder rot (Akzeptor) hinterlegt. Die chromatographische Trennung der einfach markierten Proben ist lila hervorgehoben. Für „Acceptor first“ werden neben der Doppelmutante mit zwei Cysteinen auch die entsprechenden Einzelmutanten benötigt, um für die FRET-Analyse die Donorfluoreszenzlebensdauer und die Donorfluoreszenzquantenausbeute ermitteln zu können. Im Falle von „Donor first“ kann eine entsprechende Probe während des Arbeitsprozesses entnommen werden, was den präparativen Arbeitsaufwand verringert.

Die verwendeten Farbstoffe wurden mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Im Falle von Varianten, die ein einzelnes Cystein für die Markierungsreaktion enthielten, wurde der Farbstoff mit dem Zielprotein im Verhältnis von 3:1 versetzt und für 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (10000 g, 5 Minuten) und die Protein-Farbstoffmischung über eine Gelfiltrationssäule (GE Desalting 26/10) und Niedrigsalzpuffer (Tabelle 14) mit einer Flussrate von 5 ml/min gereinigt. Das Material der verwendeten Säule hat eine Trennwirkung im Bereich von 1000 bis 5000 Da, so dass sich Moleküle mit einem höheren Molekulargewicht als 5000 Da effizient von Molekülen mit einem Molekulargewicht von  $\leq 1000$  Da trennen lassen. Hierdurch konnte die Proteinfraction von überschüssigem Farbstoff getrennt werden. Die Fraktionssammlung erfolgte manuell in 15 ml Reaktionsgefäßen.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die Proteinfraktion wurde mit Hilfe eines Zentrifugalfilters mit 50 kDa Ausschlussfilter eingeeengt und anschließend mit 50% Glycerol versetzt bei -20° C gelagert. Abbildung 25 zeigt ein typisches Chromatogramm für Trennung von Protein und freiem Farbstoff. Die für FRET-Messungen notwendige Markierung mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte durch sequentielles Markieren des Proteins mit zunächst dem Donor-Farbstoff (Alexa 488) und einer anschließenden Isolierung des einfach markierten Proteins mittel Ionenaustauschchromatographie. Hierzu wurden Farbstoff und Protein im Verhältnis 4:5 gemischt und 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert (10000 g, 5 Minuten) und parallel zur Vorgehensweise für einfach markierte Proteine mittels Gelfiltration von freiem Farbstoff getrennt und in Niedrigsalzpuffer überführt. Das einfach markierte Zielprotein wurden unter der Verwendung einer ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) und einer Ressource Q Anionentauschersäule 6 ml (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 2 ml/min isoliert. Im ersten Schritt erfolgte die Äquilibration der Säule mit ca. 5 Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer. Die Poteinprobe wurde manuell mit Hilfe einer 5 ml Spritze auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurde die Säule mit Niedrigsalzpuffer mit ca. 5 Säulenvolumen gespült.

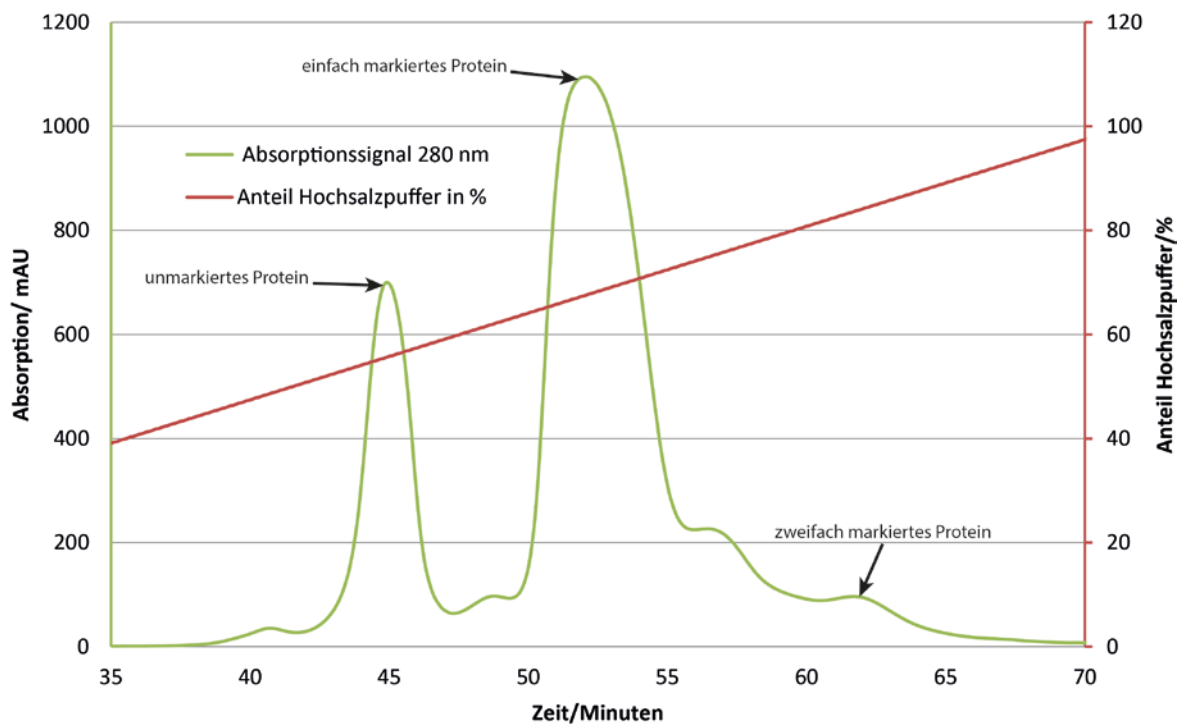


**Abbildung 25: Chromatogramm der Aufreinigung der Variante KF-D548C mittels Gelfiltration des Klenow-Fragmentes nach Donorfarbstoffmarkierung.** Abgebildet ist das Chromatogramm für einen Ausschnitt der Elution. Die Abbildung zeigt das Absorptionssignal bei 280 nm in relativen Einheiten („Arbitrary units“, AU) in grün. Die Peaks für das Protein (Proteinpeak) und für Farbstoff und Puffer (Pufferpeak) sind entsprechend beschriftet.

Die Elution des Proteins erfolgte über einen Gradienten von 0-100 % Hochsalzpuffer und einer automatische Fraktionierung in 4ml Fraktionen über 20 Säulenvolumen.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Aufgrund der negativen Ladung des Farbstoffes wurde unter diesen Bedingungen zunächst das unmarkierte Protein eluiert. Als zweites wurde das gewünschte, einfach markierte Protein eluiert und abschließend zweifach markiertes Protein. Aufgrund des Verhältnisses von Farbstoff zu Protein wurde hauptsächlich unmarkiertes und einfach markiertes Protein erwartet. Der Markierungsgrad der farbigen Fraktionen wurde mittels UV/VIS-Spektrometrie überprüft (4.3.7 Abschätzung des Markierungsgrades) und Fraktionen mit einfach markiertem Protein wurden vereinigt und für die weitere Reaktion mit Akzeptorfarbstoff (Alexa 647) eingesetzt. Das Chromatogramm einer typischen Aufreinigung ist in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Chromatogramm der Aufreinigung der Variante KF-D548C-G743C mittel Ionenaustauschchromatographie des Klenow-Fragmentes nach Donorfarbstoffmarkierung.** Abgebildet ist das Chromatogramm für einen Ausschnitt der Elution. Die Abbildung zeigt das Absorptionssignal bei 280 nm in relativen Einheiten („Arbitrary units“, AU) in grün und die Zusammensetzung des Puffers durch den Anteil des Hochsalzpuffers in % in rot. Die Peaks für unmarkiertes, einfach markiertes und zweifach markiertes Protein sind entsprechend beschriftet.



#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die anschließende Markierung mit dem Akzeptorfarbstoff verlief parallel zur Vorgehensweise für einfach markierte Proteine (siehe oben). Das doppelt markierte Protein wurde mit Hilfe eines Zentrifugalfilters mit 50 kDa Ausschlussfiltern eingeeengt und anschließend mit 50% Glycerol versetzt bei -20° C gelagert. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Proteinvarianten.

**Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Proteinvarianten.** Mutationen sind beschrieben durch die Nennung der ursprünglichen Aminosäure (Einbuchstabencode), der Position in der Aminosäureprimärsequenz und der Nennung der ersetzenden Aminosäure (Einbuchstabencode). A488 und A647 beschreibt den an der jeweiligen Position vorhandenen Farbstoff nach der Markierungsreaktion.

Variante	Beschreibung
<b>KF-D548C-A488</b>	Cystein an Position 548, markiert mit Alexa 488
<b>KF-G743C-A488</b>	Cystein an Position 743, markiert mit Alexa 488
<b>KF-D548C-A488-G743C-A647</b>	Cystein an Position 548, markiert mit Alexa 488 Cystein an Position 743, markiert mit Alexa 647
<b>KF-D548C-A488-G743C-A647-Y766F</b>	Cystein an Position 548, markiert mit Alexa 488 Cystein an Position 743, markiert mit Alexa 647 Phenylalanin an Position 766
<b>KF-D548C-A488-G743C-A647-Y766S</b>	Cystein an Position 548, markiert mit Alexa 488 Cystein an Position 743, markiert mit Alexa 647 Serin an Position 766

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.7 Abschätzung des Markierungsgrades

Zur Überprüfung der Probenqualität wurden nach den Markierungsreaktionen und der darauffolgenden Probenaufreinigung die Markierungsgrade der verwendeten Farbstoffe mittels Absorptionsspektrometrie ermittelt. Hierzu wurden die Konzentrationen der Farbstoffe und des Proteins bestimmt und der Markierungsgrad der einzelnen Farbstoffe als auch das Farbstoffverhältnis berechnet. Die Berechnung der Konzentrationen der Farbstoffe und des Proteins erfolgte durch Umformung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  und der Schichtdicke  $d$  (Formel 31 und Formel 32). Hierbei ist zu beachten, dass sich die Absorptionsspektren der verwendeten Farbstoffe und des Proteins überlappen und die für die Konzentrationsberechnung verwendeten Absorptionen korrigiert werden müssen. Die für die Farbstoffe und jeweiligen Proteinvarianten verwendeten Parameter sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die Extinktionskoeffizienten der unterschiedlichen Proteinvarianten wurden anhand der Aminosäureprimärsequenz berechnet (Gasteiger et al. 2005).

Tabelle 16: Verwendete Extinktionskoeffizienten zur Berechnung der Markierungsgrade

Variante	$\epsilon_{\text{Protein}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{A488}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{A647}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
<b>KF-D548C-G743C</b>	58790	73000	250000
<b>KF-D548C-G743C-Y766F</b>	57300	73000	250000
<b>KF-D548C-G743C-Y766S</b>	57300	73000	250000

Für die Berechnung der Proteinkonzentration eines doppeltmarkierten Proteins in der Messküvette ergibt sich allgemein:

$$c_{\text{Protein}} = (Abs_{280} - [((Abs_{494} - Abs_{651} * cf_{A,494}) * cf_{D,280}) + (Abs_{651} * cf_{A,280})]) * \frac{1}{\epsilon_{\text{Protein}} * d} \quad \text{Formel 30}$$

mit den Absorptionswerten der indizierten Wellenlängen (Donorfarbstoff: 494 nm, Akzeptorfarbstoff: 651 nm, Protein: 280 nm) und den entsprechenden Korrekturfaktoren ( $cf_{D,280}$ : Korrekturfaktor Donorfarbstoff für 280 nm,  $cf_{A,280}$ : Korrekturfaktor Akzeptorfarbstoff für 280 nm,  $cf_{A,494}$ : Korrekturfaktor Akzeptorfarbstoff für 494 nm, siehe 3.3 Cysteinreaktive Fluoreszenzfarbstoffe). Die Konzentrationen der Farbstoffe berechnen sich entsprechend:

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

$$c_{Donor(A488)} = \frac{(Abs_{494} - Abs_{651} * cf_{A,494})}{\epsilon_D * d}$$

Formel 31

$$c_{Akzeptor(A647)} = \frac{Abs_{651}}{\epsilon_A * d}$$

Formel 32

Der für die Markierung verwendete Akzeptorfarbstoff Alexa 647 zeigt darüber hinaus nur eine geringe Absorption bei 494 nm, so dass sich Formel 31 wie folgt vereinfachen lässt:

$$c_{Donor(A488)} \approx \frac{Abs_{494}}{\epsilon_D * d}$$

Formel 33

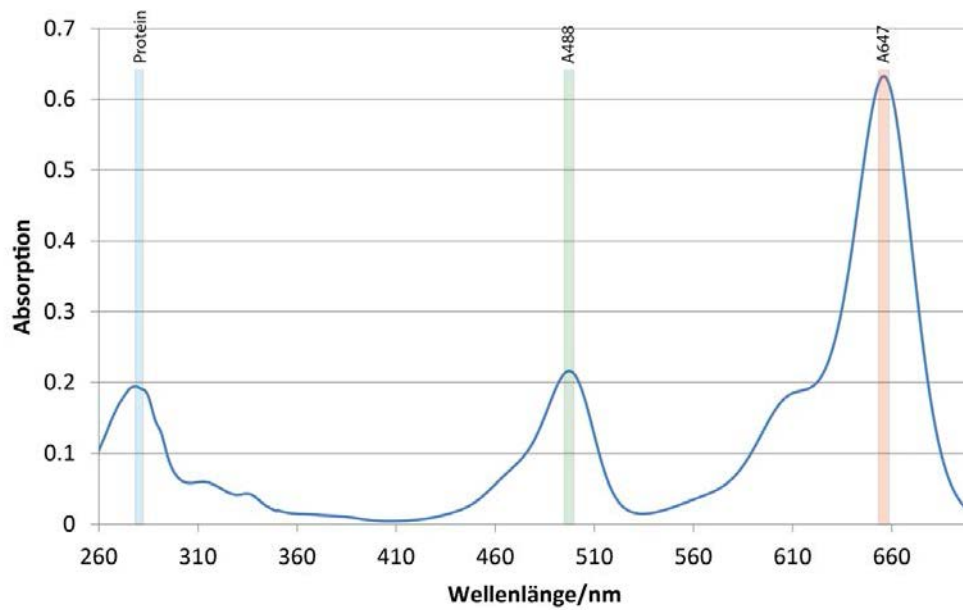
Somit gilt annäherungsweise für die Berechnung der Proteinkonzentration:

$$c_{Protein} \approx (Abs_{280} - [(Abs_{494} * cf_{D,280}) + (Abs_{651} * cf_{A,280})]) * \frac{1}{\epsilon_{Protein} * d}$$

Formel 34

Die zu vermessenden Proben wurden individuell mit Lysispuffer verdünnt, so dass die maximale Absorption im Bereich zwischen 0.1 und 0.8 lag. Die Messung der Absorption erfolgte in Quarzküvetten (Hellma). Es wurden Spektren von 250-700 nm Wellenlänge im Zweistrahlmodus mit Basislinienkorrektur, einer Schrittweite von 0.2 nm und einer Integrationszeit von 0.5 s gemessen (Cary 4000 Bio Spectrophotometer). Abbildung 27 zeigt das Absorptionsspektrum der doppelt markierten Proteinvariante KF-D548C-G743C-Y766F.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 27: Absorptionsspektrum der doppelt markierten Variante KF-D548C-G743C-Y766F.** Dargestellt ist das Absorptionsspektrum im Bereich von 260 nm bis 700 nm Wellenlänge. Die Absorption des Proteins bei 280 nm sowie der Farbstoffe (A488 und A647) im jeweiligen Maximum sind farblich hervorgehoben.

Für das in Abbildung 27 gezeigte Beispiel ergab sich für die zu berechnenden Markierungsgrade:

$$\begin{aligned} \text{Markierungsgrad}_{\text{Donor}} &= \frac{c_{\text{Donor}}}{c_{\text{Protein}}} \\ &= \frac{0.216}{71000 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]} \\ &= \frac{1}{(0.192 - [(0.216 * 0.11) + (0.631 * 0.03)]) * 57300 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]} \\ &= 1.13 \end{aligned}$$

Formel 35

$$\begin{aligned} \text{Markierungsgrad}_{\text{Akzeptor}} &= \frac{c_{\text{Akzeptor}}}{c_{\text{Protein}}} \\ &= \frac{0.631}{239000 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]} \\ &= \frac{1}{(0.192 - [(0.216 * 0.11) + (0.631 * 0.03)]) * 57300 [M^{-1} \text{cm}^{-1}] * 1 [\text{cm}]} \\ &= 1.01 \end{aligned}$$

Formel 36

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Für die Einzelvarianten konnte der Markierungsgrad max. bei 100% und für die Doppelvarianten bei max. 200 % liegen. Es handelt sich jedoch hierbei um eine Abschätzung des Markierungsgrades, da die Eigenschaften der Farbstoffe abhängig sind von der direkten Umgebung. An Protein gebundene Farbstoffe können hinsichtlich ihres Absorptionsmaximums und des Extinktionskoeffizienten von den Herstellerangaben abweichen. Zur Berechnung des Markierungsgrades wurde näherungsweise mit der Absorption im vom Hersteller angegeben Absorptionsmaximum und dem dazugehörigen Extinktionskoeffizienten gerechnet. Der Absorptionskoeffizient des Proteins bei 280 nm Wellenlänge wurde mittels entsprechender Software ermittelt (ProtParam (Gasteiger et al. 2005)). Die Abschätzung des Markierungsgrades liefert somit eine Aussage darüber, ob sowohl ein Donor- als auch ein Akzeptormolekül an das Protein gekoppelt wurde. zeigt die Ergebnisse der Markierungsgrade für die verwendeten FRET-Varianten des Klenow-Fragmentes. In allen Fällen konnten hohe Markierungsgrade nahe 100 % für sowohl den Donorfarbstoff als auch den Akzeptorfarbstoff realisiert werden.

**Tabelle 17: Ergebnisse der Bestimmung des Markierungsgrades.**

<b>Variante</b>	<b>DOL<sub>D</sub></b>	<b>DOL<sub>A</sub></b>	<b>Donor/Akzeptor</b>
<b>KF-D548C-G743C</b>	0.96	1.13	0.85
<b>KF-D548C-G743C-Y766F</b>	1.13	1.01	1.12
<b>KF-D548C-G743C-Y766S</b>	0.92	0.82	1.12

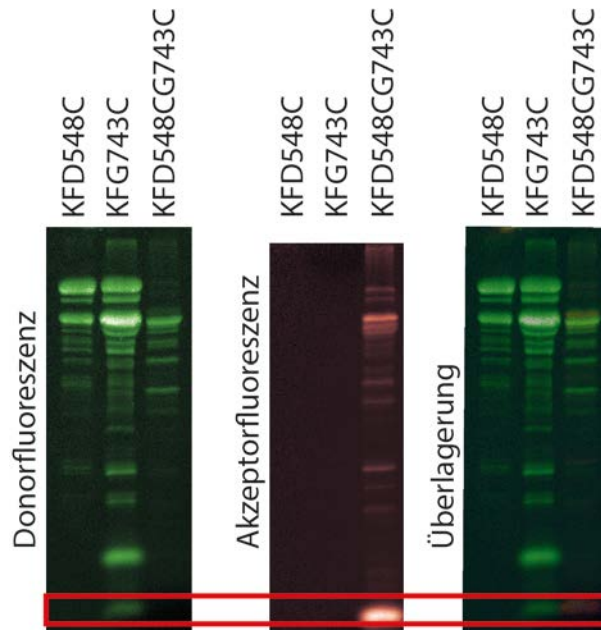
## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.8 Bestimmung der Farbstoffposition für den Donor- und Akzeptorfarbstoff

Um einen Einfluss der Farbstoffposition auf die Fluoreszenzspektroskopischen Messungen diskutieren zu können, muss bekannt sein, an welcher Position im Protein sich welcher Farbstoff befindet. Für das selektive Markieren von Proteinen durch unterschiedliche, reaktive Gruppen, wie zum Beispiel die Kombination aus unnatürlichen Aminosäuren (Xie et al. 2005; Loscha et al. 2012) und Cysteinen, ist die Position der Farbstoffe bereits festgelegt. Im Falle der für das Klenow-Fragment verwendeten Markierungsstrategie mit zwei Cysteinen erfolgte die Bestimmung der Farbstoffposition nach der Markierung. Das markierte Protein wurde dazu enzymatisch verdaut und die entstehenden Fragmente mittels SDS-PAGE analysiert und mit Proben der auf gleiche Art und Weise verdauten Einzelcysteinvarianten verglichen. Anhand eines Fluoreszenzbildes des Gels ließ sich die Position des Farbstoffes zuweisen. Für den enzymatischen verdau wurde Trypsin gewählt, da es ein Vielzahl von Schnittstellen innerhalb der Aminosäuresequenz besitzt.

Hierzu wurden 200 µl der entsprechenden Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL mit 0.005 mg/ml Trypsin für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und das enzymatisch verdaute Protein mittels SDS-PAGE analysiert (siehe 4.3.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)). Hierbei wurde das Gel abweichend vom beschriebenen Vorgehen vor der Färbung mittels Coomassie-Lösung fixiert (15 Minuten in 10 % v/v Essigsäure, 40 % v/v Ethanol, 50 % v/v Wasser) und Bilder der fluoreszierenden Banden mittels einer Geldetektionsanlage (Stella, Raytest) erstellt. Um eine Bande eindeutig einer Farbstoffposition zuzuordnen zu können, wurden neben der Variante KF-D548C-G743C die entsprechenden, enzymatischen Spaltprodukte der donormarkierten Varianten KF-D548C und KF-G743C auf das Gel aufgetragen. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der Gelanalyse.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 28: Ergebnis der Bestimmung der Farbstoffposition mittel enzymatischer Spaltung und SDS-PAGE.** Dargestellt sind die Aufnahme der Donorfluoreszenz, der Akzeptorfluoreszenz und eine erstellte Überlagerung der beiden Aufnahmen. Aufgetragen wurden die donormarkierten Varianten KF-D548C und KF-G743C sowie die FRET-Variante KF-D548C-G743C. Zu erkennen ist die Komplexität des Bandenmusters, welches aus der Vielzahl der potentiellen Schnittstellen für das Enzym Trypsin innerhalb der Primärsequenz des Klenow-Fragments resultiert. In rot hervorgehoben ist die Indikatorbande, die dem Akzeptorfarbstoff in der FRET-Variante die Position des Donors in der Variante KF-G743C zuweist.

Anhand des enzymatischen Verdau konnte dem Akzeptorfarbstoff nach der erfolgten Markierung die Position C743 zugewiesen werden. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass es eine bevorzugte Position der jeweiligen Farbstoffe gibt. Mögliche Ursachen hierfür sind eine generell unterschiedliche Reaktivität der beiden Cysteine aufgrund der lokalen Proteinumgebung oder aber ein farbstoffspezifischer Unterschied der Reaktivität aufgrund von Wechselwirkungen der Farbstoffe mit der lokalen Proteinumgebung. Die genaue Ursache für die selektive Markierung wurde nicht weitergehend im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.9 Bestimmung der Nukleotidaffinität und DNA-Affinität von markiertem Protein

Die Einführung von Cysteinen an den Positionen 548 und 743 in der Aminosäuresequenz führt zu keiner Beeinträchtigung der Enzymaktivität (Santoso et al. 2010). Um einen Einfluss der für die Markierung verwendeten Farbstoffe auf die Enzymfunktion auszuschließen, wurde die Affinität des markierten Enzyms (Variante KF-D548C-A488-G743C-A647) zu den vier Nukleotiden Desoxyadenosintri-phosphat (dATP), Desoxyguanosintri-phosphat (dGTP), Desoxycytidintri-phosphat (dCTP) und Desoxythymidintri-phosphat (dTTP), sowie doppelsträngiger DNA mittels FRET-basierter Titrationen bestimmt und mit bereits veröffentlichten Ergebnissen verglichen. Hierzu wurde eine FRET-markierte Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 50 nmol/l (Nukleotide) bzw. 200 pmol/l (DNA) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nukleotid bzw. DNA versetzt, gemischt und ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen (Fluoromax 4; Anregungswellenlänge: 485 nm; Schlitzbreite Anregung: 3 nm (Nukleotide) bzw. 12 nm (DNA); Emissionswellenlänge: 500 nm – 750 nm; Schlitzbreite Emission: 5 nm (Nukleotide) bzw. 12 nm (DNA)). Zuvor wurde ein Hintergrundspektrum des verwendeten Puffers (50 mM Tris/HCL, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen und automatisiert von jeder weiteren Messung abgezogen. Die gemessenen Spektren wurden anhand gerätespezifischer Korrekturfaktoren (automatisierter Prozess innerhalb der Datenverarbeitung des Gerätes) und einem parallel gemessenen Lampenspektrum korrigiert. Für jede eingesetzte Nukleotidkonzentration wurde aus dem erhaltenen Spektrum die apparente Transfereffizienz („proximity factor“, PF) berechnet, indem der Quotient aus integriertem Akzeptorsignal von 630 nm bis 750 nm und integriertem Gesamtsignal gebildet wurde. Der berechnete proximity factor wurde gegen die jeweilige Nukleotidkonzentration/DNA-Konzentration aufgetragen und der Datensatz mit der Bindungsisothermen für die spezifische Bindung eines Liganden an einer Bindestelle plus unspezifischer Bindung (Formel 37) in der Software OriginPro, Version 8.6, angepasst.

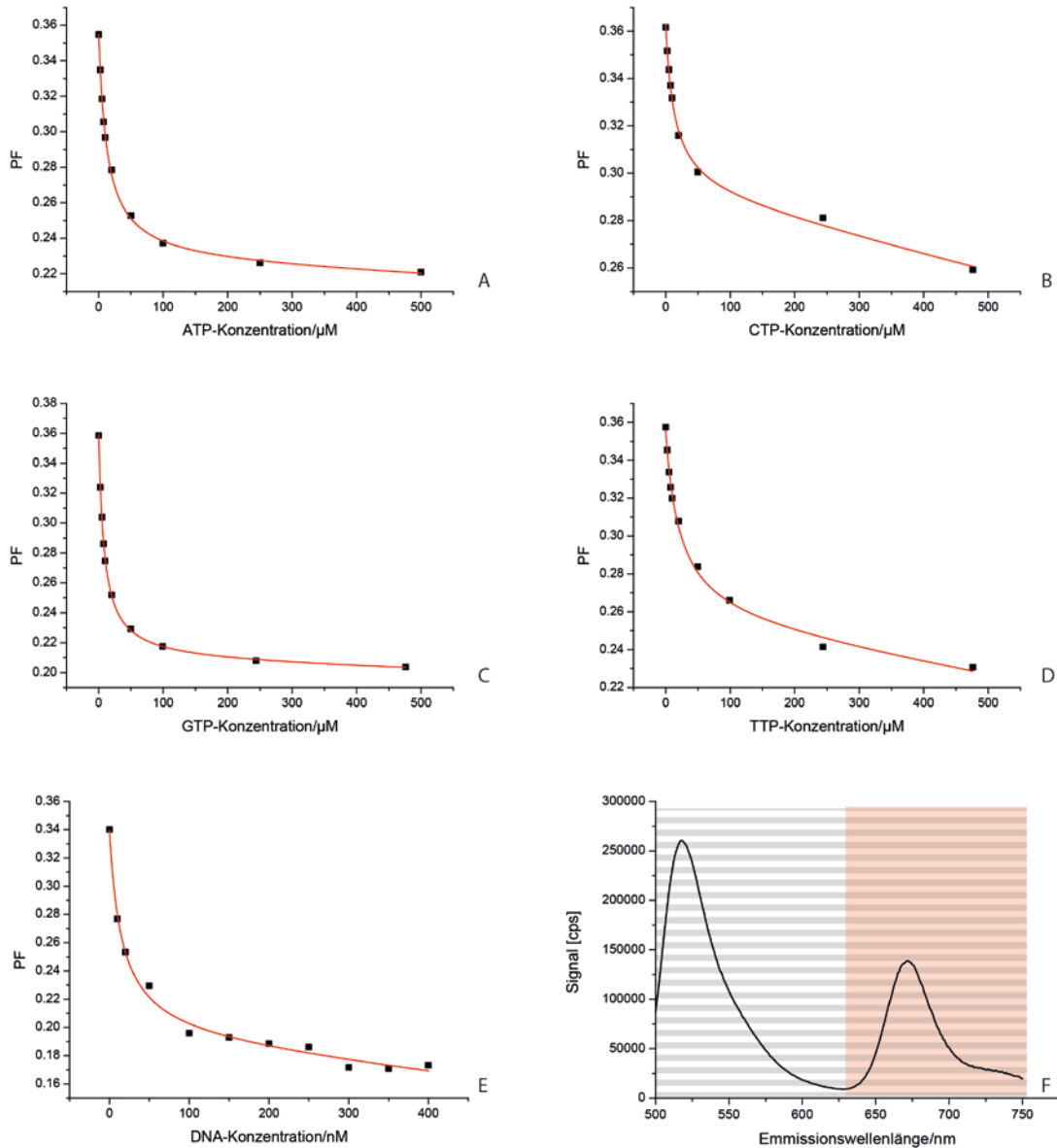
$$Y = \frac{[L]}{K_D * [L]} + a * [L]$$

Formel 37



## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Y beschreibt den Grad der Sättigung, bezogen auf vollständige Sättigung (hier der Messpunkt bei maximaler Ligandenkonzentration), [L] die Ligandenkonzentration,  $K_D$  die Dissoziationskonstante und a beschreibt die Konstante für die unspezifische Bindung. Die Titrationskurven sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Ergebnisse mit den jeweiligen Standardfehlern sind in Tabelle 18 zusammengefasst.



**Abbildung 29: Titrationskurven der Nucleotid- und DNA-Affinitätsbestimmung.** Dargestellt sind die Titrationskurven für die vier Nucleosidtriphosphate (A-D) sowie für doppelsträngige DNA (E). Aufgetragen ist jeweils die apparente Transfereffizienz (Proximity factor, PF) gegen die Ligandenkonzentration. In rot ist die jeweilige Anpassung der Modellfunktion (siehe Formel 37) dargestellt. Teilabbildung F zeigt beispielhaft ein Emissionsspektrum. Grau schraffiert stellt den Teil des Spektrums dar, der für die Berechnung der Gesamtfluoreszenz verwendet wurde, In rot ist die Akzeptorfluoreszenz hervorgehoben.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

**Tabelle 18: Ergebnisse der Affinitätsbestimmung für die verwendeten Nucleotide und das verwendete DNA-Substrat.** Aufgelistet sind die jeweilige Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) mit dem dazugehörige Standardfehler ( $\sigma_n[K_D]$ ), die Konstante für unspezifische Bindung ( $\alpha$ ) mit dem dazugehörigen Standardfehler ( $\sigma_n[\alpha]$ ) und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ).

Substrat	$K_D$	$\sigma_n[K_D]$	$\alpha$	$\sigma_n[\alpha]$	$R^2$
<b>ATP</b>	13.11 $\mu\text{M}$	0.87 $\mu\text{M}$	$1.2 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$	$5.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$	0.99
<b>GTP</b>	8.38 $\mu\text{M}$	0.29 $\mu\text{M}$	$8.6 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$	$2.9 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$	0.99
<b>TTP</b>	21.53 $\mu\text{M}$	4.19 $\mu\text{M}$	$5.8 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$	$1.9 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$	0.99
<b>CTP</b>	13.17 $\mu\text{M}$	2.21 $\mu\text{M}$	$9.3 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$	$1.9 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$	0.99
<b>DNA</b>	15.61 nM	2.99 nM	$4.1 \cdot 10^{-4} \text{nM}$	$1.9 \cdot 10^{-4} \text{nM}$	0.99

Die gemessenen Dissoziationskonstanten liegen für Nucleotide im niedrigen mikromolaren Bereich und für DNA-Substrat im niedrigen nanomolaren Bereich und sind vergleichbar mit bereits veröffentlichten Ergebnissen ((Johnson 2008)dNTP: 28  $\mu\text{M}$ ), so dass ein signifikanter Einfluss der Farbstoffe auf die Substratbindung und damit indirekt auf die Funktion der Polymerase ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren führt die Bindung eines Nucleotids bzw. des DNA-Substrates zu einer verminderten Transfereffizienz, was übertragen auf die Informationen aus den Kristallstrukturen einem vergrößerten Abstand zwischen den beiden markierten Domänen entspricht und somit einer Öffnung des Enzym gleichkommt.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.10 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung im Molekülensemble (eTCSPC)

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern sowohl des Donorfarbstoffes (Alexa 488) als auch des Akzeptorfarbstoffes (Alexa 647) wurde mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung im Molekülensemble (ensemble time-correlated single photon counting, eTCSPC) an einem IBH-5000U System (IBH, Schottland) durchgeführt. Um den jeweiligen Donor- bzw. Akzeptorfarbstoff anzuregen, wurden zwei verschiedene, mit Lichtleitern eingekoppelte Diodenlaser (Picoquant, Berlin) als Lichtquelle verwendet (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Verwendete Laserlichtquellen und Wellenlängen für eTCSPC-Experimente**

Farbstoffe	Anregung	Emission	Laser	Pulsfrequenz
<b>Donor (Alexa 488)</b>	470 nm	520 nm	LDH-P-C 470	8 MHz
<b>Akzeptor (Alexa 647)</b>	635 nm	665 nm	LDH-8-1 126	10 MHz

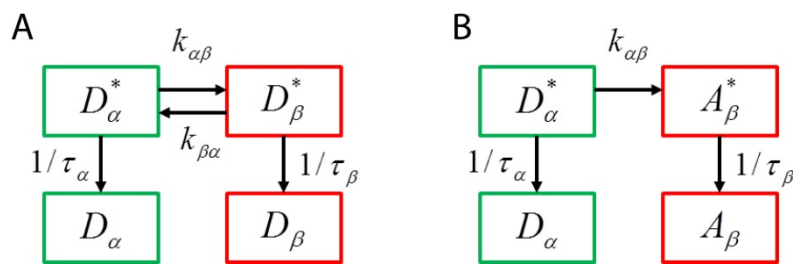
Das IBH-5000U System besteht u.a. aus zwei Monochromatoren und Polarisatoren, die sich jeweils anregungs- und detektionsseitig befinden. Die korrespondierenden Spaltbreiten der Monochromatoren wurden auf 2 nm (Anregung) bzw. auf 16 nm (Detektion) und die Polarisatoren auf 0° (Anregung) und 54.7° (Detektion) eingestellt. Der „magische Winkel“ von 54.7° dient der Vermeidung von polarisationsbedingten Artefakten, um so das bereinigte Abklingen der Fluoreszenz zu bestimmen (Lakowicz 1999 ). Zusätzlich wurden zwei Kantenfilter eingesetzt (Donoranregung, >480 nm; Akzeptoranregung, >640 nm) um den Streulichtanteil zu minimieren. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Proben werden durch einen Laserpuls angeregt und das Abklingen der Fluoreszenz auf einer Zeitachse in  $i$  Kanälen endlicher Breite (0.0141 ns / Kanal) detektiert bzw. aufgetragen. Hieraus entsteht ein Fluoreszenzzerfallshistogramm mit exponentiellen Abklingkurven. Die Messungen wurden gestoppt, sobald die Anzahl der gezählten Photonen in einem Kanal 100000 betrug.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

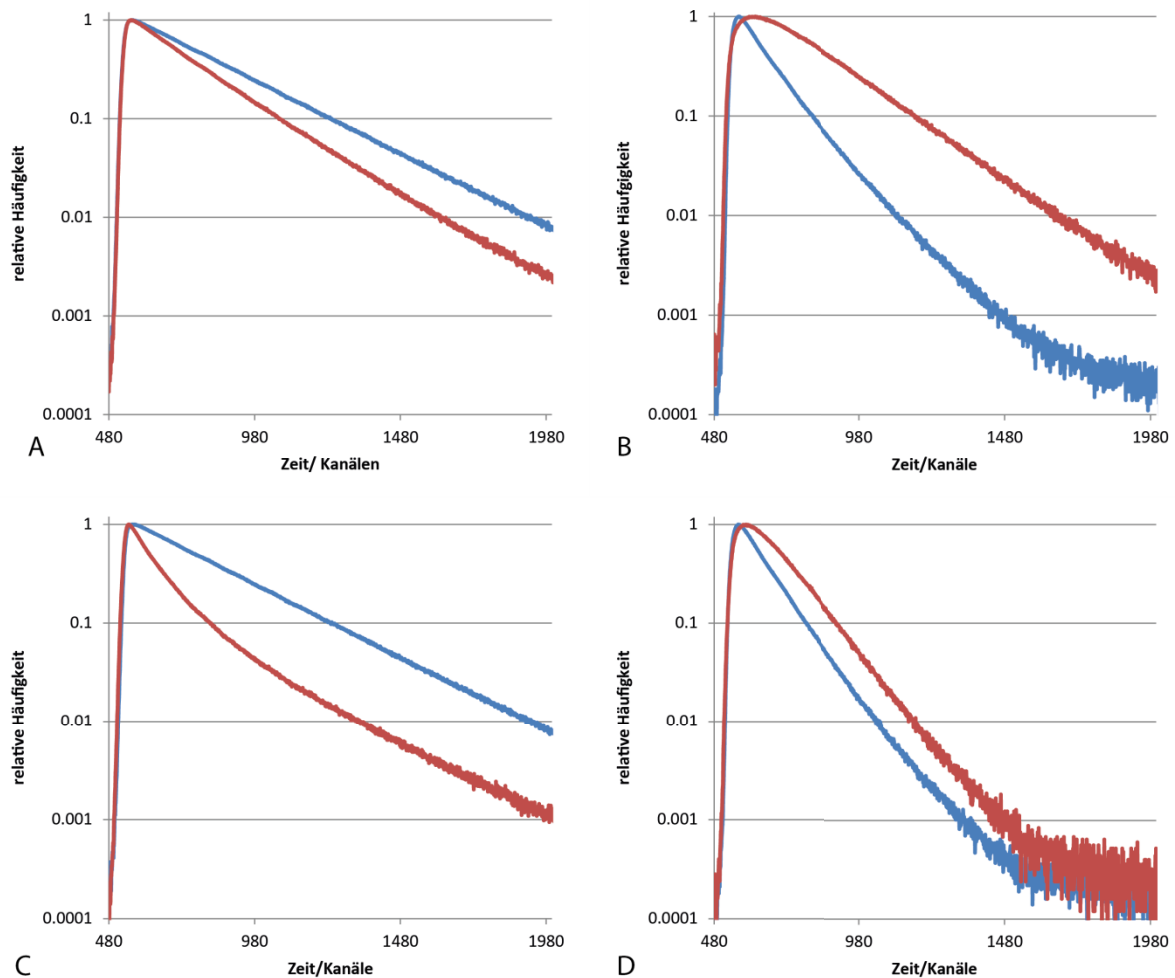
### 4.3.10.1 Datenauswertung

Die Theorie des Energietransfer zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen wurde bereits detailliert in der Literatur beschrieben (Isaksson et al. 2004; Kalinin et al. 2004). Im Falle eines Farbstoffpaares mit ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften (im einfachsten Fall ein Farbstoffpaar aus identischen Farbstoffmolekülen, was auch als Homo-FRET bezeichnet wird) kann die Energie bidirektional zwischen den beiden Farbstoffen übertragen werden (Abbildung 30 Teilabbildung A), was durch die beiden Transferraten  $k_{\alpha\beta}$  und  $k_{\beta\alpha}$  beschrieben wird. Die Auswirkung des Energietransfers auf das zeitabhängige Fluoreszenzsignal wird in Abbildung 31 veranschaulicht.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung der kinetischen Zusammenhänge zwischen Fluoreszenzlebensdauer und Energietransfer.** Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema, das die Zusammenhänge veranschaulicht. In Teilabbildung A ist der allgemeine Fall eines möglichen Energietransfers zwischen zwei Farbstoffen ( $D_\alpha$  und  $D_\beta$ ) mit einem möglichen bidirektionalen Energietransfer ( $k_{\alpha\beta}$  und  $k_{\beta\alpha}$ ) zwischen den beiden angeregten Zuständen ( $D_\alpha^*$  und  $D_\beta^*$ ) gezeigt, während Teilabbildung B den vereinfachten Fall eines monodirektionalen Energietransfers zwischen einem Donorfarbstoff (D) und einem Akzeptorfarbstoff (A) veranschaulicht, wie er für das verwendete Farbstoffpaar Alexa 488 und Alexa 647 angenommen werden kann. Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Isaksson et al. 2004).

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 31: Auswirkungen des Energietransfers (rot) auf das zeitabhängige Fluoreszenzsignal des Donor- und Akzeptorfarbstoffes im Vergleich zu reinem Donorfarbstoff bzw. Akzeptorfarbstoffdirektanregung (blau).** Dargestellt sind normierte Beispielkurven von eTCSPC-Messungen mit doppelsträngiger DNA. Eine niedrige Transferrate führt zu einem minimal schneller abfallenden Fluoreszenzsignal des Donors (Teilabbildung A), während die Anregung des Akzeptors durch den Donorfarbstoff im Vergleich zur Direktanregung zu einem deutlich verzögerten Signalabfall führt (Teilabbildung B). Für eine hohe Transferrate verhält es sich entsprechend umgekehrt mit einem deutlich schnelleren Zerfall der Donorfluoreszenz (Teilabbildung C) und einem nur minimal langsameren Zerfall des Akzeptorsignals (Teilabbildung D). Die x-Achse ist in aufsteigender Kanalnummer mit einer Kanalbreite von 14,1 ps gegliedert.

Die jeweiligen Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Farbstoffe werden durch  $\tau_\alpha$  und  $\tau_\beta$  beschrieben. Die messbare Abklingkurve der Fluoreszenz lässt sich dann beschreiben als:

$$F_{\alpha\beta}(t) = p_{ex}^t C_1 p_{em} \exp(\lambda_1 t) + p_{ex}^t C_2 p_{em} \exp(\lambda_2 t)$$

Formel 38

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Mit den Koeffizienten  $\lambda_{1,2}$ :

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left[ -\tau_{\alpha}^{-1} - \tau_{\beta}^{-1} - k_{\alpha\beta} - k_{\beta\alpha} \pm \sqrt{(\tau_{\alpha}^{-1} - \tau_{\beta}^{-1} + k_{\alpha\beta} - k_{\beta\alpha})^2 + 4k_{\alpha\beta}k_{\beta\alpha}} \right]$$

Formel 39

Die Matrices  $C_{1,2}$  lassen sich beschreiben durch:

$$C_{1,2} = \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \begin{bmatrix} \mp \lambda_{2,1} \mp 1/\tau_{\alpha} \mp k_{\alpha\beta} & \pm k_{\alpha\beta} \\ \pm k_{\beta\alpha} & \mp \lambda_{2,1} \mp 1/\tau_{\beta} \mp k_{\beta\alpha} \end{bmatrix}$$

Formel 40

Die Vektoren  $p_{ex}$  und  $p_{em}$  beschreiben die Anregungs- und Emissionswahrscheinlichkeit der Farbstoffe.

$$p_{ex} = \begin{pmatrix} p_{ex}^{\alpha} \\ p_{ex}^{\beta} \end{pmatrix} \text{ and } p_{em} = \begin{pmatrix} p_{em}^{\alpha} \\ p_{em}^{\beta} \end{pmatrix}$$

Formel 41

Die abgeleiteten Gleichungen beziehen sich dabei auf ein monoexponentiell abklingendes Fluoreszenzsignal. Die meisten Farbstoffe zeigen jedoch multiexponentielles Verhalten mit mehreren Fluoreszenzlebensdauern  $\tau^i$  und entsprechenden Speziesanteilen  $x$ .

$$F_{\alpha(0)} = \sum_i x_{\alpha}^i \exp(-t/\tau_{\alpha}^i)$$

Formel 42

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

$$F_{\beta(0)} = \sum_i x_{\beta}^i \exp(-t / \tau_{\beta}^i)$$

Formel 43

Für ein gekoppeltes System aus zwei Farbstoffen  $\alpha$  und  $\beta$  gilt somit

$$F_{\alpha\beta} = \sum_{i,j} x_{\alpha}^i x_{\beta}^j F_{\alpha\beta}(t, \tau_{\alpha}^i \tau_{\beta}^j)$$

Formel 44

Im vorliegenden Fall von FRET mit Donor (Alexa 488) und Akzeptor (Alexa 647) ist die Anregung des Donorfarbstoffes durch den Akzeptorfarbstoff nicht möglich und die entsprechende Übertragungsrate ist gleich null. Das kinetische Schema reduziert sich in diesem Fall (siehe Abbildung 30 Teilabbildung B). Für den Zerfall des angeregten Zustandes des Donorfarbstoffes ergeben sich für die zu Grunde liegenden Wahrscheinlichkeitsvektoren:

$$p_{ex} = \begin{pmatrix} p_{ex}^{\alpha} \\ p_{ex}^{\beta} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \text{ and } p_{em} = \begin{pmatrix} p_{em}^{\alpha} \\ p_{em}^{\beta} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} p_{em}^{\alpha} \\ 0 \end{pmatrix}$$

Formel 45

Und für den Zerfall schließlich:

$$F_{\alpha}(t) = \sum_i x_{\alpha}^i \exp(-t [1 / \tau_{\alpha}^i + k_{\alpha\beta}])$$

Formel 46

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Mit Hilfe der von Förster aufgestellten Beziehung zwischen Transfereffizienz und Farbstoffabstand:  $k_{\alpha\beta} = 3/2 \langle \kappa^2 \rangle \tau^{-1} (R_0 / R_{\alpha\beta})^6$  ( $\langle \kappa^2 \rangle$  beschreibt den gemittelten Orientierungsfaktor der Farbstoffe zueinander) lassen sich die Fluoreszenzlebensdauern durch entsprechende Abstandsverteilungen  $p(R_{\alpha\beta})$  ersetzen:

$$F_{\alpha}(t) = \sum_i x_{\alpha}^i \int_{R_{\alpha\beta}} p(R_{\alpha\beta}) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\alpha}^i} \left[1 + (R_0 / R_{\alpha\beta})^6\right]\right) dR_{\alpha\beta}$$

Formel 47

Unter der Annahme von normalverteilten Abständen ergibt sich schließlich:

$$F_{\alpha}(t) = \sum_i x_D^{(i)} \int_{R_{\alpha\beta}} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{\alpha\beta}} \exp\left(-\frac{(R_{\alpha\beta} - \langle R_{\alpha\beta} \rangle)^2}{2\sigma_{\alpha\beta}^2}\right) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\alpha}^{(i)}} \left[1 + (R_0 / R_{\alpha\beta})^6\right]\right) dR_{\alpha\beta}$$

Formel 48

Neben der Messung der FRET-markierten Proteinprobe wurde auch eine Donor-markierte Probe, die während der Markierung des Proteins nach erfolgter Ionenaustauschchromatographie gewonnen wurde, vermessen. Durch die direkte Akzeptoranregung der FRET-markierten Probe wurde der Zerfall des Akzeptorfarbstoffes bestimmt. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Messungen und der vor jeder Messung erfolgten Aufnahme der Geräteantwortfunktion („Instrument response function“, IRF) mittels einer konzentrierten Ludox-Lösung sowie einer Weißlichtmessung zur Korrektur von nichtlinearem Verhalten des Detektionssystems wurden schließlich die Fluoreszenzzerfälle der FRET-Proben nach Formel 48 analysiert.

Als Qualitätsparameter für die verwendeten Modellfunktionen wurden sowohl die gewichteten Residuen als auch das reduzierte Chi<sup>2</sup> ( $\chi_r^2$ ) herangezogen. Die Berechnung der entsprechenden Qualitätsparameter erfolgte nach Formel 49 und Formel 50.



#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

$$\text{g. res.} = \frac{\text{Model} - \text{Daten}}{\sqrt{\text{Signal} - \text{Hintergrund}}}$$

Formel 49

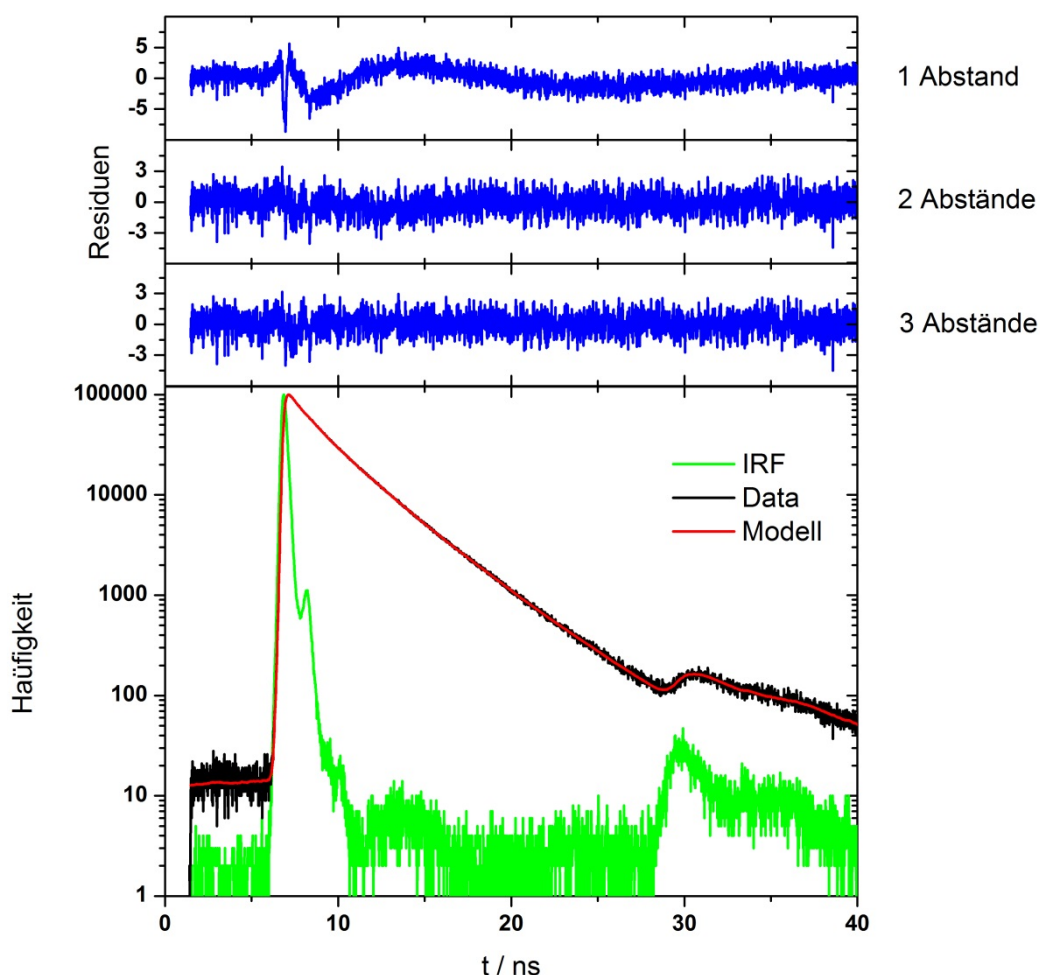
$$\chi_r^2 = \sum \frac{\left( \frac{\text{Model} - \text{Daten}}{\sqrt{\text{Signal} - \text{Hintergrund}}} \right)^2}{\text{Freiheitsgrade}}$$

Formel 50

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.10.2 Selektion der Modellfunktion für eTCSPC-Analysen

Ausgangspunkt der Analyse waren Messungen der Variante KF-D548C-A488-G743C-A647 in Messpuffer (50 mM Tris, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). In der Datenauswertung wurde der Signalzerfall unter der Annahme von 2 Abständen und 3 Abständen inklusive einem Anteil für freien Donorfarbstoff angepasst. Zusätzlich wurde das für die normalverteilten Abstände angenommene  $\sigma$  jeweils auf den Erfahrungswert von 6 Å fixiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse für die jeweiligen Modellfunktionen sind in Abbildung 32 dargestellt. Anhand der gewichteten Residuen sowie dem der Anpassung der Modellfunktion an den Datensatz folgendem reduzierten Chi<sup>2</sup> lässt sich die Qualität der Modellfunktion beurteilen (Tabelle 20).



**Abbildung 32:** Ergebnisse der eTCSPC-Experimente für die Messung der Variante KF-D548C-A488-G743C-A647 in Messpuffer. Die abgebildeten Residuen sind entsprechend skaliert. Der obere Teil der Abbildung zeigt die gewichteten Residuen der Modellfunktionen für einen, zwei und drei Abstände mit einem  $\sigma$  von 6 Å. Im unteren Teil ist der zugehörige Fluoreszenzzerfall mit Geräteantwortfunktion (IRF) und angepasster Modellfunktion dargestellt.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Tabelle 20: Ergebnisse der unterschiedlichen Modelle (1 Abstand: 1R, zwei Abstände: 2R, drei Abstände: 3R) des eTCSPC Datensatz der Variante KF-D548C-A488-G743C-A647.

Modell	R 1/Å (Anteil)	R 2/Å (Anteil)	R 3/Å (Anteil)	$\sigma/\text{Å}$	$\chi_r^2$	Donor Anteil
<b>1 R</b>	52.2 (1)	-	-	6	1.80	0.23
<b>2 R</b>	57.5 (0.64)	42.3 (0.36)	-	6	1.07	0.15
<b>3 R</b>	68.3 (0.28)	52.5 (0.48)	39.2 (0.24)	6	1.02	0.08

Man erkennt im Falle von 2 Abständen) eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Datensatz anhand der Residuen sowie dem erreichten  $\chi^2$ . Die Modellfunktion mit drei Abständen zeigt für die Anpassung ebenfalls eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den Experimentellen Daten anhand der Residuen und des reduzierten  $\chi^2$ . Die Annahme von drei Abständen ist durch die größere Übereinstimmung der Modellfunktion mit dem Datensatz aufgrund der Residuen sowie dem  $\chi^2$  in Verbindung mit der hohen Anzahl an Datenpunkten und den damit verbundenen Freiheitsgraden gerechtfertigt (siehe 4.3.10.5 Fehlerabschätzung in der eTCSPC-Analyse).

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.10.3 Ergebnisse der eTCSPC-Experimente Einzelanpassung

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für die Analyse der eTCSPC-Daten durchgehend eine Modellfunktion mit drei Abständen, freiem Farbstoff und fixiertem  $\sigma$  (6 Å) verwendet (siehe 4.3.10.2 Selektion der Modellfunktion für eTCSPC-Analysen). Vermessen wurden die Varianten KF-D548C-A488-G743C-A647 (**Wildtyp**) sowie die Varianten KF-D548C-A488-G743C-A647-Y766S (**Y766S**) und KF-D548C-A488-G743C-A647-Y766F (**Y766F**). Neben dem freien Enzym im Messpuffer wurde das Protein in Anwesenheit von DNA (200 nM), Nukleotid (1 mM ATP), DNA und komplementärem Nukleotid „Korrekt Nukleotid“ (200 nM DNA und 1 mM TTP), und DNA und nicht-komplementärem Nukleotid „Inkorrektes Nukleotid“ (200 nM DNA und 1 mM ATP) vermessen. Die einzelnen Messungen wurden zunächst einzeln angepasst (sowohl Abstände als auch Speziesanteile). Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse.

**Tabelle 21: Ergebnisse der eTCSPC Analyse mittels individueller Abstandsverteilung. Alle Abstände sind in Å angegeben. Die Speziesanteile sind auf eine Summe von 1 normiert. In der Regel lag der Anteil an freiem Farbstoff zwischen 10 % und 30 % (siehe Anhang B).**

Messbedingung	Variante	Abstand R1 (Anteil)	Abstand R2 (Anteil)	Abstand R3 (Anteil)	$\chi_r^2$
Freies Enzym	Y766S	88.5 (0.22)	58.7 (0.50)	43.1 (0.28)	1.02
	Y766F	-	53.5 (0.63)	40.9 (0.37)	1.06
	Wildtyp	68.3 (0.28)	52.5 (0.48)	39.2 (0.24)	1.09
Enzym + ATP	Y766S	72.1 (0.40)	55 (0.46)	41.6 (0.14)	1.07
	Y766F	-	60.3 (0.82)	43.1 (0.18)	1.09
	Wildtyp	103.3 (0.07)	61.6 (0.72)	45.5 (0.21)	1.11
Enzym + DNA	Y766S	-	59.3 (0.65)	46 (0.35)	1.06
	Y766F	65.1 (0.21)	57.9 (0.49)	44.8 (0.30)	1.08
	Wildtyp	63.2(0.77)	-	46.1 (0.23)	1.18
Korrekt Nukleotid	Y766S	-	58.9 (0.68)	43.7 (0.32)	1.31
	Y766F	-	57.9 (0.75)	43.2 (0.25)	1.41
	Wildtyp	-	59.4 (0.73)	44 (0.27)	1.31
Inkorrektes Nukleotid	Y766S	62.5(0.60)	-	47.8 (0.40)	1.21
	Y766F	62.0(0.79)	-	44.2 (0.21)	1.38
	Wildtyp	74.5 (0.40)	58.6(0.44)	48.1 (0.16)	1.43

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Während sowohl das freie Enzym als auch der Enzym-Nukleotid-Komplex eine Modellfunktion mit drei Abständen benötigen, lassen sich die drei weiteren funktionalen Zustände überwiegend mit zwei normalverteilten Abständen anpassen. In diesen Fällen liefert die verwendete Modellfunktion einen dritten Abstand außerhalb sinnvoller Grenzen ( $<10 \text{ \AA}$  und  $>150 \text{ \AA}$ ) mit sehr niedriger Amplitude, der daher in Tabelle 21 nicht aufgeführt wird. Diesen drei Zuständen gemein ist ein Enzym-DNA-Komplex. Vergleicht man die Ergebnisse mit den aus den Kristallstrukturen zu erwartenden Abständen (siehe 2.6 „Accessible Volume“ (AV) Simulationen), lässt sich der Abstand R1 sowohl der offenen („open“) als auch der halboffenen („ajar“) Konformation, Abstand R2 der geschlossenen Konformation („closed“), Abstand R3 jedoch auch unter Beachtung der Fehlerabschätzung keiner bekannten Struktur zuordnen.

### 4.3.10.4 Ergebnisse der eTCSPC-Experimente globale Anpassung

Unter der Annahme, dass das freie Enzym alle möglichen Abstände innerhalb des Polymerasezyklus bereits einnehmen kann und sich lediglich der Anteil der jeweiligen Abstände zwischen den unterschiedlichen funktionellen Zuständen ändert, wurden die Abstände über alle Messungen zusätzlich global angepasst. Die Ergebnisse der individuellen Anpassung der Modellfunktion an einzelne Messungen zeigen zudem, dass die Abweichung der Abstände zwischen zwei beliebigen Messungen innerhalb der geschätzten Fehlertoleranzen liegt. Eine entsprechende globaler Modellanpassung ist somit gerechtfertigt. Das Ergebnis für die jeweiligen Speziesanteile sowie die Abstände der drei Abstände ist in Tabelle 22 zusammengefasst. Die Abstände R1 und R2 stimmen hierbei überein mit den zu erwartenden Abständen aus den Kristallstrukturen für die offene/halboffene und geschlossene („closed“) Konformation (Tabelle 3). Bis auf die Variante Y766F, welche im freien Enzym nur zwei Abstände benötigt bzw. der dritte Abstand nur eine geringe Amplitude aufweist, zeigen alle funktionalen Zustände nennenswerte Speziesanteile für alle drei Abstände. Eine entsprechende Modellfunktion mit  $\sigma$  als zusätzlichem Parameter ergab keine Signifikante Verbesserung der Anpassung und resultierte in einem  $\sigma$  von  $6.7 \text{ \AA}$ . Ausgehend von den Erwartungswerten der zu beobachtenden Abstände und der Beobachtungen aus den Einzelmolekülexperimenten (siehe 4.3.11.3 MFD-Ergebnisse) werden für die Interpretation der Ergebnisse die Resultate der globalen Anpassung mit  $\sigma = 6 \text{ \AA}$  verwendet.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Tabelle 22: Anteile der drei Abstände im Molekülensemble der eTCSPC-Messungen. Die Speziesanteile sind auf eine Summe von 1 normiert.

	Speziesanteil Abstand R1 (63.2 Å) / %	Speziesanteil Abstand R1 (52.5 Å) / %	Speziesanteil Abstand R1 (38.8 Å) / %	$\chi_r^2$	Anteil freier Donor / %
<b>Enzym „E“</b>	31	44	25	1.11	12
	42	37	21	1.12	15
	5	65	30	1.20	28
<b>E+ ATP</b>	64	25	11	1.10	12
	53	35	12	1.15	16
	61	29	10	1.14	27
<b>E+ DNA</b>	66	23	11	1.12	21
	35	52	13	1.15	19
	40	45	15	1.11	30
<b>Korrekt</b>	48	38	14	1.29	9
	39	42	19	1.43	12
	42	45	13	1.34	24
<b>Inkorrekt</b>	68	21	11	1.30	11
	46	39	15	1.45	14
	67	20	13	1.45	24

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

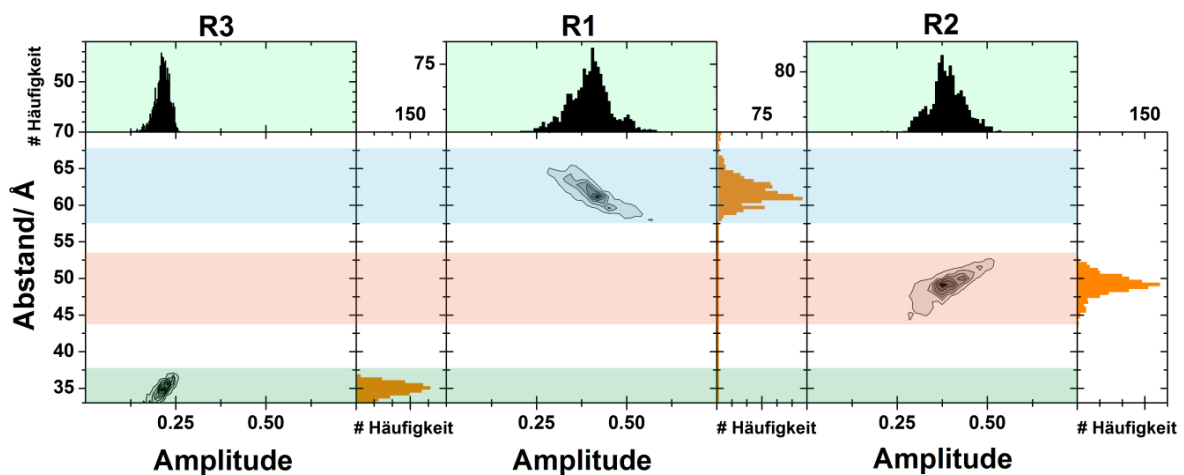
### 4.3.10.5 Fehlerabschätzung in der eTCSPC-Analyse

Die Fehlerabschätzung für die Abstände und die entsprechenden Amplituden erfolgte über einen Markov-Ketten Monte-Carlo-Ansatz (Metropolis et al. 1953; Hastings 1970). Alle freien Parameter wurden mit Hilfe des Metropolis-Hastings Algorithmus abgetastet, wobei mindestens 30 Markov-Ketten mit 150000 Schritten pro Kette verwendet wurden. Jede einzelne Kette startete in einem durch eine formale Anpassung gefundenen Minimum  $\vec{w}_{\min}$ . Die Wahrscheinlichkeit für den Algorithmus, ausgehend von einem Punkt  $\vec{w}_i$  eine weitere Kombination von Parametern  $\vec{w}_{i+1} = \vec{w}_i + \vec{\delta}$  mit der Schrittweite  $\vec{\delta}$  zu finden, die den gemessenen Daten  $\vec{m}$  entspricht, ist

$$P(\vec{m}, \vec{w}_{i \rightarrow i+1}) = \exp(-1/2 \cdot (\chi_{i+1}^2 - \chi_i^2))$$

Formel 51

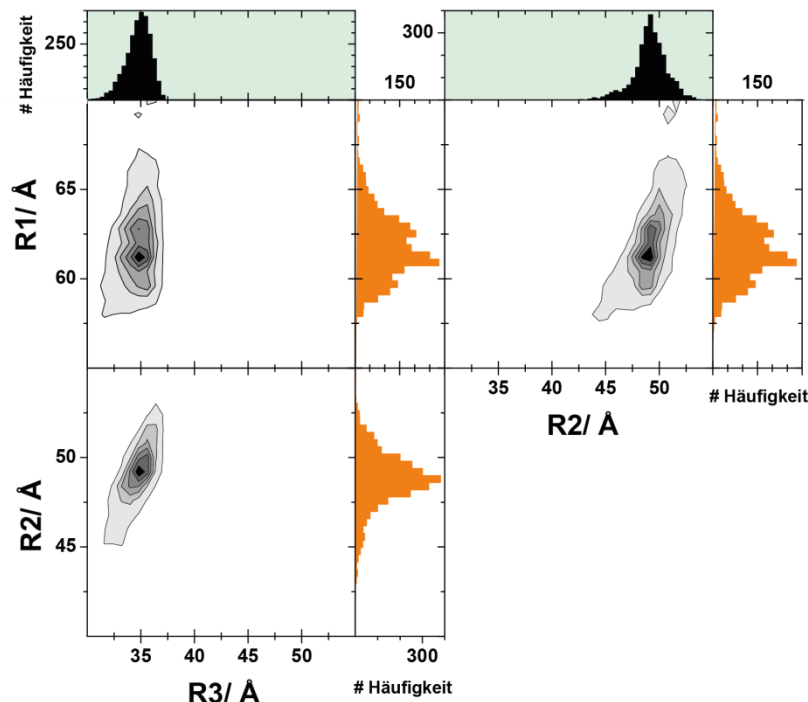
Um den Parameterraum zu begrenzen und so die Analyse zu beschleunigen, wurde ein maximales  $\chi_r^2$  eingeführt, welches einem vorher definierten Konfidenzintervall von 99.99 % gemäß der F-Verteilung des vorliegenden Datensatzes entsprach (Lakowicz 2006). Die Ergebnisse der Fehlerabschätzung der FRET-Variante KF-548C-A488-G743C-A647 für die drei angepassten Abstände und die dazugehörigen Speziesanteile sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Ergebnisse der Fehlerabschätzung für die drei Abstände und die dazugehörigen Speziesanteile.** Die Verteilung der Abstände (R1, R2, R3) ist jeweils gegen die Verteilung der zugehörigen Speziesanteile aufgetragen. Die Abstandsverteilung wird durch farbige Streifen hervorgehoben. Die entsprechenden 1D-Histogramme sind oberhalb und rechts des jeweiligen 2D-Histogramms dargestellt. Die Beschreibung der Ergebnisse erfolgt im Text.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die Ergebnisse der Fehlerabschätzung zeigen eine scharfe Verteilung der Amplitude für den kurzen Abstand (R3). Es ist jedoch zu beachten, dass für einen entsprechend kurzen Abstand keine scharfe Untergrenze bezüglich des Abstandes angegeben werden kann, da hier der Einfluss von Streulicht im Modell keine genaue Bestimmung zulässt (Thomas-Otavio Peulen, persönliche Diskussion). Für den mittleren Abstand R2 und den langen Abstand R1 sind dagegen die Verteilungen bezüglich der Abstände klar zu definieren. Anhand der Auftragung ist jedoch zu erkennen, dass die jeweiligen Amplituden sehr breit verteilt sind. Die langgezogene Form und diagonale Lage der Populationen im 2D-Histogramm zeigen zudem eine Korrelation zwischen dem Abstand und der dazugehörigen Amplitude. So ist die Amplitude des mittleren Abstandes R2 proportional zu diesem, die Amplitude des langen Abstandes R1 verhält sich dagegen umgekehrt proportional. Insgesamt streuen die Amplituden der Abstände R1 und R2 sehr stark im Verhältnis zu den Ergebnissen für den Abstand R3. Abbildung 34 zeigt die Auftragung der einzelnen Abstände gegeneinander in 2D-Histogrammen.



**Abbildung 34: 2D-Histogramme der aus der Fehlerabschätzung gewonnenen Abstandsverteilungen.** Die Abbildung zeigt alle möglichen Kombinationen der drei Abstandsverteilungen in 2D-Histogrammen mit den dazugehörigen 1D-Histogrammen. Die Form einer Population lässt sich als eine eventuell vorhandene Korrelation von zwei Abständen interpretieren. Die Beschreibung der Ergebnisse erfolgt im Text.



#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Hierbei deutet eine kreisförmige bzw. senkrecht oder waagrecht verlaufende Population auf keinen Zusammenhang zwischen den Abständen hin. Dies ist für die Auftragung des kurzen Abstandes R3 mit den jeweils längeren Abständen R2 und R1 zu beobachten und lässt darauf schließen, dass der Abstand R3 unabhängig von den anderen beiden Abständen angepasst wird. Für die Abstände R1 und R2 ist die Population dagegen verformt. Ein großer Abstand R2 bedingt einen ebenfalls großen Abstand R1. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist dementsprechend zu beachten, dass bei einem Vergleich von unterschiedlichen Messungen eine gleichgerichtete Verschiebung der Abstände R1 und R2 nur eine bedingte Aussagekraft besitzt. Tabelle 23 listet die abgeschätzten Fehler für die Abstände und die dazugehörigen Amplituden auf. Das für die Abschätzung verwendete Konfidenzintervall entspricht dabei  $\sim 3$  Standardabweichungen, um ein hohes Maß an Aussagekraft zu gewährleisten. Die Abstände sind dabei klar voneinander getrennt.

**Tabelle 23: Geschätzte Fehler für die Abstände und Speziesanteile für eine Modellfunktion mit drei normalverteilten Abständen mit fixiertem  $\sigma$  (6 Å).** \*Die untere Abstandsgrenze ist stark abhängig vom Streulichtanteil, die obere stark abhängig vom Hintergrundsignal. Die hier angegebenen Werte dienen zur Orientierung der Verteilungsbreite.

	<b>Abstandsverteilung/Å</b>	<b>Relativer Speziesanteil</b>
<b>R1</b>	60-70*	0.25-0.57
<b>R2</b>	47-58	0.27-0.52
<b>R3</b>	32*-40*	0.15-0.25

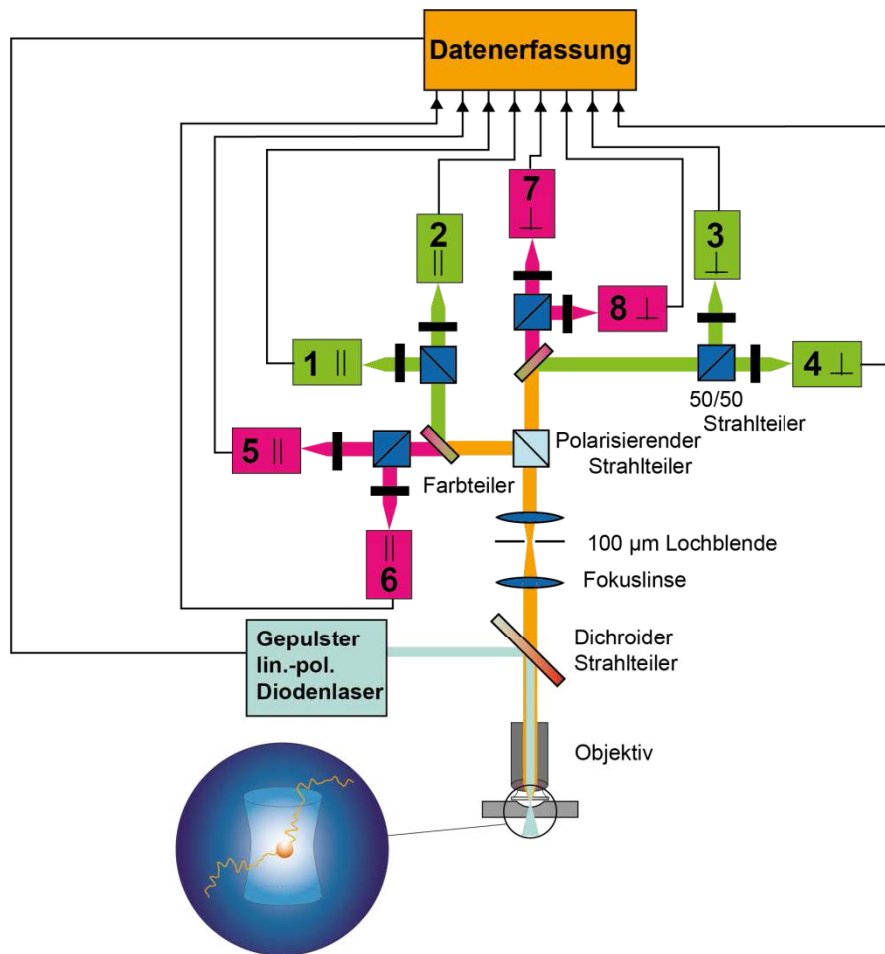
## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.11 Multiparameterfluoreszenzdetektion (MFD)

Die Grundlagen des Fluoreszenzphänomens erlauben die Verwendung einer Vielzahl von damit verbundenen Parametern zur Analyse von molekularen Prozessen mittels FRET. Die Kombination von mehreren dieser Parameter ist die Basis der Multiparameterfluoreszenzdetektion (MFD). Diese Kombination zu einer mehrdimensionalen Analyse im Vergleich zu eindimensionalen Methoden erlaubt zum einen eine bessere Unterscheidung von realem Signal und Messartefakten und zum anderen eine Unterscheidung von unterschiedlichen Fluoreszenzpopulationen, die sich in bestimmten Parametern nicht voneinander unterscheiden (Widengren et al. 2006).

Die Messungen wurden mittels eines konfokalen Aufbaus durchgeführt. Für die Anregung wurde ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 485 nm verwendet (LDH-D-C 485 PicoQuant, 64 MHz, Leistung am Objektiv 40  $\mu$ W). Die frei durch das Anregungsvolumen des Objektivs (60X, 1.2 NA collar (0.17), Olympus) diffundierenden Moleküle wurden angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht durch dasselbe Objektiv gesammelt. Um den Fokus auf ein entsprechend kleines, konfokales Volumen zu begrenzen, wurde das Fluoreszenzlicht durch eine 100  $\mu$ m Lochblende geleitet. Das Fluoreszenzsignal wurde zuerst durch einen Strahlteiler nach Polarisation und im weiteren Verlauf spektral in „grün“ und „rot“ geteilt (Q 595 DCXR Strahlteiler und HQ 520/35 und HQ 720/150 Bandbreitenfilter, AHF). Um Signalverluste durch Detektortotzeiten zu vermeiden, wurden die einzelnen Signale mittels eines 50/50 Strahlteilers weiter geteilt. Insgesamt wurden somit acht Photodetektoren verwendet, vier für die Detektion der „grünen“ Donorfluoreszenz ( $\tau$ -SPAD, PicoQuant) und vier für die Detektion der „roten“ Akzeptorfluoreszenz (APD SPCM-AQR-14, Perkin Elmer). Für die Datenerfassung wurde ein Modul zur Einzelphotonenzählung verwendet (HydraHarp 400, PicoQuant). Eine Übersicht des verwendeten Aufbaus ist in Abbildung 35 dargestellt.

### Multiparameter Fluoreszenz Detektion



**Abbildung 35: Schematische Übersicht des verwendeten MFD-Aufbaus.** Für eine detaillierte Beschreibung siehe Text.

Doppelt markiertes Protein wurde für Einzelmolekülexperimente schrittweise (maximaler Verdünnungsfaktor pro Schritt: 100) in Messpuffer verdünnt (50 mM Tris, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween 20). Die finale Konzentration betrug ~20 pM und gewährleistete die Detektion von einzelnen Molekülen (ca. 1 Fluoreszenzereignis pro Sekunde). Die Messungen wurden in Probenkammern (NUNC, Lab-tek) mit 500 µl Probenvolumen und einer Messzeit von 90 Minuten durchgeführt. Für die Datenanalyse wurden des weiteren Wasser (Geräteantwortfunktion, IRF), Puffer (Hintergrundsignal), Rhodamin 110 und Rhodamin 101 (Kalibrierung der Detektionskanäle) und ein Standard aus doppelt markierter, doppelsträngiger DNA (Ermittlung der Detektionseffizienzen) vermessen.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.11.1 Datenanalyse und FRET-Linien

Die Analyse der Einzelmoleküldaten erfolgte unter Verwendung des institutseigenen Computerprogrammes Paris (Version 8.5) und die graphische Darstellung der Paris-Ergebnisse über Margarita (Version 8.5). Die für die Analyse benötigten Standardparameter des verwendeten Aufbaus sind innerhalb der Software hinterlegt und müssen vor der jeweiligen Analyse entsprechend ausgewählt werden. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Parameter ist in (Sisamakos et al. 2010) dokumentiert. Die Datenanalyse erfolgte „burstweise“. Aus der Messung wurden Fluoreszenzereignisse („Fluoreszenzburst“), welche eine Mindestanzahl von 40 Photonen aufwiesen und zusätzlich oberhalb einer manuell festgelegten Schwelle, die ca. 2 Standardabweichungen des mittleren Signals betrug, ausgewählt. Jeder selektierte Burst wurde anschließend prozessiert und die gemittelte Fluoreszenzlebensdauer jedes Burst unter Verwendung des „Maximum Likelihood“ Algorithmus angepasst (Maus et al. 2001).

Parallel zur Fluoreszenzlebenszeit lässt sich zudem das Fluoreszenzsignal des Donors und des Akzeptors ermitteln. Hierzu wurde das detektierte Signal um das separat gemessene, gemittelte Hintergrundsignal  $\langle B_G \rangle$  korrigiert. Da zusätzlich die Detektionseffizienzen für den Donor ( $g_G$ ) und den Akzeptor ( $g_R$ ) bekannt sind, kann das korrespondierende, reine Fluoreszenzsignal  $F$  berechnet werden. Für die in den grünen Kanälen detektierte Donorfluoreszenz ist diese Korrektur bereits ausreichend, um das eigentliche Fluoreszenzsignal ( $F_D$ ) aus dem Rohsignal ( $S_G$ ) zu berechnen.

$$F_D = \frac{S_G - \langle B_G \rangle}{g_G}$$

Formel 52

Für die Berechnung des Akzeptorsignals musste zusätzlich die Wahrscheinlichkeit, ein grünes Fluoreszenzphoton in einem roten Detektionskanal zu detektieren („spectral crosstalk“,  $\alpha$ ), in die Korrektur miteinbezogen werden.

$$F_A = \frac{S_R - \alpha(S_G - \langle B_G \rangle) - \langle B_R \rangle}{g_R}$$

Formel 53

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Der Quotient aus Donorfluoreszenz und Akzeptorfluoreszenz ( $F_D/F_A$ ) kann stellvertretend für die Transfereffizienz verwendet werden. Ein einfacher Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzverhältnis und der Fluoreszenzlebensdauer lässt sich analog zur Transfereffizienz (Formel 19) beschreiben:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{\text{statisch}} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \left(\frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(A)}} - 1\right)^{-1} \quad \text{Formel 54}$$

In Formel 54 fließen zur Bestimmung der sogenannten statischen FRET-Linie experimentelle Parameter wie die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe ( $\phi_{FD(0)}$  für den Donor,  $\phi_{FA}$  für den Akzeptor), das Hintergrundsignal ( $B_G$  für die grünen und  $B_R$  für die roten Kanäle), die Detektionseffizienzen ( $g_G$  und  $g_R$ , jeweils für grün und rot), der Crosstalk ( $\alpha$ ) und die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes,  $\tau_{D(0)}$  ein. Um den exakten Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzverhältnis und der Fluoreszenzlebensdauer beschreiben zu können, müssen jedoch zusätzlich strukturelle Parameter wie die Länge und Flexibilität des verwendeten Linkers, mit dem der Farbstoff mit dem Makromolekül verbunden ist, beachtet werden (Sisamakís et al. 2010; Sindbert et al. 2011).

Zusätzlich ist die gemittelte Fluoreszenzlebensdauer fluoreszenzgewichtet, so dass Anteile an langen Fluoreszenzlebensdauern des Donors einen überproportionalen Einfluss auf die gemittelte Fluoreszenzlebensdauer haben, während das Intensitätsverhältnis dadurch nicht beeinflusst wird. Zur Korrektur wurde hierfür eine Näherung mittels eines Polynoms durchgeführt (Formel 55).

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{\text{statisch \& L-korr.}} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \left(\frac{\langle\tau_{D(0)}\rangle_x}{c_3\langle\tau_{D(A)}\rangle_f^3 + c_2\langle\tau_{D(A)}\rangle_f^2 + c_1\langle\tau_{D(A)}\rangle_f + c_0} - 1\right)^{-1} \quad \text{Formel 55}$$

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

$\langle\tau_i\rangle_x$  und  $\langle\tau_i\rangle_f$  bezeichnen hierbei die gemittelte Fluoreszenzlebensdauer gemäß der Anteile der fluoreszierenden Spezies („Speziesgemittelte Fluoreszenzlebensdauer“) bzw. der gemäß des Anteils an der Gesamtfluoreszenz gemittelten Fluoreszenzlebensdauer („Fluoreszenzgemittelte Fluoreszenzlebensdauer“).

Im MFD-Experiment befinden sich die Moleküle frei diffundierend in Lösung. Die Diffusionszeit, in der ein Makromolekül durch den konfokalen Fokus des Mikroskops diffundiert, liegt im Bereich von wenigen Millisekunden. Kommt es innerhalb des Makromoleküls zu schnelleren Konformationsänderungen, die eine Änderung des Abstandes zwischen den Farbstoffen zur Folge hat, kommt es zu einer Vermischung der Zustände in der Datenanalyse. Diese Bursts lassen sich in einer  $F_D/F_A$  vs.  $T_{D(A)}$  Darstellung nicht mehr auf der statischen Linker-korrigierten FRET-Linie lokalisieren. Hierfür wurde ein einfaches Zwei-Zustands-System nach (Sisamakias et al. 2010) für die dynamische FRET-Linie angewendet:

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \frac{\tau_1 * \tau_2}{\tau_{D(0)} * [\tau_1 + \tau_2 - \langle\tau\rangle_f] - \tau_1 * \tau_2}$$

Formel 56

Dabei sind  $\langle\tau\rangle_f$  die fluoreszenzgemittelten Fluoreszenzlebensdauern und  $\phi_{FD(0)}$  und  $\phi_{FA}$  die Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffe.  $\tau_1$  und  $\tau_2$  entsprechen den Donorfluoreszenzlebensdauern der beiden ineinander übergehenden Farbstoffabstände.

Auch hierbei müssen zusätzlich das Verhalten des Farbstofflinkers und die unterschiedliche Gewichtung in der Berechnung der Fluoreszenzlebenszeiten beachtet werden und analog zur Korrektur der statischen FRET-Linie ergibt sich somit die dynamisch korrigierte FRET-Linie:

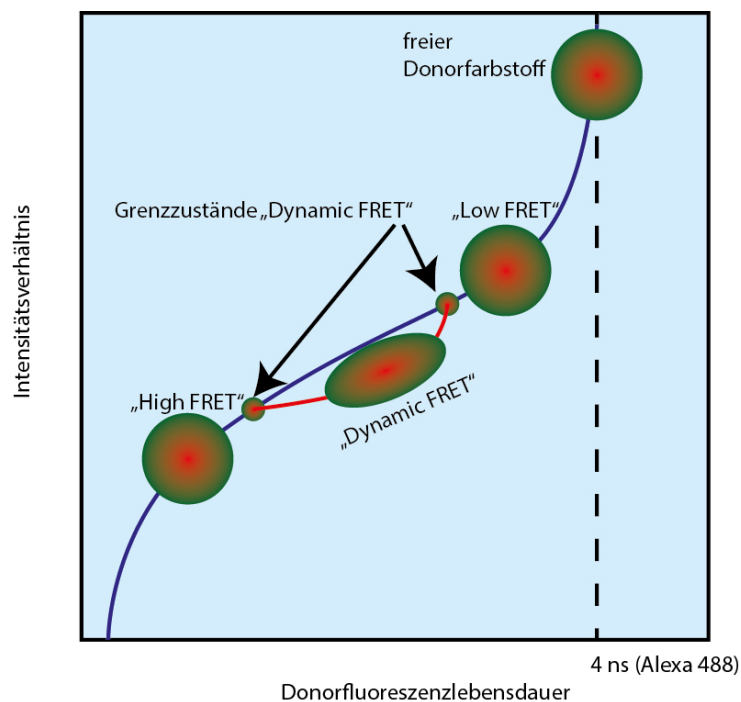
$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{dyn \& L-korr.} = \frac{\phi_{FD(0)}}{\phi_{FA}} * \frac{\tau_1 * \tau_2}{\langle\tau_{D(0)}\rangle * [\tau_1 + \tau_2 - (c_3 \langle\tau_{D(A)}\rangle_f^3 + c_2 \langle\tau_{D(A)}\rangle_f^2 + c_1 \langle\tau_{D(A)}\rangle_f + c_0)] - \tau_1 * \tau_2}$$

Formel 57

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.11.2 Kurzanleitung zur Interpretation von MFD-Ergebnissen anhand von 2D-Histogrammen

Die zweidimensionale Auftragung von MFD-Ergebnissen über die kombinierte Darstellung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  mit der Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes ermöglicht eine anschauliche Präsentation der Ergebnisse. Abbildung 36 zeigt schematisch die Lage der unterschiedlichen Populationen im zweidimensionalen Histogramm. Eine niedrige Transfereffizienz („Low FRET“) findet sich in der Darstellung oben rechts bei langer Fluoreszenzlebensdauer und großem Intensitätsverhältnis. Eine hohe Transfereffizienz („High FRET“) findet sich entsprechen links unten bei kurzer Fluoreszenzlebensdauer und kleinem Intensitätsverhältnis. Verunreinigungen der Probe mit freiem Donorfarbstoff zeigen ein großes Intensitätsverhältnis und eine dem Farbstoff entsprechende Fluoreszenzlebenszeit (4 ns für Alexa 488). Die Lage der einzelnen Populationen lässt weiterhin Rückschlüsse auf eine statische oder dynamische Natur der Populationen zu. Dynamische Populationen liegen rechts der statischen FRET Linie auf einer dynamischen FRET-Linie („dynamic FRET“). Dynamische Populationen zeigen zudem eine längliche Verzerrung, während statische Populationen kreisförmig dargestellt werden (Kalinin et al. 2010).



**Abbildung 36: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Populationen in einem 2D-Histogramm.** Details siehe Text. Eine statische FRET-Linie (blau) und eine dynamische FRET-Linie (rot) sind zusätzlich eingezeichnet. Die gestrichelte Linie zeigt die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs in Abwesenheit eines Akzeptors an.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.11.3 MFD-Ergebnisse

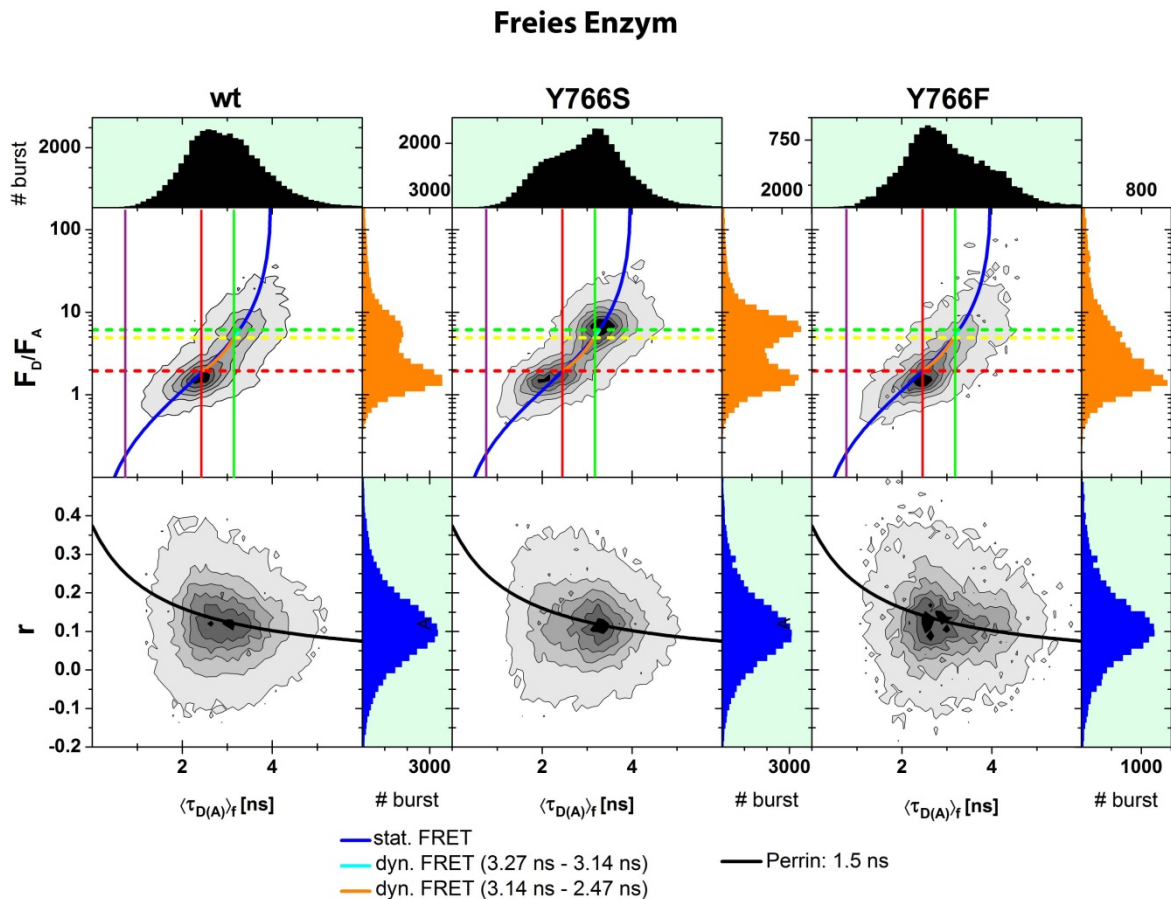
Die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen werden im Folgenden in kombinierten 2D-Histogrammen gezeigt. Die Messungen der unterschiedlichen, FRET-markierten Varianten (Tabelle 15) sind für die unterschiedlichen Pufferbedingungen zur besseren Vergleichbarkeit zusammen dargestellt. Die für die dynamischen FRET-Linien verwendeten Fluoreszenzlebenszeiten sind aus den Abständen der AV-Simulationen abgeleitet. Die dafür verwendete Gleichung ist in Tabelle 24 aufgelistet. Die abgebildeten statischen und dynamischen FRET-Linien sowie die dargestellte Perrin-Gleichung sind ebenfalls in Tabelle 24 aufgelistet (siehe 4.3.11.1 Datenanalyse und FRET-Linien).

**Tabelle 24: Verwendete Funktionen in den dargestellten 2D-Histogrammen und verwendete Messpuffer**

Anwendung	Funktion
Stat. FRET-Linie	$F(x) = (0.8/0.56) / ((4/((-0.0376*x^3) + (0.2794*x^2) + 0.4934*x - 0.0432)) - 1)$
Dyn. FRET-Linie (3.27ns-3.14ns)	$F(x) = 0.2 / (0.56 * ((1/3.14 + 1/3.27 - (1.1377*x - 0.4835) / (3.27*3.14)) - 1/4))$
Dyn. FRET-Linie (3.14ns-2.47ns)	$F(x) = 0.2 / (0.56 * ((1/2.47 + 1/3.14 - (1.2403*x - 0.7937) / (3.14*2.47)) - 1/4))$
Perrin Gleichung	$F(x) = 0.3740 / (1 + x/1.5)$
Umrechnung Abstand → $\langle \tau_{D(A)} \rangle_f$	$F(x) = (1/4 / (0.0421*x^2 + 0.8728*x - 0.1452) - 1)^{(1/6)} * 52$
<b>Verwendete Puffer</b>	
Messpuffer	50 mM Tris pH 8, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.01% Tween 20
Messbedingungen	Leistung am Objektiv: 40 μW Probenvolumen: 500 μl in Messkammer Molekülkonzentration: ~20 pM



## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



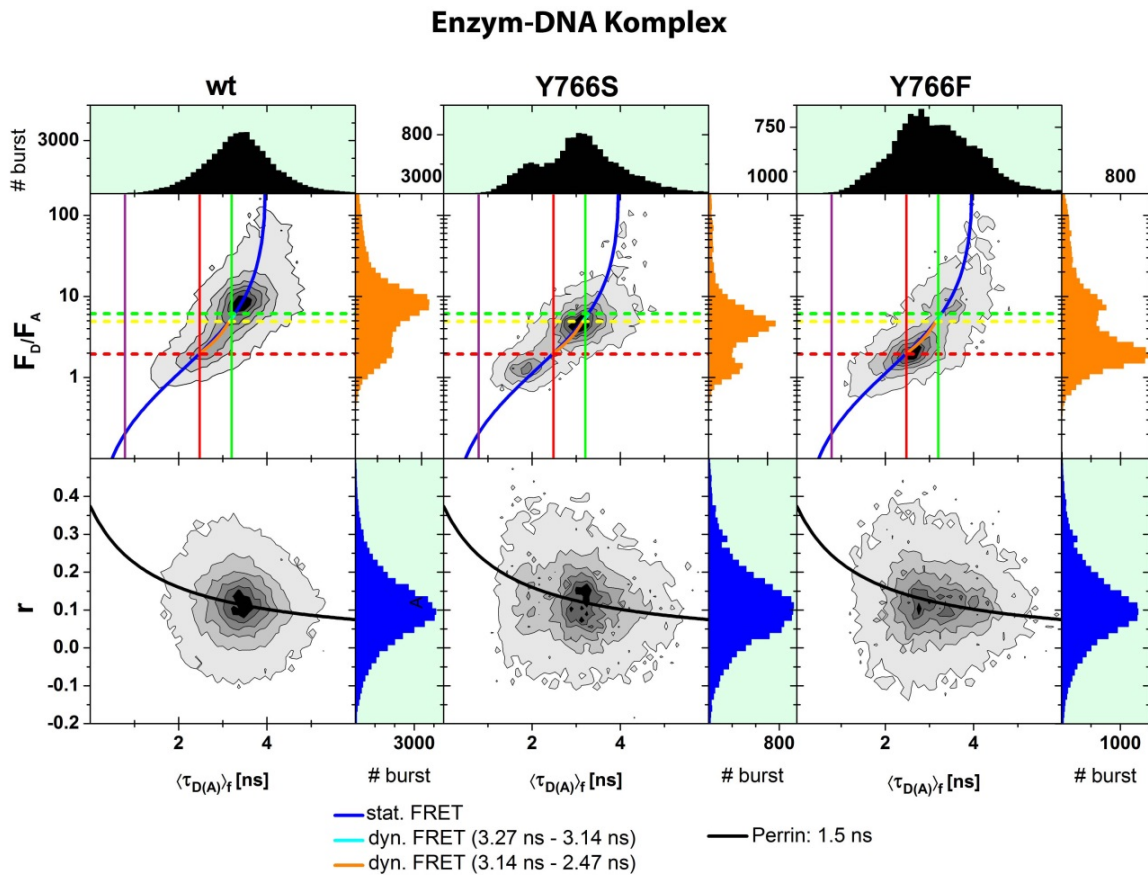
**Abbildung 37: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für das freie Enzym.** Dargestellt sind die 2D-Histogramme für die Auftragung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 1) und die Fluoreszenzanisotropie  $r$  des Donorfarbstoffes gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 2). Von links nach rechts ist der Vergleich der verwendeten Varianten Wildtyp (wt), Y766S und Y766F abgebildet. Die unterschiedlichen FRET-Linien und die Perrin-Gleichung (Tabelle 24) sind farblich hervorgehoben. Die aus den AV-Simulationen zu erwartenden Abstände sind durch gestrichelte, horizontale Linien eingezeichnet (grün: open, gelb: ajar, rot: closed). Die aus den eTCSPC Experimenten ermittelten Abstände sind durch senkrechte Linien eingezeichnet (63.2 Å grün, 52.2 Å rot, 38.7 Å violett).

Messungen von freiem Enzym zeigen für alle drei Varianten eine Population bei langer Fluoreszenzlebensdauer und großem Intensitätsverhältnis. Diese Population stimmt mit den Erwartungswerten überein. Des Weiteren ist eine zweite Population bei kurzer Fluoreszenzlebensdauer sichtbar, die sich jedoch nicht auf der statischen FRET-Linie befindet und zudem eine verzerrte Form besitzt, was auf eine dynamische Population hindeutet. In allen drei Varianten stimmt die obere Grenze dieser Population mit dem Erwartungswert für die geschlossene Konformation überein, der Schwerpunkt liegt jedoch bei niedrigerem Intensitätsverhältnis bzw. kürzerer Lebensdauer, was auf einen kurzen Farbstoffabstand schließen lässt.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Betrachtet man die dynamischen FRET-Linien zwischen den erwarteten Abständen, so fällt auf, dass diese nur geringfügig von der statischen FRET-Linie abweichen, was eine Interpretation der Ergebnisse erschwert. Im Vergleich mit den Abständen aus eTCSPC-Experimenten zeigt sich auch hier eine Übereinstimmung mit den Erwartungswerten aus AV-Simulationen und den Einzelmolekülergebnissen. Der aus den eTCSPC-Experimenten ermittelte kurze Abstand ist im Einzelmolekülexperiment nicht sichtbar. Dies ist aufgrund des kurzen Abstandes und der damit verbundenen geringen Photonenzahl im grünen Kanal zu erwarten. Die unterschiedlichen Varianten zeigen bezogen auf die Lage der Populationen ein einheitliches Bild, die Verteilung variiert jedoch. Während die Variante Y766S eine Gleichverteilung der beiden Populationen zeigt, ist der Anteil der putativ dynamischen Population im Wildtyp und in der Variante Y766F deutlich größer. Sowohl der Verlust der Hydroxylgruppe und somit einer möglichen Wasserstoffbrückenbindung als auch die Deletion des aromatischen Rings wirken sich somit auf das Gleichgewicht der Zustände im freien Enzym aus (Hohlbein et al. 2013). Die Auftragung der Fluoreszenzanisotropie gegen die Fluoreszenzlebensdauer zeigt keine Auffälligkeiten. Die Populationen verlaufen entlang der Perrin-Gleichung für eine Rotationskorrelationszeit von 1.5 ns, was erfahrungsgemäß für an Makromoleküle gebundene Farbstoffe zu erwarten ist. Abweichungen zu einer höheren Fluoreszenzanisotropie deuten auf eine stark verminderte Beweglichkeit des Farbstoffs hin, was jedoch nicht zu beobachten ist.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



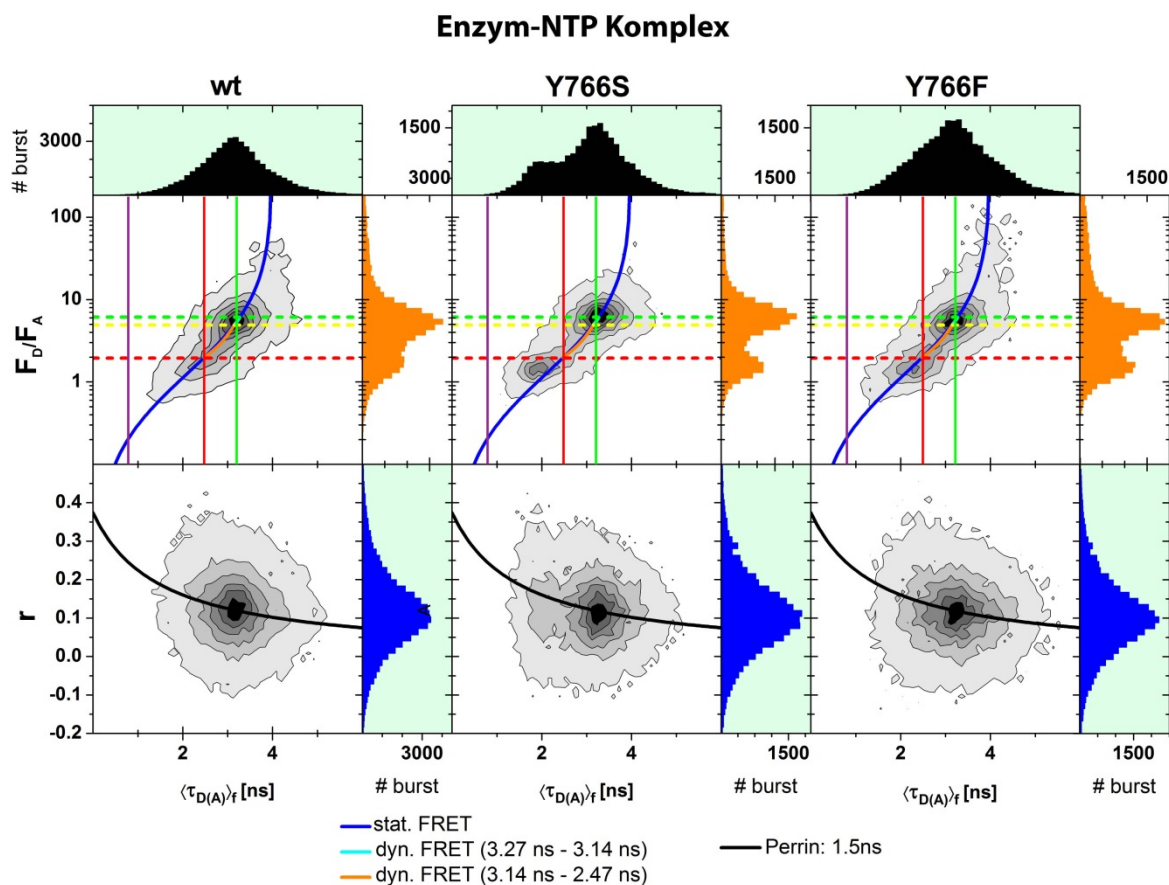
**Abbildung 38: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-DNA-Komplex.** Dargestellt sind die 2D-Histogramme für die Auftragung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 1) und die Fluoreszenzanisotropie  $r$  des Donorfarbstoffes gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 2). Von links nach rechts ist der Vergleich der verwendeten Varianten Wildtyp (wt), Y766S und Y766F abgebildet. Die unterschiedlichen FRET-Linien und die Perrin-Gleichung (Tabelle 24) sind farblich hervorgehoben. Die aus den AV-Simulationen zu erwartenden Abstände sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die aus den eTCSPC Experimenten ermittelten Abstände sind durch senkrechte Linien eingezeichnet (63.2 Å grün, 52.2 Å rot, 38.7 Å violett).

Im DNA-gebundenen Zustand (200 nM DNA im Messpuffer) ist für den Wildtyp eine Population mit langer Fluoreszenzlebensdauer und korrespondierendem Intensitätsverhältnis sichtbar. Diese Population liegt deutlich höher als aus den AV-Simulationen zu erwarten wäre. Eine zweite Population entlang der dynamischen FRET-Linie zwischen 3.14 ns und 2.47 ns, die den erwarteten Abständen entspricht, ist ebenfalls zu erkennen. Für die Variante Y766S ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Die Populationen sind jedoch zu kurzen Lebensdauern verschoben und nicht mehr vergleichbar mit den zu erwartenden Abständen. Die Variante Y766F zeigt dagegen ein der Messung des freien Enzyms sehr ähnliches Ergebnis. Zum einen überrascht dieses Ergebnis, da diese Variante im Vergleich zum Wildtyp keine funktionalen Unterschiede zeigt (Bell et al. 1997; Minnick et al. 1999) und somit kein

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

vom Wildtyp abweichendes Verhalten erwartet wird. Des Weiteren wurde bisher angenommen, dass die Ausrichtung des aromatischen Rings der Aminosäureseitenkette zur gebundenen DNA durch die Bindung des Nukleotids und das dadurch induzierte Schließen des Enzyms verändert wird (Rothwell et al. 2005). Das dynamische Verhalten des Enzyms deutet jedoch darauf hin, dass die Polymerase nicht nur im substratfreien Zustand zwischen multiplen Zuständen dynamisch wechselt und, dass die Ausrichtung des aromatischen Rings nicht zwangsläufig auf ein Schließen der Finger-Domäne folgt. Naheliegender ist eine umgekehrte Kausalität, in der die Neuausrichtung des aromatischen Rings die „closed“-Konformation ermöglicht. Diese Annahme wird durch erste Anhaltspunkte aus Einzelmolekülexperimenten, die eine Wasserstoffbrücke zwischen Tyrosin 766 und Glutamat 710 als möglichen kinetischen Schalter sehen (Hohlbein et al. 2013), gestärkt. Dieser Schalter ist somit in der Variante Y766F nicht existent und stellt eine mögliche Erklärung der Ergebnisse dar. Bezogen auf den Verlust der Replikationsgenauigkeit bedeutet es aber auch, dass die Funktion des kinetischen Schalters diese nicht beeinflusst. Die Verteilung der Anisotropie zeigt wie auch im freien Enzym keine Auffälligkeiten. Die zu beobachtende Rotationskorrelationszeit bleibt mit 1.5 ns stabil, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die an das Enzym gebundene DNA den Farbstoff nicht beeinträchtigt.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

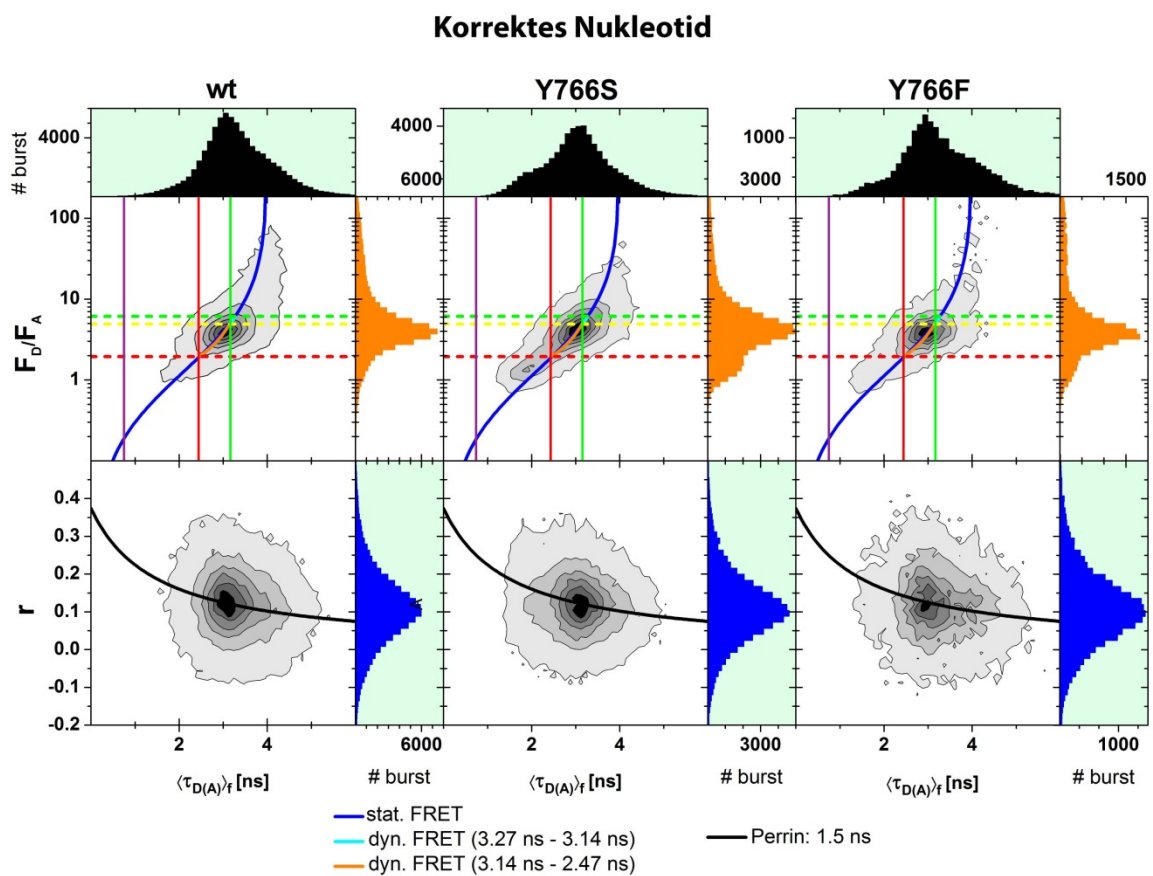


**Abbildung 39: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-dNTP-Komplex.** Dargestellt sind die 2D-Histogramme für die Auftragung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 1) und die Fluoreszenzanisotropie  $r$  des Donorfarbstoffes gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 2). Von links nach rechts ist der Vergleich der verwendeten Varianten Wildtyp (wt), Y766S und Y766F abgebildet. Die unterschiedlichen FRET-Linien und die Perrin-Gleichung (Tabelle 24) sind farblich hervorgehoben. Die aus den AV-Simulationen zu erwartenden Abstände sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die aus den eTCSPC Experimenten ermittelten Abstände sind durch senkrechte Linien eingezeichnet (63.2 Å grün, 52.2 Å rot, 38.7 Å violett).

Der Enzym-dNTP-Komplex (100  $\mu\text{M}$  ATP im Messpuffer) zeigt sowohl für wildtypisches Enzym als auch für beide Varianten zwei Populationen. Die Population bei ca. 3.2 ns Lebensdauer stimmt dabei in allen drei Fällen mit dem erwarteten Abstand für eine offene bzw. DNA-gebundene Struktur überein. Eine genaue Zuordnung ist hier aufgrund der geringen Unterschiede nicht möglich. Die zweite Population zeigt wie auch unter den bisher gezeigten Messbedingungen eine längliche Verzerrung, was für eine dynamische Population spricht. Des Weiteren zeigt diese Population kürzere Lebensdauern als aus den Simulationen zu erwarten war, was auf einen kürzeren Farbstoffabstand hindeutet.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Die beiden Tyrosinvarianten zeigen vergleichbare Ergebnisse mit dem wildtypischen Enzym, was darauf schließen lässt, dass das Tyrosin keinen Einfluss auf die Bindung des Nukleotids bzw. die Einnahme einer möglichen nukleotidgebundenen Konformation hat (Wu et al. 2011). Sowohl der Verlust des aromatischen Rings als auch der Hydroxylgruppe des konservierten Tyrosins zeigt hier keine Auswirkungen auf die konformationellen Dynamiken im Vergleich zum wildtypischen Enzym. Eine entsprechende Stabilisierung eines offenen oder halb offenen Zustandes durch die Bindung des Nukleotids ist eine mögliche Erklärung, die durch bereits veröffentlichte Ergebnisse gestützt wird (Berezhna et al. 2012; Rothwell et al. 2013). Ein Vergleich der Anisotropie zeigt wieder keine Auffälligkeiten.

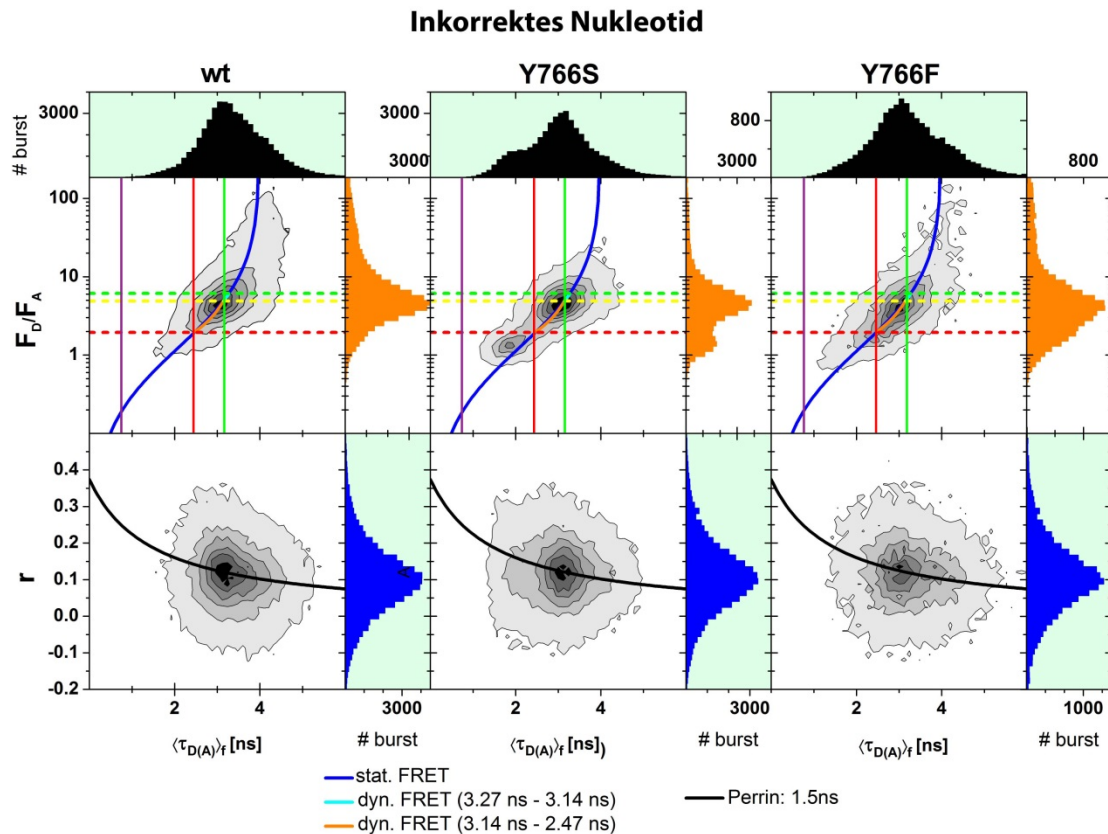


**Abbildung 40: Vergleich der Einzelmolekuleregebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-DNA-dNTP-Komplex mit korrektem Nukleotid.** Dargestellt sind die 2D-Histogramme für die Auftragung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 1) und die Fluoreszenzanisotropie  $r$  des Donorfarbstoffes gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 2). Von links nach rechts ist der Vergleich der verwendeten Varianten Wildtyp (wt), Y766S und Y766F abgebildet. Die unterschiedlichen FRET-Linien und die Perrin-Gleichung (Tabelle 24) sind farblich hervorgehoben. Die aus den AV-Simulationen zu erwartenden Abstände sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die aus den eTCSPC Experimenten ermittelten Abstände sind durch senkrechte Linien eingezeichnet (63.2 Å grün, 52.2 Å rot, 38.7 Å violett).

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Für den Komplex aus Enzym, DNA und zur DNA kompatiblen Nukleotid wird, ausgehend von den Kristallstrukturen, die Einnahme einer geschlossenen Konformation erwartet. Die Ergebnisse zeigen tatsächlich eine Population mit im Vergleich zur offenen Konformation kürzerer Fluoreszenzlebensdauer und entsprechendem Intensitätsverhältnis. Die Lage als auch die Form deuten dabei jedoch abweichend von bisherigen Annahmen (Rothwell et al. 2005; Santoso et al. 2010) auf eine dynamische Population hin. Daneben zeigen die Ergebnisse ein zusätzliches Signal bei langer und kürzerer Fluoreszenzlebensdauer für alle drei Varianten. Anhand der 1D-Histogramme erkennt man hier einen deutlichen Unterschied zwischen der Variante Y766S und dem Wildtyp bzw. Variante Y766F, die ein nahezu identisches Muster zeigen. Der Anteil an Molekülen, die eine kurze Lebensdauer von ca. 2 ns zeigen, ist in der Variante Y766S deutlich größer, ebenso zeigt die Hauptpopulation eine deutlichere Verzerrung. Beide Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass das Tyrosin als kinetischer Schalter dient, dessen Funktion mit dem aromatischen Ring der Aminosäureseitenkette verknüpft ist. In Verbindung mit den Ergebnissen der Einzelmolekülexperimente für DNA-gebundenes Enzym zeichnet sich somit ein komplexes Bild für die Bedeutung des konservierten Tyrosins im Polymerasezyklus ab. So zeigen die Ergebnisse, dass wahrscheinlich sowohl dem aromatischen Ring als auch der Hydroxylgruppe der Aminosäureseitenkette jeweils eine Rolle als kinetischer Schalter innerhalb der konformationellen Dynamik des Klenow-Fragmentes zuzuweisen ist. Die gemessene Fluoreszenzanisotropie zeigt keine Besonderheiten und spricht für einen unbeeinflussten Farbstoff.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



**Abbildung 41: Vergleich der Einzelmolekülergebnisse der drei funktionellen Varianten für den Enzym-DNA-dNTP-Komplex mit inkorrektem Nukleotid.** Dargestellt sind die 2D-Histogramme für die Auftragung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 1) und die Fluoreszenzanisotropie  $r$  des Donorfarbstoffes gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Zeile 2). Von links nach rechts ist der Vergleich der verwendeten Varianten Wildtyp (wt), Y766S und Y766F abgebildet. Die unterschiedlichen FRET-Linien und die Perrin-Gleichung (Tabelle 24) sind farblich hervorgehoben. Die aus den AV-Simulationen zu erwartenden Abstände sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die aus den eTCSPC Experimenten ermittelten Abstände sind durch senkrechte Linien eingezeichnet (63.2 Å grün, 52.2 Å rot, 38.7 Å violett).

Die Ergebnisse für den Komplex aus Enzym, DNA und inkorrektem Nukleotid erscheinen auf den ersten Blick identisch mit den Ergebnissen aus den entsprechenden Messungen für den Komplex aus Enzym, DNA und korrektem Nukleotid (Abbildung 40). Im Falle des Wildtyps liegt die Hauptpopulation jedoch passend zum erwarteten Abstand für die offene bzw. halboffene Konformation, während für den Komplex mit korrektem Nukleotid eine Verschiebung zu kürzeren Lebensdauern zu erkennen ist. Die Form der Population deutet auch hier auf eine konformationelle Dynamik hin. Die Variante Y766S zeigt, ebenso wie der Komplex mit korrektem Nukleotid, einen deutlich größeren Anteil an Signal bei kurzer Fluoreszenzlebensdauer im Vergleich zum Wildtyp bzw. Variante Y766F. Letztere zeigt eine langgezogene Verteilung von ca. 3.3 ns bis 1.2 ns Fluoreszenzlebensdauer.



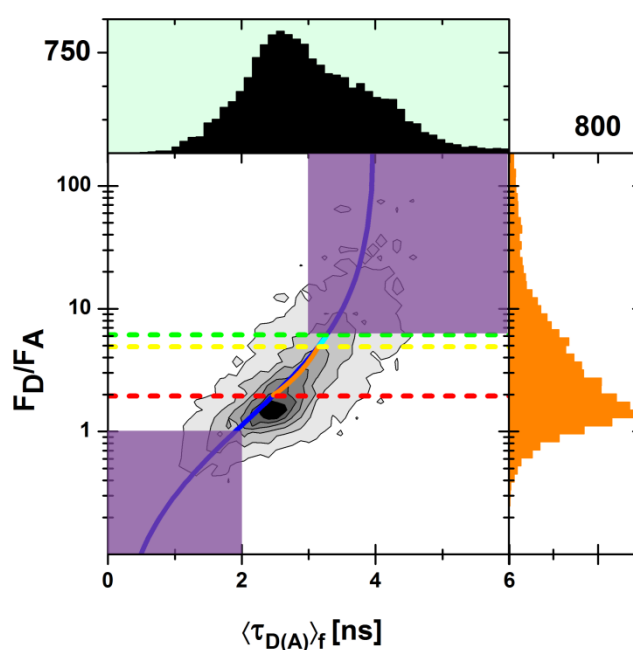
#### **4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I**

Auch diese Ergebnisse zeigen anschaulich, dass eine Zuordnung einer statischen Struktur zu diesem funktionellen Zustand nicht möglich ist. Vielmehr befindet sich das Enzym in einem komplexen dynamischen Gleichgewicht. Die Unterschiede zwischen korrektem und inkorrektem Nukleotid sind dabei kleiner als man erwarten würde, decken sich aber mit den Informationen aus Kristallstrukturen, wonach es keine gesonderte Struktur für das jeweilige Nukleotid gibt (Wu et al. 2011). Die beobachtete Fluoreszenzanisotropie zeigt wiederum keine Auffälligkeiten. Alle Einzelmolekülmessungen zeigen ein im Vergleich zu den FRET-Populationen geringes Signal bei der Standardfluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes (Alexa 488: 4ns), was die guten Ergebnisse der präparativen Arbeiten (4.3.7 Abschätzung des Markierungsgrades) bestätigt.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.3.12 Gefilterte Fluoreszenzkorrelationspektroskopie und Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion (SCCF)

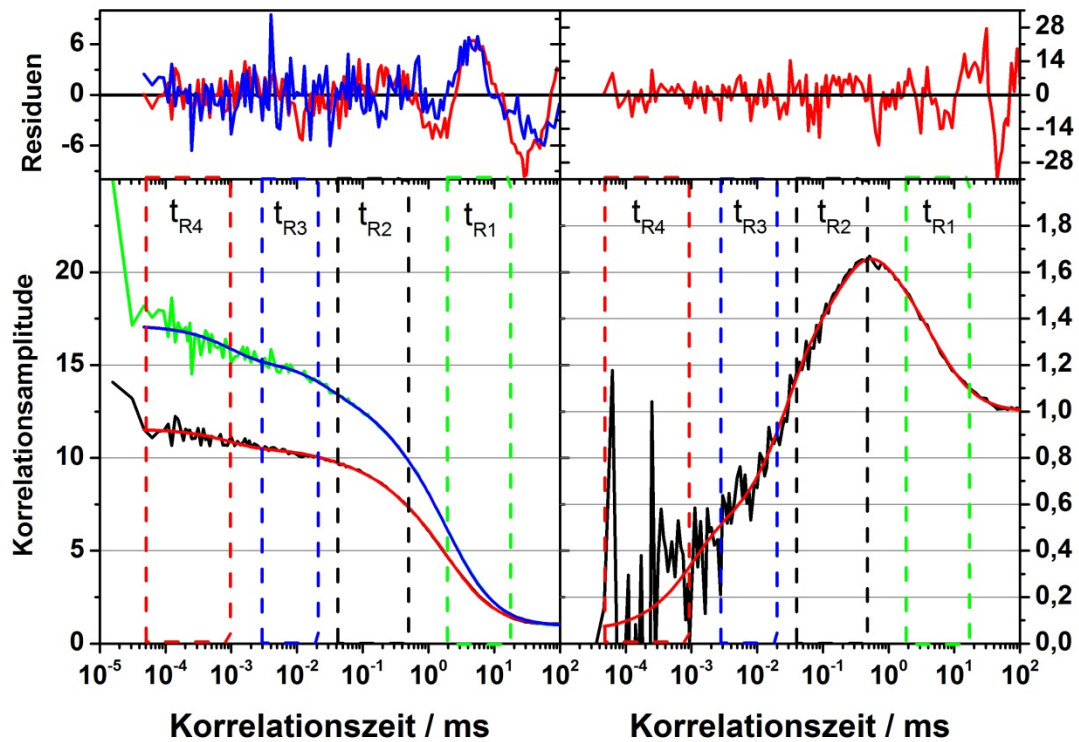
Ausgehend von den Einzelmolekülexperimenten für die Variante KF-D548C-A488-G743C-A647 wurde die CCF mittels entsprechender Software berechnet und mit einer Modellfunktion angepasst (Formel 29). Die für die Korrelation benötigten Filter wurden direkt aus den Einzelmolekülexperimenten erstellt. Hierzu wurden jeweils das Signal mit sehr kurzer Fluoreszenzlebensdauer und entsprechendem Intensitätsverhältnis und sehr langer Fluoreszenzlebensdauer und entsprechendem Intensitätsverhältnis aus den 2D-Histogrammen extrahiert (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Auswahl der Fluoreszenzereignisse aus dem 2D-Histogramm zur Erstellung von Filtern für die SCCF.** Die Abbildung zeigt schematisch die Auswahl der Fluoreszenzereignisse („bursts“), die als Grundlage für die benötigten Filter für die Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion dienen. Dargestellt ist das 2D-Histogramm einer Einzelmolekülmessung. In violett sind die Bereiche hervorgehoben, die zur Filtererstellung verwendet wurden. Parallel zu den bereits gezeigten Ergebnissen der Einzelmolekülexperimente sind die erwarteten Abstände aus den AV-simulationen sowie die statische und dynamischen FRET-Linien eingezeichnet.

Der zeitaufgelöste Fluoreszenzzerfall aus diesem Signal diente als Grundlage für den Filter der jeweiligen Fluoreszenzspezies. Um die Qualität der Modellanpassung zu verbessern, wurde die Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion global mit den jeweiligen Spezies-Autokorrelationsfunktionen angepasst.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I



0

**Abbildung 43: Beispiel der Spezies-Kreuzkorrelationsfunktion und Spezies-Autokorrelationsfunktion der Messung am freien Enzym der Variante KF-D548C-G743C.** Aufgetragen ist die Korrelationsamplitude gegen die Korrelationszeit. Das Ergebnis der Kreuzkorrelation rechts, die Autokorrelation des kompakten Zustandes links in grün und die des langen Abstandes links in schwarz dargestellt. Die Ergebnisse der global angepassten Modellfunktion sind rot bzw. blau dargestellt eingezeichnet. Die gewichteten Residuen der jeweiligen Anpassung sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt. In den beiden Graphen sind zusätzlich die jeweiligen Bereiche der vier gefundenen Relaxationszeiten ( $t_{R1}$ - $t_{R4}$ ) eingezeichnet.

Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse am Beispiel der Einzelmolekülmessung des freien Enzyms der Variante KF-D548C-G743C. Für die Spezies-Autokorrelationsfunktionen sind deutlich mehrere Bunchingterme erkennbar, die eine Depopulation der jeweiligen Spezies beschreiben. Entsprechende Antibunchingterme finden sich in der Spezies-Kreuzkorrelation. Für die Datenanalyse wurden die entsprechenden Relaxationszeiten global für die Autokorrelationskurven und die Kreuzkorrelationskurven angepasst. Die beobachteten Prozesse laufen innerhalb von Mikrosekunden bis Millisekunden ab. In allen drei Korrelationskurven ist zusätzlich ein Bunching- bzw. Antibunchingterm bei sehr kurzen Zeiten zu beobachten (~100 ns). Die aus den Einzelmolekülmessungen gewonnenen Korrelationskurven wurden mit Modellfunktionen mit 4 Relaxationszeiten angepasst. Die entsprechenden Relaxationszeiten sind in Tabelle 25 aufgeführt.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

**Tabelle 25: Relaxationszeiten aus SCCF.** \*In der Modellfunktion notwendige Relaxationszeit, die mit 10 ns nicht interpretierbar ist.

	$t_{R1}/ms$	$t_{R2}/ms$	$t_{R3}/ms$	$t_{R4}/ms$
<b>freies Enzym</b>	4.98	0.20	0.02	0.001
<b>Enzym + ATP</b>	19.98	0.27	0.03	0.0007
<b>Enzym + DNA</b>	1.27	0.08	0.01	0.0001
<b>Korrektes Nukleotid</b>	1.88	0.06	0.0004	0.00001*
<b>Inkorrektes Nukleotid</b>	1.56	0.20	0.03	0.001

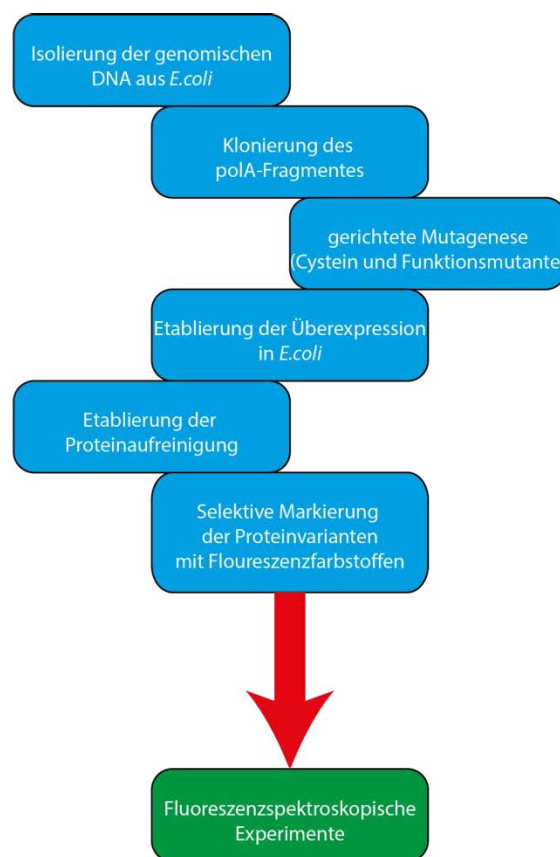
Die Ergebnisse zeigen deutliche Veränderungen der Kinetiken zwischen den funktionellen Zuständen des Enzyms. Darüber hinaus wurden insgesamt vier Relaxationszeiten gefunden, die sich bezogen auf ein System mehrerer struktureller Zustände nicht mit drei Zuständen erklären lassen. Die Relaxationszeit  $t_{R4}$  ist im Vergleich zu den anderen Zeiten sehr kurz. Es ist nicht auszuschließen dass es sich hierbei um ein Messartefakt oder einen schnellen photophysikalischen Prozess handelt, der nicht direkt mit einer strukturellen Konformationsänderung verbinden lässt. Eine Reduzierung auf drei Relaxationszeiten würde ein kinetisches Modell vereinfachen, doch auch hierbei wären drei strukturelle Konformationen nicht ausreichend.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.4 Interpretation der Ergebnisse

#### 4.4.1 Klonierung, Mutagenese, Expression und Fluoreszenzmarkierung des Klenow-Fragmentes

Ausgangspunkt des Projektes war eine Kultur von *Escherichia coli*-Zellen des Laborstammes XL2-Blue MRF. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand somit in der erfolgreichen Klonierung, Expression und Fluoreszenzmarkierung des Klenow-Fragmentes, ohne die die Fluoreszenzspektroskopischen Experimente nicht möglich gewesen wären. Eine schematische Übersicht dieser Arbeiten ist in Abbildung 44 gezeigt.



**Abbildung 44: Schematische Darstellung der präparativen Arbeiten.** Da auf keine molekularbiologischen und proteinbiochemischen Vorarbeiten zurückgegriffen werden konnte, wurden diese ausgehend von Zellmaterial aus *Escherichia coli* im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

Zusammenfassend konnten die molekularbiologischen Arbeiten, die Proteinexpression, die Proteinaufreinigung und vor allem die selektive Markierung des Proteins mit thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen mit nahezu idealem Markierungsgrad etabliert werden.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

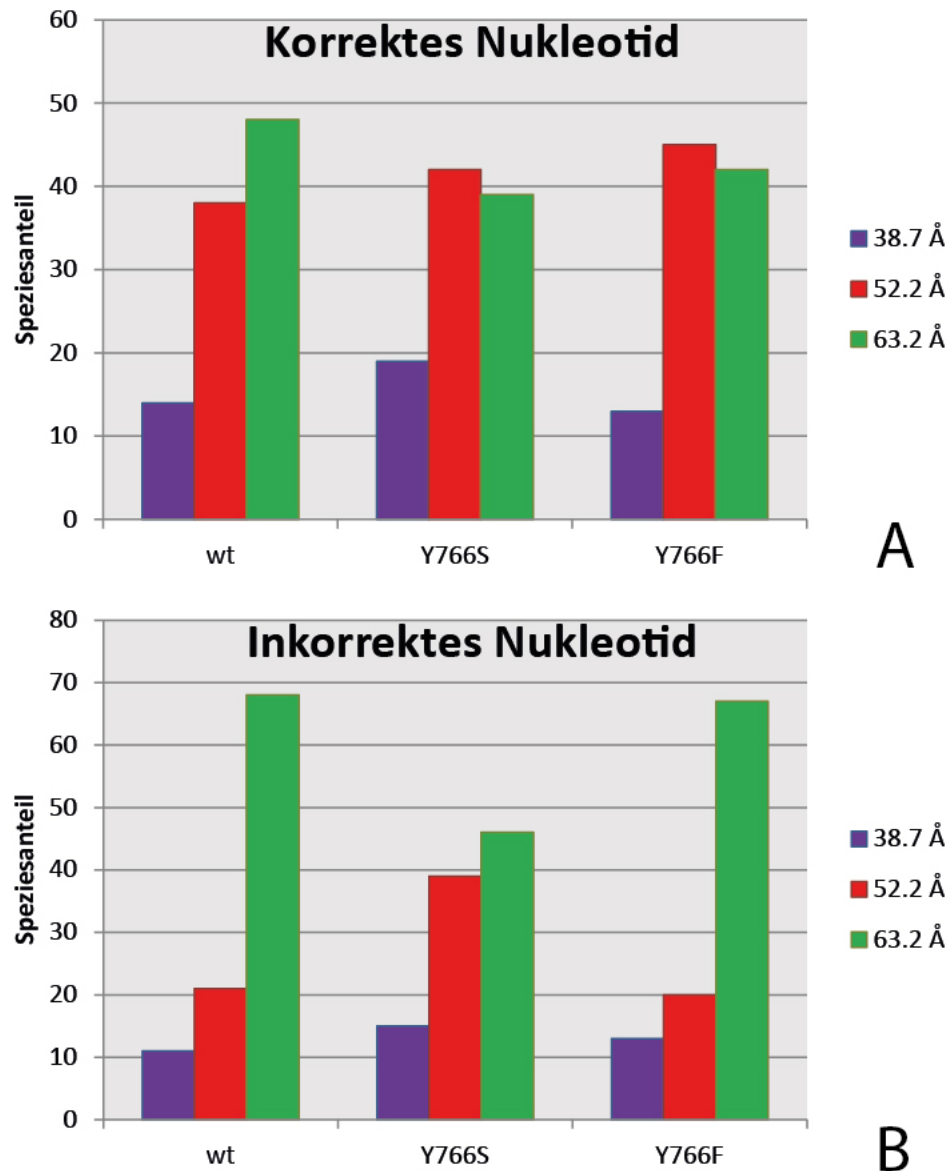
### 4.4.2 Nachweis einer bisher unbekanntem, kompakten Konformation im Klenow-Fragment

Sowohl die Ergebnisse der eTCSPC-Experimente als auch die Ergebnisse der MFD-Experimente zeigen eine Konformation mit kurzem Farbstoffabstand (entsprechend kurzer Fluoreszenzlebensdauer), die einer kompakten Struktur mit fast vollständig geschlossenem Enzym entspräche. Der Nachweis einer kurzen Lebensdauer in eTCSPC-Experimenten ist aufgrund der Breite der Geräteantwortfunktion problematisch. Durch eine globale Anpassung der Abstände für alle Messbedingungen und der damit verbundenen umfangreicheren Datenlage war eine Anpassung der Modellfunktion jedoch möglich (Thomas-Otávio Peulen, persönliche Diskussion).

Die Einzelmolekülexperimente zeigen ebenfalls eindeutig das Vorhandensein eines kurzen Abstandes. Die Abhängigkeit der jeweiligen Amplitude vom funktionalen Zustand des Enzyms (freies Enzym, DNA-Komplex, Nukleotidkomplex etc.) sowohl in eTCSPC-Experimenten als auch im MFD-Experiment sprechen dafür, dass es sich hierbei nicht um ein mögliches Messartefakt handelt. Hinweise auf eine solche kompakte Struktur finden sich bereits in Einzelmolekülexperimenten des homologen Enzyms aus *Thermus aquaticus* (Rothwell et al. 2013) sowie in Experimenten an immobilisiertem Klenow-Fragment (Berezhna et al. 2012). Während eine solche Konformation für das homologe Enzym als möglich angesehen, aber nicht weiter untersucht wurde („more closed“-Zustand in (Rothwell et al. 2013)), wurde dieser Zustand als Bindeartefakt in Messungen an immobilisierten Molekülen angesehen. Der Nachweis einer solchen Konformation liefert einen weiteren Ansatzpunkt, die hohe Replikationsgenauigkeit von DNA-Polymerasen zu erklären, da in einer solchen Konformation eine intensive Wechselwirkung des Nukleotids mit der DNA-Matrize ermöglicht wird, die die Bedeutung des bereits gezeigten halboffenen Zustandes als Kontrollpunkt im Polymerasezyklus ergänzt. Einen ersten Anhaltspunkt auf eine solche Rolle des neu gefundenen Zustands liefert ein Vergleich der Ergebnisse aus den eTCSPC-Analysen des Enzym-DNA-Komplexes mit korrektem und inkorrektem Nukleotid (Abbildung 45). Sowohl für den Wildtyp als auch für die beiden Tyrosinvarianten besitzen der lange Abstand (63.2 Å) und der mittlere Abstand (52.2 Å) Speziesanteile von ca. 40-45 % für das korrekte Nukleotid.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Wie aus den Fehlerabschätzungen hervorgeht (siehe 4.3.10.5 Fehlerabschätzung in der eTCSPC-Analyse), ist der Wert der Amplituden des langen und mittleren Abstandes fehlerbehaftet, so dass anhand der Zahlen keine quantitative, jedoch ein qualitative Aussage über die Speziesanteile dieser beiden Abstände gemacht werden kann.



**Abbildung 45: Amplitudenvergleich der eTCSPC-Ergebnisse.** Verglichen werden die Amplituden der drei in der Modellfunktion gefundenen Abstände von 63.2 Å (blau), 52.2 Å (rot) und 38.7 Å (grün) für den Komplex aus Enzym, DNA und korrektem (Teilabbildung A) bzw. inkorrektem (Teilabbildung B) Nukleotid. Dargestellt sind die Amplituden für alle drei untersuchten Varianten des Klenow-Fragmentes (Wildtyp wt, Y766S und Y766F).

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

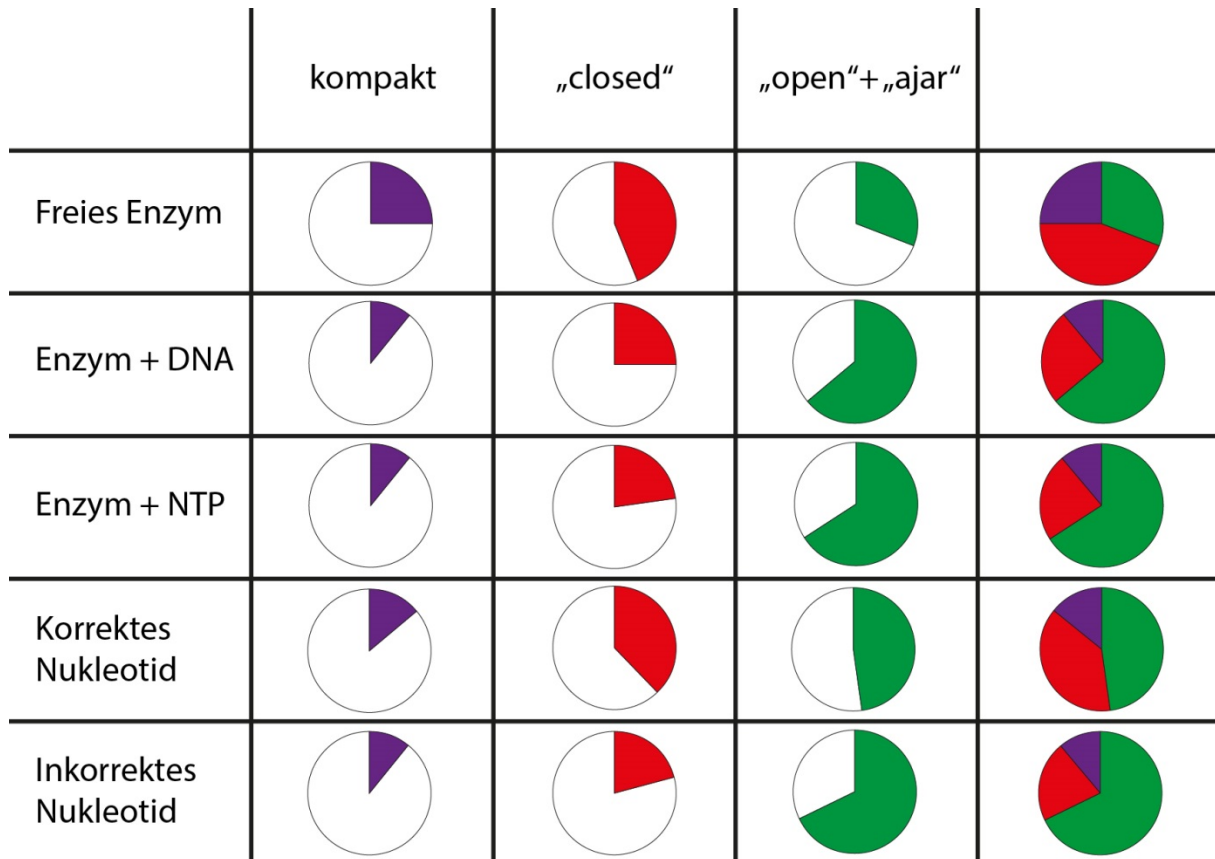
In allen drei Varianten befindet sich das Enzym folglich überwiegend in der offenen bzw. halboffenen (63.2 Å) und geschlossenen (52.2 Å) Konformation, während die kompakte Konformation einen deutlich niedrigeren Anteil aufweist. Bezogen auf die funktionellen Zustände hat das Protein das Nukleotid gebunden (halboffene Konformation) und geht in den geschlossenen Zustand über, aus dem die Synthesereaktion erfolgt (hier nicht möglich aufgrund des verwendeten Didesoxy-terminierten DNA-templates). Der kurze Abstand ist besetzt, was auf eine Rolle als intermediärer Zustand schließen lässt. Ausgehend von den Ergebnissen für das korrekte Nukleotid lässt sich nicht sagen, ob der kompakte Zustand an einem möglichen Erkennungsprozess des Nukleotids beteiligt ist.

Die Ergebnisse für das inkorrekte Nukleotid zeigen in zwei Varianten eine Verschiebung der Amplituden. Sowohl der Wildtyp als auch die bezüglich der Replikationsgenauigkeit vergleichbare Variante Y766F besetzen bevorzugt den langen Abstand und darauf folgend den mittleren Abstand. Das Enzym befindet sich somit überwiegend in der offenen Konformation, in der ein Austausch des gebundenen Nukleotides möglich wäre. Zusätzlich wird der für die Polymerasereaktion notwendige geschlossene Zustand entvölkert während der kompakte Zustand von der Besetzung her mit den Ergebnissen für das korrekte Nukleotid vergleichbar ist, was wiederum auf eine mögliche Bedeutung als Übergangszustand hindeutet. In der Variante Y766S dagegen ist kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen mit korrektem Nukleotid zu erkennen, was dem erwarteten Ergebnis für die Variante entspricht, die keine Kontrollfunktion zur Nukleotiderkennung besitzt (Minnick et al. 1999). In bisher veröffentlichten Ergebnissen konnte nicht gezeigt werden, dass der Verlust der Replikationsgenauigkeit durch eine Mutation des Tyrosin 766 mit einer fehlerhaften Besetzung des halboffenen Zustands korreliert (Wu et al. 2011) und es daher sehr wahrscheinlich noch weitere Kontrollpunkte innerhalb des Polymerasezyklus gibt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass der gefundene kompakte Zustand ein aussichtsreicher Kandidat für einen solchen Kontrollpunkt ist. Es muss jedoch betont werden, dass durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nur sehr wenige strukturelle Informationen gewonnen werden können, so dass die Existenz eines zusätzlichen Zustandes zwar gezeigt werden konnte, strukturelle Informationen jedoch durch weitere Experimente generiert werden müssen.



#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Unabhängig von einer möglichen Bedeutung des neu gefundenen Zustandes für die Replikationsgenauigkeit von DNA-Polymerasen zeigen die in den eTCSPC-Experimenten gefundene Ergebnisse, dass eine Zuordnung eines funktionellen Zustandes innerhalb des Polymerasezyklus zu einer bestimmten Struktur nicht möglich ist, da für das Enzym unabhängig von den Messbedingungen und den damit verbundenen funktionellen Zuständen alle drei Abstände gefunden wurden (Abbildung 46).



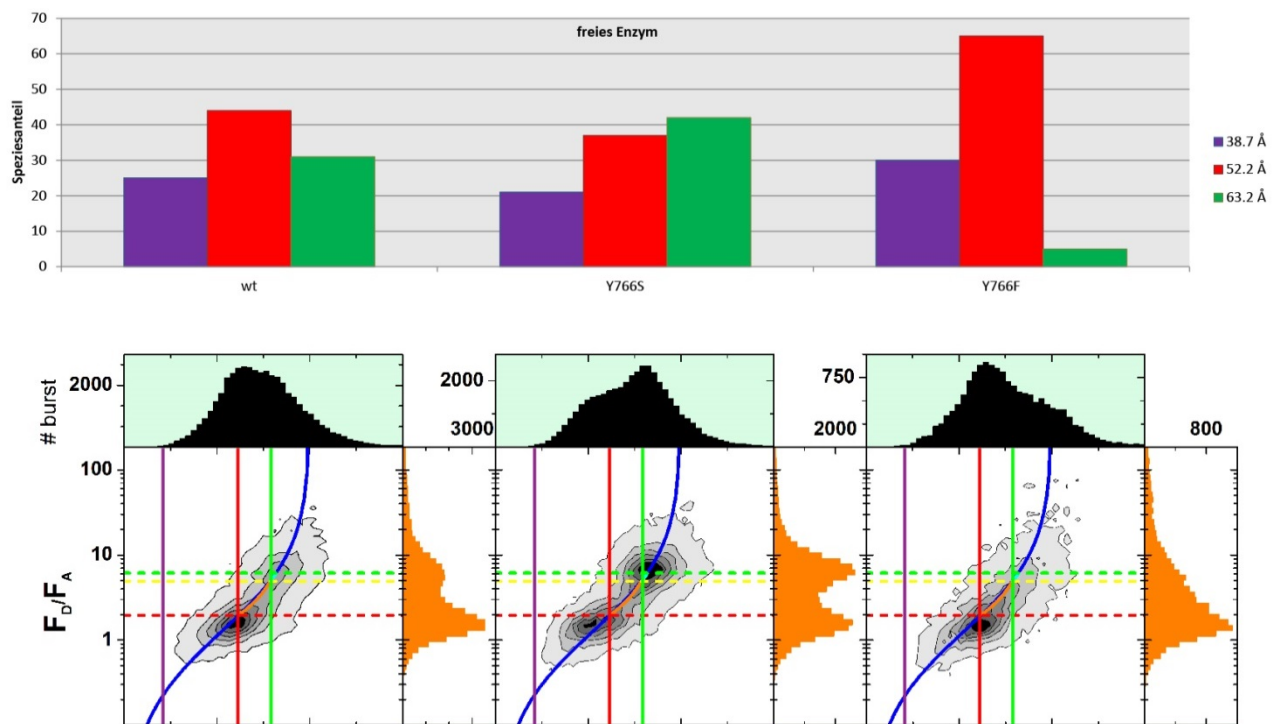
**Abbildung 46: Übersicht der Speziesanteile der gefundenen Abstände in Bezug zu den Messbedingungen für das wildtypische Enzym.** Die drei Abstände bzw. Konformationen sind spaltenweise, die unterschiedlichen Messbedingungen bzw. funktionellen Zustände zeilenweise dargestellt.

Zu erkennen ist zusätzlich der Unterschied zwischen Inkorrektem Nukleotid, bei dem sich das Enzym überwiegend in der offenen Konformation befindet, und Korrektem Nukleotide, bei dem die offene und geschlossene Konformation ungefähr gleichverteilt sind. Für eine vollständige Übersicht aller Ergebnisse siehe Anhang B.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.4.3 Die Hydroxylfunktion im Tyrosin 766 als kinetischer „Türöffner“ für die Nukleotidbindung.

Tyrosin 766 spielt eine entscheidende Rolle in der Besetzung einer offenen Konformation im Klenow-Fragment (Hohlbein et al. 2013) für das freie Enzym. Die bisherige Annahme von zwei Zuständen für das freie Enzym („open“ und „closed“) konnte jedoch weder durch eTCSPC-Ergebnisse noch durch MFD-Ergebnisse bestätigt werden. Vielmehr werden mindestens drei Abstände benötigt. Insofern ist die Bedeutung des Tyrosins weit komplexer als bisher vermutet. Ein Vergleich der Ergebnisse der Messungen des freien Enzyms zeigt, dass insbesondere die Hydroxylgruppe des Tyrosins das Gleichgewicht zwischen den Zuständen im ungebundenen Enzym beeinflusst (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Amplitudenvergleich der eTCSPC Ergebnisse für das freie Enzym.** Verglichen werden die Amplituden der drei in der Modellfunktion gefundenen Abstände von 63.2 Å (blau), 52.2 Å (rot) und 38.7 Å (grün) für das freie Enzym (obere Abbildung). Dargestellt sind die Amplituden für alle drei untersuchten Varianten des Klenow-Fragmentes (Wildtyp wt, Y766S und Y766F). Als Vergleich ist unterhalb der Teilabbildung das Ergebnis der Einzelmolekülexperimente dargestellt (Abbildung unten). Dargestellt sind die 2D-Histogramme für die Auftragung des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes. Die FRET-Linien entsprechen den bereits gezeigten Funktionen (Tabelle 24). Zusätzlich eingetragen sind horizontal die erwarteten Abstände aus den Kristallstrukturen und vertikal die Abstände aus den eTCSPC Experimenten.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Der lange Abstand (63.2 Å) ist nur minimal besetzt und das Enzym nimmt überwiegend die neue, kompakte Konformation und die geschlossene Konformation ein. Dieses Ergebnis wird durch die Einzelmolekülexperimente bestätigt. Die gefundenen Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte Daten (Hohlbein et al. 2013), wonach das Protein den geschlossenen Zustand bevorzugt besetzt, wenn die Hydroxylfunktion fehlt. Die Einzelmolekülergebnisse zeigen dabei deutlich, dass dieser geschlossene Zustand einer dynamischen Population zwischen multiplen Zuständen und nicht einer bestimmten strukturellen Konformation entspricht. Für die entsprechend inverse Variante Y766S wird dagegen ein Gegenteiliges Verhalten beobachtet. Hier steigt die Amplitude für den langen Abstand, was ebenfalls durch die Einzelmolekülergebnisse bestätigt wird. Die gefundenen Ergebnisse zeigen, dass diese Verlagerung des Strukturgleichgewichtes sowohl mit der Hydroxylgruppe als auch dem aromatischen Ring der Tyrosinseitenkette verknüpft ist. Anhand der eTCSPC-Ergebnisse als auch der Einzelmolekülmessungen sind bezüglich des Einflusses der Tyrosinseitenkette somit zwei gegenläufige Korrelationen zu beobachten. So führt das Fehlen des aromatischen Rings zu einer stärkeren Besetzung der langen Abstandspopulation, während ein Fehlen der Hydroxylgruppe zu einer Verlagerung hin zu kürzeren Abstandspopulationen führt. Obwohl die Hydroxylfunktion keine Auswirkungen auf die Replikationsgenauigkeit der Polymerase zu haben scheint, beeinflusst sie sehr wohl das Gleichgewicht der Populationen innerhalb des Molekülensembles.

Die Lage der dynamischen Population in den Einzelmolekülexperimenten zeigt zudem, dass der neue Zustand als Intermediat zwischen der offenen und geschlossenen Konformation zu finden ist. Eine dynamische Population befindet sich immer zwischen den beiden Grenzzuständen. Da diese Population im Falle des Klenow-Fragmentes jedoch zwischen der offenen und einer kompakten Konformation liegt, muss auch der dynamische Austausch zwischen diesen beiden Populationen stattfinden und somit innerhalb des Polymerasezyklus zwischen dem offenen Zustand der Substratbindung und dem geschlossenen Zustand der katalytischen Aktivität.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

### 4.4.4 Vorschlag eines neuen kinetischen Modells der strukturellen Dynamiken im Klenow-Fragment

Die bisherigen Modelle für die Beschreibung der strukturellen Dynamik von Familie A Polymerasen gehen von drei bis vier Zuständen aus (Berezhna et al. 2012; Hohlbein et al. 2013; Rothwell et al. 2013). Mit dem Nachweis einer versteckten, kompakten Struktur, die innerhalb des Polymerasezyklus in allen funktionellen Zuständen vorhanden ist, müssen diese Modelle überdacht werden. Die aus der Spezies-Kreuzkorrelation gewonnenen vier Relaxationszeiten lassen sich ebenfalls nicht mit den bisher veröffentlichten Modellen erklären, ebenso die dynamischen Populationen der Einzelmolekülexperimente. Basierend auf einem linearen Modell mit mehreren Zuständen wird daher ein neues kinetisches Modell vorgeschlagen (Abbildung 48). Es basiert auf den aus den Kristallstrukturen und veröffentlichten Einzelmolekülexperimenten bekannten Zuständen („open“, „ajar“ und „closed“) und erweitert das bisherige Zustandsmodell (Hohlbein et al. 2013) um eine kompakte Struktur, die aus den gefundenen eTCSPC Ergebnissen abgeleitet wurde.

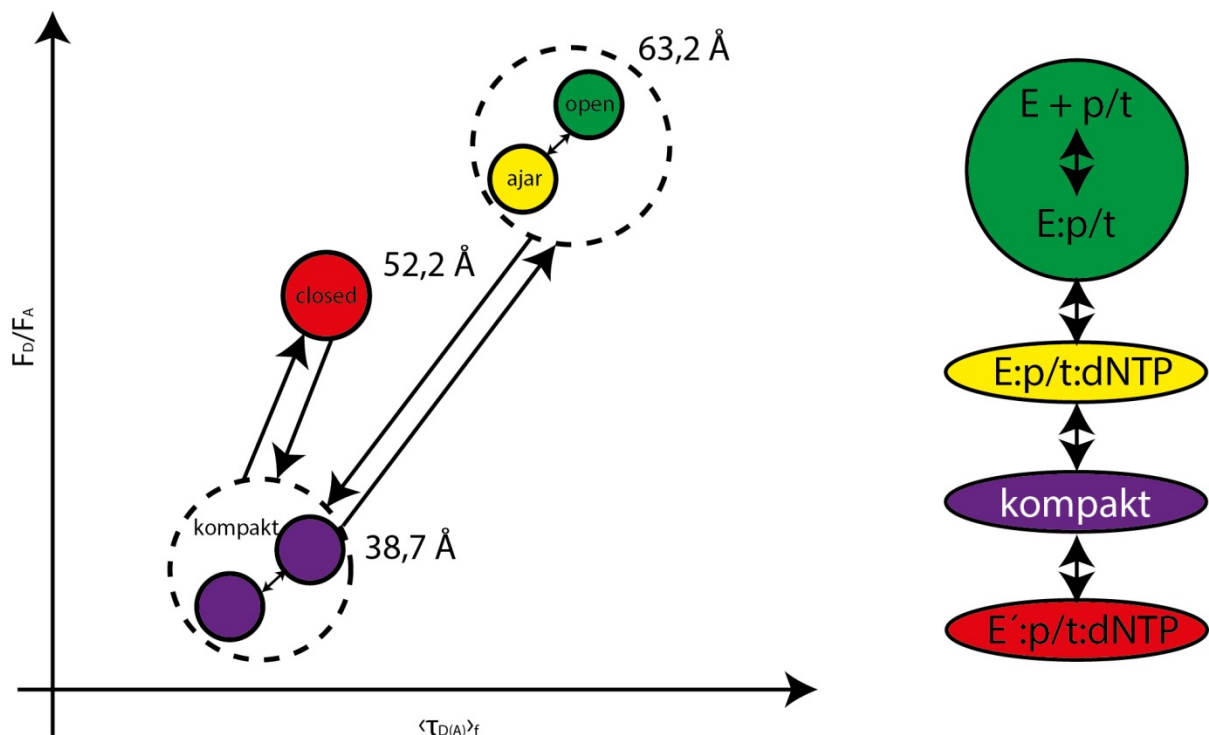
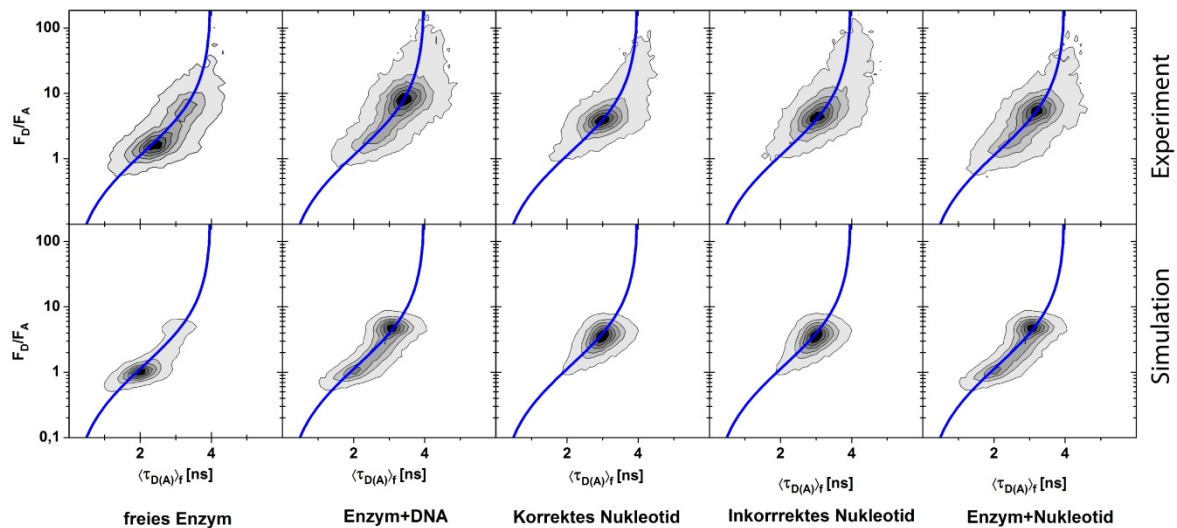


Abbildung 48: Kinetisches Modell der Polymerasefunktion mit 5 Zuständen. Links: Neben den bekannten Zuständen „open“, „ajar“ und „closed“ ist ein zusätzlicher, kompakter Zustand (violett) eingetragen. Die aus den eTCSPC ermittelten Abstände sind zusätzlich angeführt. Bezüglich des Farbstoffabstandes ähnliche Zustände, die in eTCSPC-Experimenten nicht aufgelöst werden konnten, sind durch gestrichelte Kreise zusammengefasst. Rechts: Einordnung des kompakten Zustandes in den Polymerasezyklus. Farben entsprechend Abbildung links.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Um das Model zu überprüfen wurden Einzelmolekülexperimente simuliert (Abbildung 49). Ausgangspunkt der Simulationen waren die aus den eTCSPC-Experimenten gewonnenen Abstände, die sich sowohl mit den Ergebnissen aus den Einzelmolekülexperimenten als auch mit den aus den Kristallstrukturen erwarteten Abständen decken, und die aus den Korrelationsergebnissen gewonnene Relaxationszeiten. Hervorzuheben ist dabei, dass für die Simulation der Einzelmolekülexperimente vier Relaxationszeiten entsprechend den Ergebnissen der Korrelationsexperimente verwendet wurden.

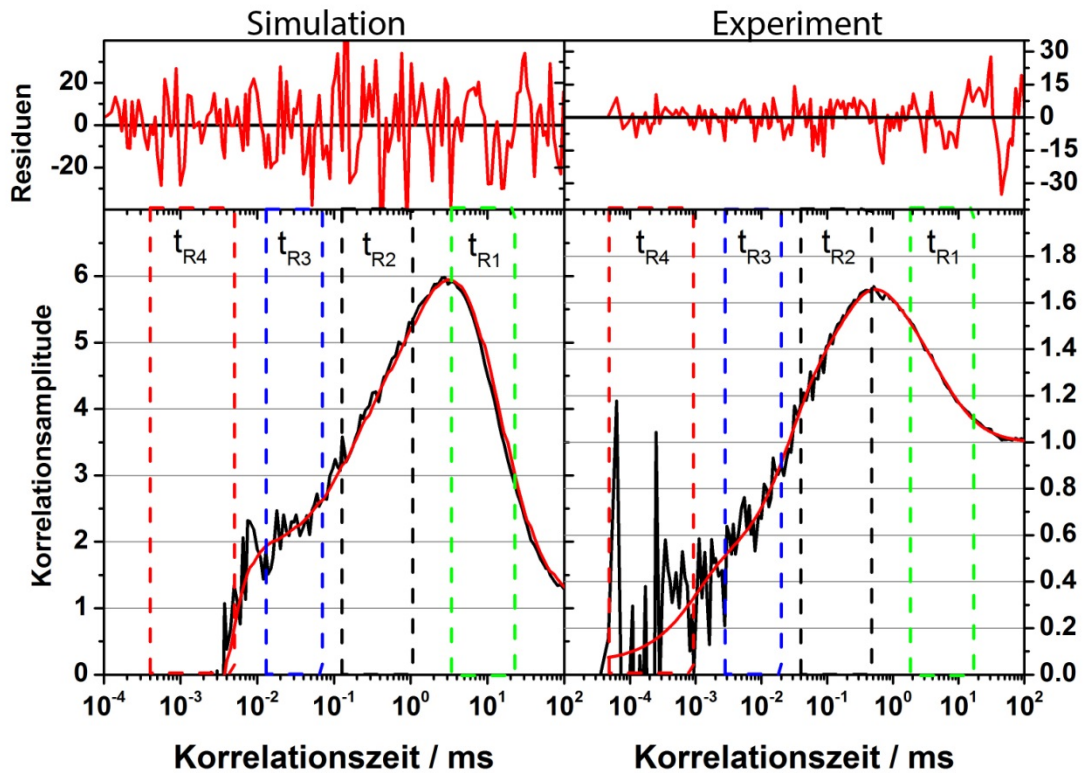


**Abbildung 49: Vergleich der Experimentellen Ergebnisse (oben) mit den Simulationen (unten).** Simuliert wurden Einzelmolekülexperimente ausgehend von den Ergebnissen für den Wildtyp. Dargestellt sind die 2D-Histogramme der Auftragung des Intensitätsverhältnisses gegen die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs für die fünf funktionellen Zustände des Enzyms. Zur besseren Orientierung ist in allen Histogrammen die statische FRET-Linie (blau) eingezeichnet.

Die Simulationen zeigen eine Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen sowohl was die Lage, als auch die Form der Populationen im 2D-Histogramm betrifft. Ausgehend von den Simulationsergebnissen für das freie Enzym wurde die Spezieskreuzkorrelationsfunktion berechnet. Abbildung 50 zeigt den Vergleich zwischen Simulation (links) und Experiment (rechts). Parallel zu den Einzelmolekülergebnissen lässt sich auch die Spezieskreuzkorrelation in der Simulation widerfinden.

#### 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

Der neue Zustand liegt somit zwischen dem offenen bzw. nukleotidgebundenem Enzym und der geschlossenen Konformation, in der die Polymerisationsreaktion erfolgt und stellt in unserem Modell einen weiteren möglichen Kontrollpunkt für die Diskriminierung zwischen komplementärem und nichtkomplementärem Nukleotid dar.



**Abbildung 50: Vergleich der Kreuzkorrelationskurven für Simulation und Experiment.** Dargestellt ist die Kreuzkorrelationskurve der Simulation für das freie Enzym (links) zusammen mit den experimentellen Ergebnissen (rechts). Der obere Teil der Abbildung zeigt die Residuen einer entsprechenden Modellfunktion, der untere Teil die Kreuzkorrelation in schwarz und die Überlagerung einer Anpassungsfunktion in rot. Für eine vollständige Auflistung der Ergebnisse siehe Anhang B. Eine Übersicht der angepassten Zeiten ist in **Tabelle 25** gegeben.

Ausgehend von den vier Relaxationszeiten der Kreuzkorrelationsergebnisse und den Simulationen wurden zwei funktionelle Zustände mit kurzem Farbstoffabstand benötigt, um die experimentellen Einzelmolekülergebnisse simulieren zu können. Das hier vorgestellte Modell erklärt sowohl die in dieser Arbeit gefundenen strukturellen als auch kinetischen Ergebnisse und erweitert bereits bestehende Modelle. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Modell mit nur vier funktionellen Zuständen ebenfalls zu ähnlichen Ergebnissen führen kann. Die experimentellen Ergebnisse sprechen jedoch für ein Modell mit fünf Zuständen.

## 4 Struktur-Funktionsbeziehungen des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I

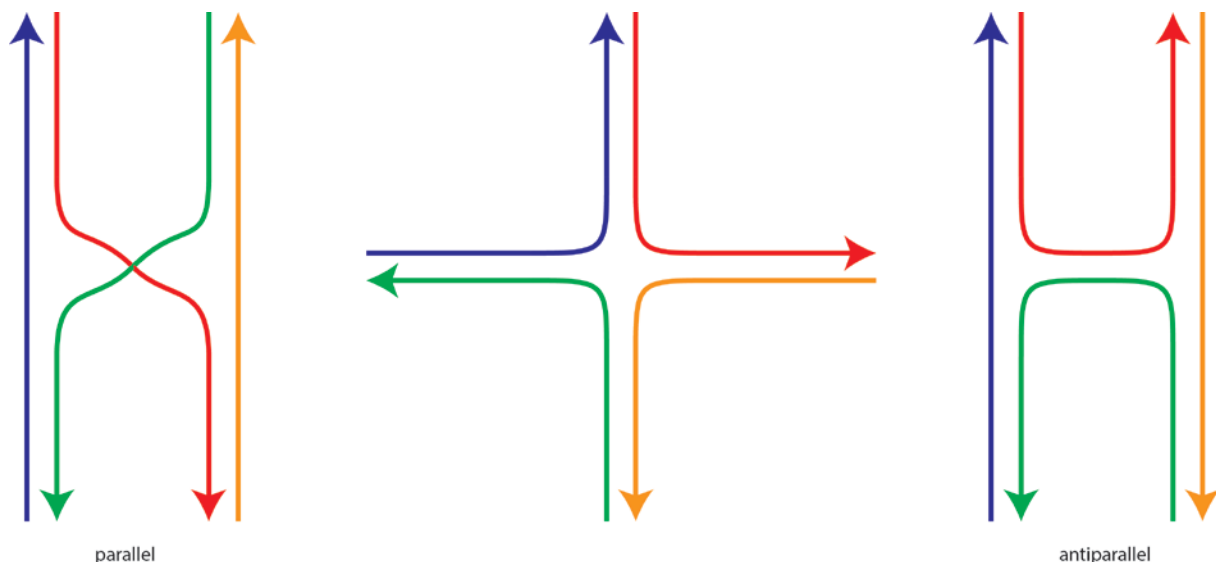
### 4.4.5 Ansatz zur weiteren Überprüfung des Modells

Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Bedeutung des konservierten Tyrosins für die Polymerasefunktion und besonders dessen Einfluss auf die Replikationsgenauigkeit im Zusammenhang eines bestehenden kinetischen Modells. Der Nachweis eines zusätzlichen strukturellen Zustandes und dessen Einbeziehung in ein erweitertes kinetisches Modell machen deutlich, dass es in dieser Hinsicht noch weiterer Experimente bedarf, um das Geheimnis der Polymerasefunktion vollends aufzuklären.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse basieren auf Experimenten anhand eines einzelnen FRET-Paares innerhalb der Struktur des Klenow-Fragmentes. Der Farbstoffabstand wurde dabei anhand bereits bekannter Strukturinformationen gewählt. Für die bereits bekannten Strukturen ist dieser Farbstoffabstand geeignet, um kinetische und strukturelle Informationen mittels FRET-Spektroskopie zu untersuchen. Der in dieser Arbeit nachgewiesene neue, kompakte Zustand des Enzyms führt jedoch zu einem für die FRET-Spektroskopie sehr kurzem Abstand zwischen den Farbstoffen. Um detailliertere Aussagen über strukturelle Eigenschaften dieses Zustandes machen zu können, wäre eine entsprechende Neupositionierung der Farbstoffe bzw. der Aufbau eines Abstandsnetzwerkes zur Strukturaufklärung denkbar.

### 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

Holliday-Strukturen (Holliday 1964) spielen eine entscheidende Rolle in der Rekombination von DNA-Molekülen und sind somit involviert in die Reparatur von beschädigter Erbinformation als auch in die Neukombination von bereits bestehendem genetischem Material zur Aufrechterhaltung der genetischen Vielfalt (Broker et al. 1971; Sigal et al. 1972; Schwacha et al. 1995). Die Holliday-Struktur besteht dabei aus vier DNA-Strängen, die eine vierarmige Struktur ausbilden. Ausgehend von zwei parallelen Helices ergeben sich zwei mögliche Strukturen, die angenommen werden können, und die als parallel bzw. antiparallel bezeichnet werden (Abbildung 51). Dabei ging man davon aus, dass die parallele Form aufgrund einer für die Rekombination bereits vorliegenden Kreuzung der Stränge wahrscheinlicher sei. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Holliday-Struktur eine antiparallele, rechts gedrehte Konformation einnimmt, bei der jeweils zwei Arme einen Winkel von  $60^\circ$  aufspannen (Duckett et al. 1988; Murchie et al. 1989; Eichman et al. 2000). Innerhalb dieser Anordnung sind wiederum zwei unterschiedliche Konformere denkbar, die sich in der Orientierung der Arme unterscheiden (Abbildung 52). Diese Konformationen werden durch zweiwertige Metallionen stabilisiert und stehen in einem Gleichgewicht zueinander. Dieses Gleichgewicht ist dabei abhängig von der Basensequenz im Zentrum der Struktur.

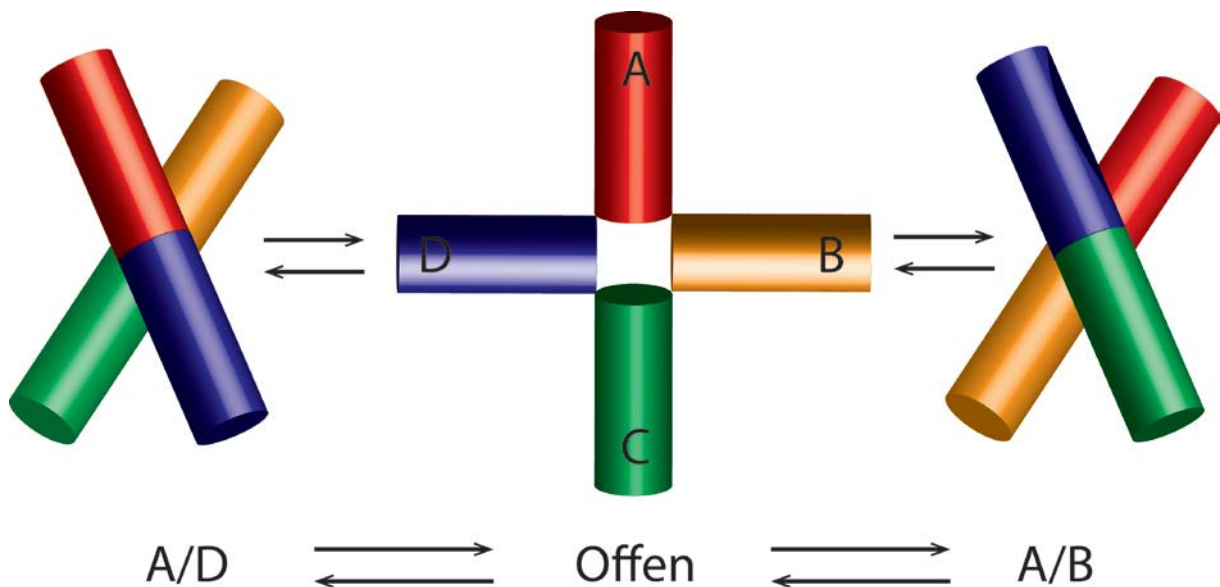


**Abbildung 51: Schematische Darstellung der Holliday-Struktur.** Gezeigt wird der schematische Aufbau der Struktur aus vier unterschiedlichen Strängen (mitte) und eine mögliche parallele (links) und antiparallele (rechts) Anordnung der vier Einzelstränge. Die Pfeile zeigen die Orientierung (5'-3') der einzelnen Stränge an.



## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

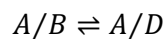
Eine mögliche Erklärung dieser Stabilisierung liegt in einer Abschirmung des stark negativ geladenen Phosphatrückrats der DNA durch die positiven Ionen, was eine Annäherung der Arme zueinander ermöglicht und somit die Struktur stabilisiert. Sowohl experimentelle Studien als auch Computersimulationen haben dagegen gezeigt, dass zweiwertige Ionen spezifisch innerhalb der Holliday-Struktur binden können (Mollegaard et al. 1994; Olmsted et al. 1994; Fenley et al. 1998; Nowakowski et al. 1999; Lilley 2000). Die Holliday-Struktur steht somit in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen zwei Grenzkonformeren. Während das Gleichgewicht selbst nicht von der Ionenkonzentration abhängig ist, wird die Rate, mit der das Molekül zwischen den beiden Konformationen wechselt, von der Ionenkonzentration beeinflusst. Auf der Grundlage von Einzelmolekülstudien und Elektrophorese-Experimenten wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem das Molekül über eine „offenen“ Konformation zwischen den beiden Grenzstrukturen wechselt, wobei die Dissoziation der gebundenen Ionen diesen offenen Zustand induziert (McKinney et al. 2003; Joo et al. 2004; Lilley 2008). Daraus ergibt sich ein kinetisches Modell (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Kinetisches Modell des Konformationsüberganges.** Die Zwei Grenzkonformationen A/B und A/D sind ineinander überführbar, wobei eine offene Struktur als Übergangszustand postuliert wird. Die vier Arme (A, B, C, D) sind farbcodiert dargestellt.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

Experimentell konnte die offene Konformation unter Pufferbedingungen, die zweiwertige Ionen enthalten, nicht nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die offene Konformation einen kurzlebigen Übergangszustand darstellt, bzw. die Geschwindigkeitskonstanten der Faltungsprozesse mehrere Größenordnungen größer sind, als die der Entfaltungsprozesse. Das kinetische Modell vereinfacht sich dadurch zu einem Übergang zwischen zwei Zuständen.



Formel 58

Die korrespondierenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_{12}$  für den Übergang von A/B nach A/D bzw.  $k_{21}$  sind dabei abhängig von der jeweiligen Holliday-Struktur und der Magnesiumkonzentration des Mediums. Die in dieser Arbeit untersuchte Holliday-Struktur wurde bereits ausführlich in Einzelmolekül-Experimenten in Lösung beschrieben (Valeri 2009). Die dort präsentierten Daten zeigten einen alternativen, kinetischen Mechanismus auf, beschränkten sich dabei jedoch auf Magnesiumkonzentrationen bis 10 mM. Die hier gezeigten Daten erweitern diese Studie um Messungen bei hohen Magnesiumkonzentrationen.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

### 5.1 TIRF-Mikroskopie/Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie

Die Totale Interne Reflexion Fluoreszenzmikroskopie (TIRF-Mikroskopie) stellt eine Möglichkeit dar, die Vorteile von klassischer Weitfeldfluoreszenzmikroskopie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu vereinen. Während in der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie durch die großflächige Anregung mehrere Bereiche einer Probe gleichzeitig beobachtet werden können, ist der Kontrast zwischen dem eigentlichen Fluoreszenzsignal und eventueller Hintergrundfluoreszenz durch die schlechte Auflösung in der optischen Achse limitiert. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie dagegen wird eine hohe Auflösung entlang dieser Achse erreicht. Die Probe wird hierbei jedoch durch einen Laser gerastert abgebildet, woraus in Abhängigkeit der absoluten Bildauflösung eine schlechte Zeitauflösung des Fluoreszenzsignales resultiert. Die TIRF-Mikroskopie dagegen ermöglicht eine hohe Zeitauflösung bei gleichzeitig hoher Auflösung entlang der optischen Achse und somit ausreichendem Kontrast zwischen Signal und Hintergrund. Physikalisch basiert die Mikroskopie dabei auf der Totalreflexion eines Lichtstrahles während des Übergangs zwischen zwei optisch unterschiedlichen Medien, was durch das Snelliussche Gesetz beschrieben wird.

$$n_1 \cdot \sin(\delta_1) = n_2 \cdot \sin(\delta_2)$$

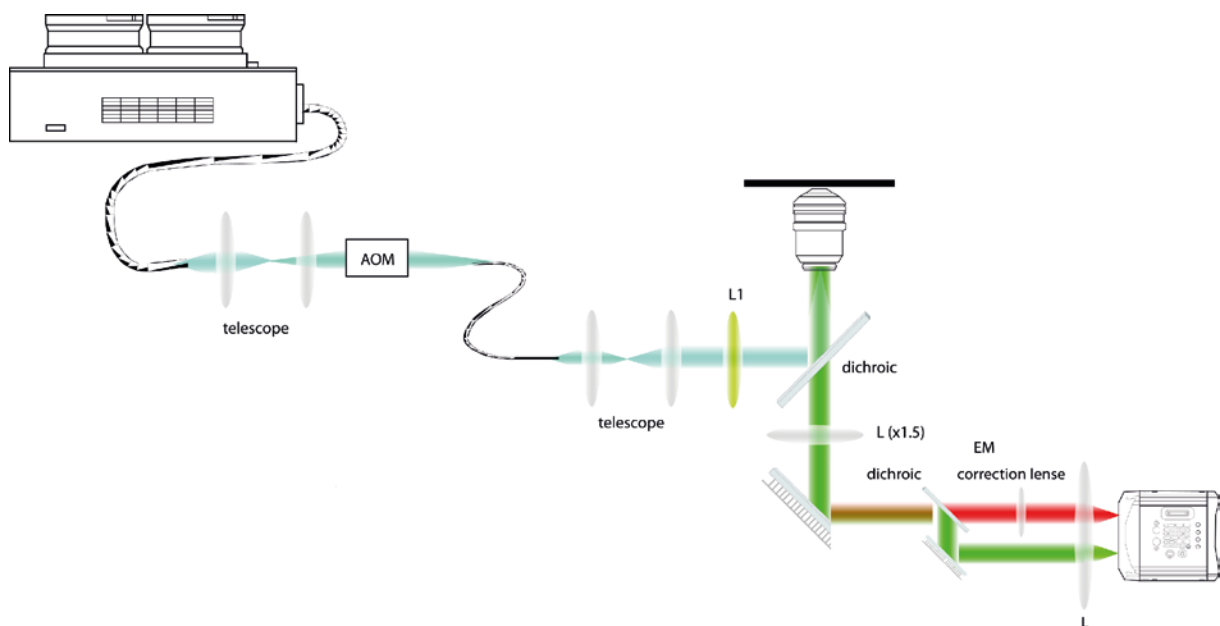
Formel 59

$n_1$  und  $n_2$  beschreiben dabei die Brechungsindizes der beiden Medien,  $\delta_1$  und  $\delta_2$  die Winkel zwischen dem ein- bzw. ausfallenden Lichtstrahl und dem auf der Grenzfläche zwischen den beiden Medien stehenden Lot.

Im Falle eines Überganges in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex, wie zum Beispiel einer Glas-Wasser-Grenzfläche, kann es zu einer Totalreflexion kommen, bei der sich ein exponentiell abfallendes, evaneszentes Feld auf der Seite mit niedrigerem Brechungsindex ausbildet. Der Intensitätsabfall ist abhängig von den Brechungsindizes und der Wellenlänge des Lichtes. Für typische TIRF-Verhältnisse ist jedoch bereits nach  $1\mu\text{m}$  oberhalb der Grenzfläche keine nennenswerte Intensität mehr vorhanden, was die TIRF-Mikroskopie ideal für die Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie von an Oberflächen immobilisierten Molekülen macht.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau wurde in der Arbeitsgruppe Seidel selbst gebaut (Marawske 2011). Als Lichtquelle wurde ein fasergekoppelter Argon-Ionenlaser verwendet (543-AP-A02, Melles Griot). Über ein Teleskop wurde der Lichtstrahl in einen Akkusto-optischen Modulator geleitet (AOM), der innerhalb des Setups zur Intensitätsregelung und als regulierbarer, schneller Verschluss benutzt wurde (AOM-80, APE). Über eine optische Faser, ein Teleskop zur Aufweitung des Strahls und eine finale Fokuslinse wurde das Licht auf die Rückapertur des verwendeten Objektivs innerhalb des Mikroskops fokussiert (Olympus IX70 mit PlanApo 60x\1.45 Objektiv). Sowohl die Anregung, als auch die Detektion erfolgte dabei über das Objektiv. Zur Trennung der beiden Signale befand sich innerhalb des Mikroskops ein dichroider Filter (zt 491 RDCXT, AHF Analysentechnik). Die für eine Totalreflektion nötige Verkippung des Anregungslichtstrahles wurde über einen justierbaren Spiegel außerhalb des Mikroskops gewährleistet. Das emittierte Fluoreszenzlicht von FRET-Molekülen wurde spektral mittels eines Farbteilers in einen grünen und einen roten Detektionskanal getrennt (Optosplit, Cairn mit HC BS 580 Imaging, AHF Analysentechnik), der zwischen dem Mikroskop und der zur Detektion verwendeten Kamera (emCCD, DV887 ECS BV, Andor) montiert wurde. Die farblich getrennten Signale wurden zusätzlich durch Bandbreitenfilter (grün, HQ535/50, rot: 680/60, AHF Analysentechnik) gereinigt und mittels einer Korrekturlinse auf die Kamera fokussiert. Abbildung 53 zeigt eine schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus.



**Abbildung 53: Schematische Darstellung des verwendeten TIRF-Aufbaus.** Das Bild wurde entnommen aus (Marawske 2011) und modifiziert. Für eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus siehe Text.

### 5.2 Präparation von Avidin-modifizierten Glasoberflächen

Um einzelne Moleküle über einen längeren Zeitraum mittels Fluoreszenzspektroskopie analysieren zu können, müssen diese immobilisiert werden. Die Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie nutzt hierbei die Immobilisierung der Moleküle an Glasoberflächen (Ha 2001; Roy et al. 2008). Die Verwendung von qualitativ hochwertigen Glasoberflächen ist dabei essentiell, um das durch das Glas hervorgerufene Hintergrundsignal so niedrig wie möglich zu halten. Die Art und Weise, wie das Molekül an der Oberfläche verankert wird, spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Im Idealfall beeinträchtigt die Bindung zwischen Oberfläche und Molekül nicht dessen Verhalten. Aufgrund der in der Einzelmolekülspektroskopie verwendeten Konzentrationen muss die Affinität entsprechend hoch sein. Für biologische Makromoleküle wie DNA und Proteine hat sich die Verwendung eines Biotin-Tags etabliert (Zhuang et al. 2000; Ha et al. 2002). Hierbei wird die hohe Affinität von Biotin gegenüber Avidin ausgenutzt, die zu den stärksten Bindungen zwischen Biomolekülen zählt (Sin et al. 2006).

Die Glasoberfläche wurde zunächst gereinigt und anschließend mittels eines Plasma-Cleaners aktiviert. Die aktivierte Oberfläche wurde aminiert und anschließend getrocknet. In diesem Zustand sind die Oberflächen einige Tage lagerfähig. Die aminierten Oberflächen sind reaktiv gegenüber N-Hydroxysuccinimid-Estern (NHS-Ester) (Anderson et al. 1963). Kommerziell erhältliche Polyethylenglykole (PEG) können somit in einer einfachen Reaktion kovalent auf die Glasoberfläche aufgebracht werden. In diesem Schritt wurde eine 5 zu 1 Mischung aus methyliertem Polyethylenglykol (NHS-PEG-OMe) und biotinyliertem Polyethylenglykol (NHS-PEG-Biotin) verwendet. Durch diese Mischung wurde eine zu hohe Dichte an Biotin auf der Oberfläche verhindert. Die Verwendung von PEG-Derivaten hat den zusätzlichen Nutzen, dass die Glasoberfläche gegenüber einer unspezifischen Bindung weiter passiviert wird. Nach einer kurzen Inkubation in Pufferlösung mit Avidin bilden sich Biotin-Avidin-Komplexe. Avidin besitzt vier Bindestellen für Biotin, so dass sich biotinylierte Moleküle nun auf der Oberfläche immobilisieren lassen. Das verwendete Protokoll zur Präparation der Oberfläche basiert auf in der Arbeitsgruppe vorhandenen Protokollen (Janissen 2008) und ist in Abbildung 54 zusammengefasst.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

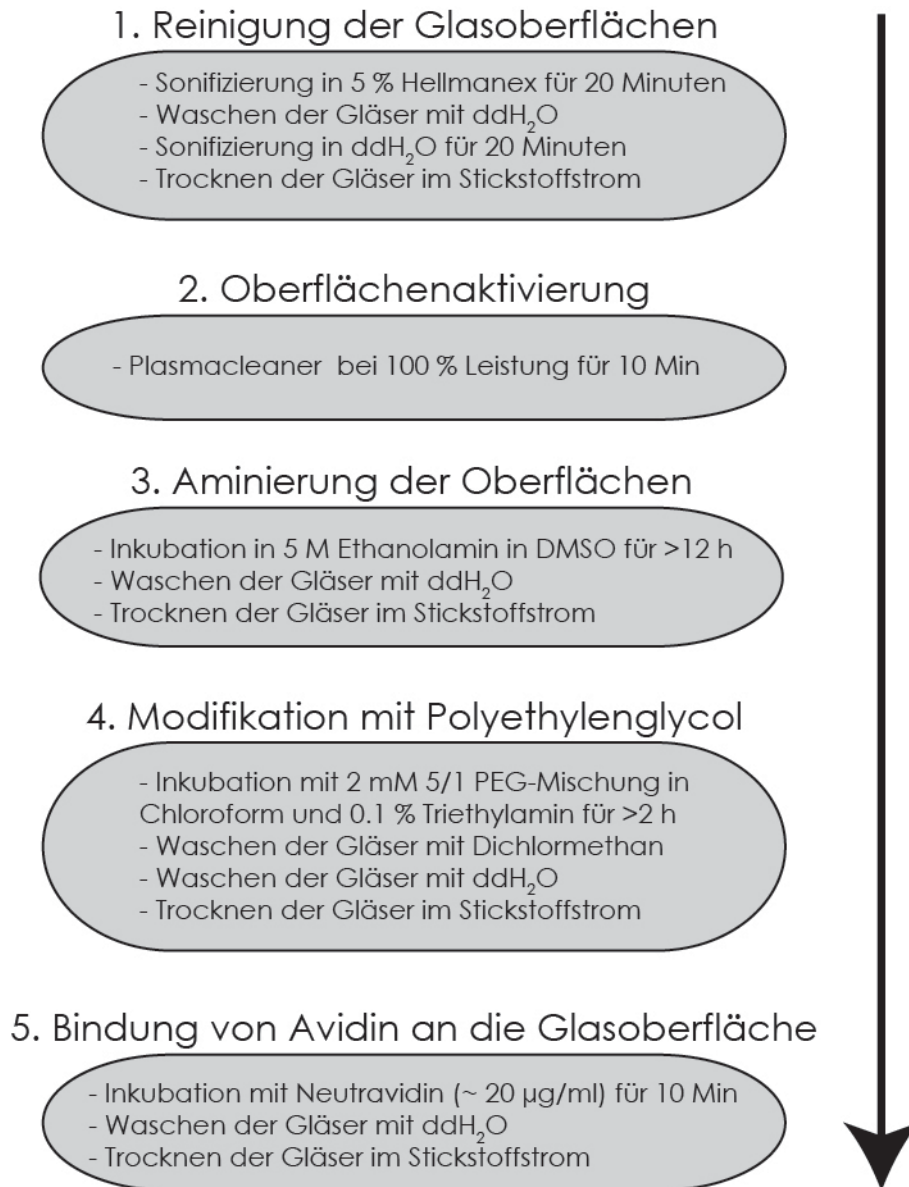


Abbildung 54: Flussdiagramm der Oberflächenpräparation zur Immobilisierung von biotinylierten Makromolekülen.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

### 5.3 Hybridisierung und Immobilisierung der Holliday-Struktur

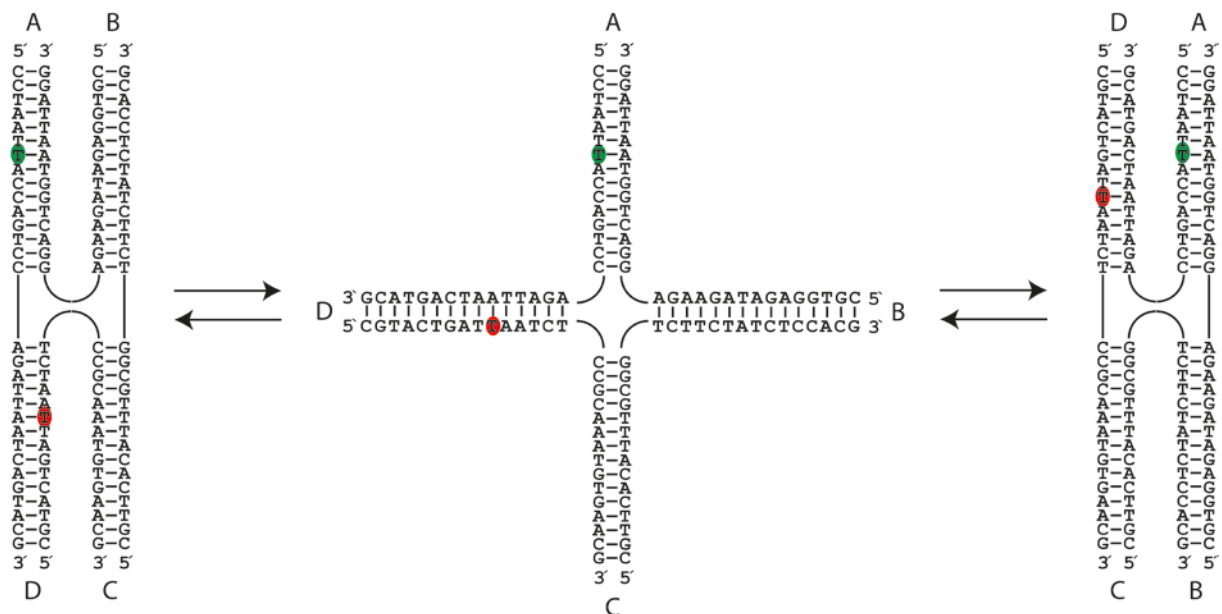
Für die Markierung der farblich hervorgehobenen Nukleotide mit den genannten Farbstoffen wurde ein C6-Aminolinker verwendet. Zur Immobilisierung auf einer Avidin-modifizierten Oberfläche trägt ein weiterer Strang eine Biotin-Gruppe am 5'-Ende. Die Basenabfolge der vier Stränge wurde so gewählt, dass eine Wanderung der Kreuzung entlang der Stränge nicht stattfinden kann. Die Position der Farbstoffmarkierung wurde anhand der A/B- und A/D-Grenzkonformere (Abbildung 55) gewählt. Während des Überganges von einem Konformer zum anderen kommt es dabei zu einer Abstandsänderung von 40 Å (A/B) auf 50 Å (A/D) (Valeri 2009). Die zu untersuchende Holliday-Struktur wurde aus vier kommerziell synthetisierten DNA-Strängen hybridisiert (Purimex, Grebenstein, Deutschland).

HJ\_1N\_D2: 5' d(CCT AAT **T(Alexa488)** AC CAG TCC AGA TTA ATC AGT ACG)

HJ\_2N\_A2: 5' d(CGT ACT GAT **T(Atto647N)** AA TCT CCG CAA ATG TGA ACG)

HJ\_3N\_Bio: 5' **Biotin** d(CGT TCA CAT TTG CGG TCT TCT ATC TCC ACG)

HJ\_4N: 5'-d(CGTGGAGATAGAAGAGGACTGGTAATTAGG)



**Abbildung 55: Markierungspositionen in den beiden Grenzstrukturen und der offenen Struktur der untersuchten Holliday-Struktur.** Die Position der Farbstoffe ist farblich hervorgehoben (Donor: grün, Akzeptor: rot). Die Schemata entsprechen der offenen Struktur (Mitte), A/B (rechts) und A/D (links).

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

Die vier Stränge wurden in Wasser aufgenommen und in 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5 hybridisiert (finale Konzentrationen: HJ\_1N\_D2: 5 µM, HJ\_2N\_A2: 5 µM, HJ\_3N\_Bio: 15 µM, HJ\_4N: 15 µM). Hierzu wurde das Gemisch auf 90°C erhitzt und anschließend mit 2°C/h auf Raumtemperatur abgekühlt. Die so entstandene Lösung wurde vor der Messung 1/1000 in Messpuffer verdünnt und auf die behandelte Glasoberfläche pipettiert. Die Biotin-Gruppe bindet an eine freie Bindestelle im Avidin und verankert die Holliday-Struktur an der Glasoberfläche.

### 5.4 Messbedingungen für die Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie

Der große Vorteil der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie an immobilisierten Molekülen im Vergleich zu entsprechenden Experimenten an frei diffundierenden Molekülen ist die lange Beobachtungszeit, die diese Technik ermöglicht. Die Beobachtungszeit ist dabei theoretisch nur durch die technischen Möglichkeiten der Datenerfassung und -speicherung begrenzt. In der Praxis ist jedoch bereits nach kurzer Zeit ein Verlust des Fluoreszenzsignals durch photochemische Zerstörung (Photobleichen) des Farbstoffes zu beobachten. Langzeitmessungen sind somit nur mit einer zusätzlichen Stabilisierung der Farbstoffe möglich.

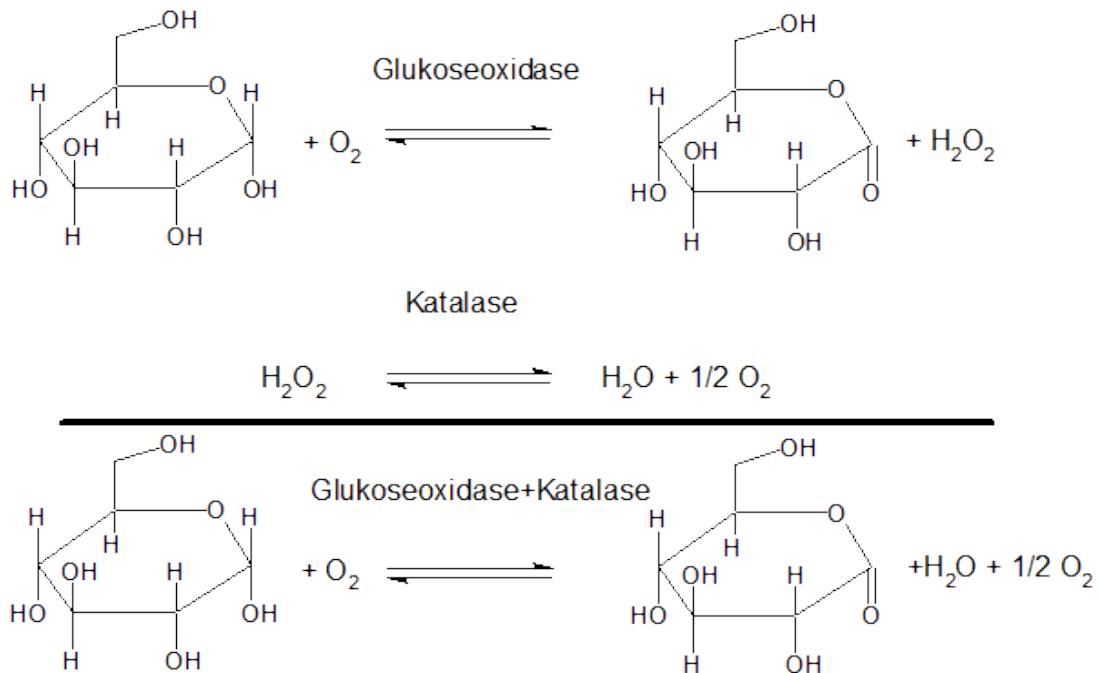
Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang molekularer Sauerstoff, der zum einen den wichtigsten Faktor für oxidatives Photobleichen darstellt, auf der anderen Seite jedoch eine Rückführung des Farbstoffes aus einem Triplett-Zustand erleichtert (2.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz) und somit das Fluoreszenzsignal stabilisiert. Ein genereller Ansatz zur Stabilisierung der Farbstoffe ist daher die Entfernung des Sauerstoffes aus dem Messpuffer und gleichzeitige Supplementierung mittels eines Triplet-Löschers. Eine Entfernung des gelösten Sauerstoffes kann durch Verdrängung des Gases durch zum Beispiel Stickstoff oder Argon erfolgen, erfordert jedoch große Sorgfalt in der Pufferhandhabung und ist für Anwendungen mit Pipettiervorgängen eher ungeeignet. In dieser Arbeit wurde daher ein enzymatisches System zur Sauerstoffentfernung, bestehend aus Glukoseoxidase und Katalase, verwendet (Benesch et al. 1953). Der Vorteil liegt in der einfachen und schnellen Handhabung. Es ist jedoch zu beachten, dass durch die zusätzliche Einbringung von Pufferkomponenten das Hintergrundsignal signifikant erhöht werden kann. Daher wurden verschiedene Produktionschargen Glukoseoxidase getestet und die jeweiligen Experimente mit dem Enzym durchgeführt, welches die geringste Hintergrundfluoreszenz bei konstanter Aktivität zeigte. Da sich die Enzymchargen jedoch von Produktionszyklus zu Produktionszyklus unterscheiden, ist eine generelle



## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

Aussage, welche Glukoseoxidase benutzt werden kann, nicht möglich. Um möglichen Artefakten vorzubeugen, ist jedoch ein Enzym mit möglichst hoher Aktivität pro mg zu empfehlen, um die Enzymeinwage möglichst gering zu halten.

Der Sauerstoff wird dabei in einer ersten Reaktion durch die Glukoseoxidase für die Oxidation von Glukose zu Glukonolaktone verbraucht. Das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird daraufhin durch die Katalase zu Wasser und einem halben Äquivalent Sauerstoff zersetzt. Insgesamt werden somit für die Entfernung eines Sauerstoffmoleküls zwei Glukosemoleküle verbraucht. Dabei entsteht mit Wasserstoffperoxid intermediär eine reaktive Spezies, die zu einer Oxidation der Farbstoffmoleküle führen kann. Dies wurde durch die Zugabe von Katalase im Überschuss verhindert. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 56 dargestellt.



**Abbildung 56: Reaktionsschema der Glukoseoxidase-Katalase Kombination zur Sauerstoffentfernung.**

Als Triplett-Löscher wurde das Vitamin E Derivat Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) verwendet, was sich in Vergleichsstudien als effektiver Triplett-Löscher herausgestellt hat (Rasnik et al. 2006; Roy et al. 2008). Der finale Messpuffer bestand aus 50 mM Tris, 20 mM NaCl, 4% (w/v) Glukose, 200 U Glukoseoxidase, 2000 U Katalase, 400 µM Trolox, pH 7.5 und variabler Konzentration von MgCl<sub>2</sub> (40 mM, 80 mM, 120 mM, 160 mM und 200 mM) und wurde vor Verwendung steril filtriert. Gemessen wurde mit einer Laserleistung von 1-1.5 mW (gemessen am Objektiv).

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

### 5.5 Datenauswertung

Die Daten wurden mittels der in der Arbeitsgruppe Seidel entwickelten, Labview basierten Softwareumgebung „Analecta“ analysiert. Die Entwicklung der Software und des Auswerteprozesses wurde bereits detailliert in einer vorangegangenen Dissertation erläutert und soll daher hier nur kurz beschrieben werden (Marawske 2011).

Der Optosplit Farbteiler teilte das Bild der Kamera in zwei Hälften, rote Fluoreszenz und grüne Fluoreszenz (5.1 TIRF-Mikroskopie/Einzelmolekül-TIRF-Spektroskopie). Die Ausrichtung der beiden Teilbilder erfolgte innerhalb der Software manuell über eine Referenzmessung. Hierzu wurde ein Deckglas mittels eines Diamantkratzers markiert und vermessen. Die Daten wurden in die Software eingeladen und die Teilbilder über eine x- und y-Korrektur übereinander gelegt. Die eingestellten Korrekturen entlang der beiden Achsen wurden täglich aktualisiert und für die entsprechenden Messungen konstant gehalten.

Nach dem Laden der Messdaten erfolgte zunächst eine Korrektur des Hintergrundes. Aufgrund der spektralen Unterschiede der beiden Farbkanäle erfolgte die Hintergrundkorrektur individuell für jeden Kanal. Die Detektion der Einzelmoleküle erfolgte automatisiert. Hierzu wurde das Signal des roten Kanals aufsummiert, der Hintergrund bestimmt und über eine konstante Signalschwelle analysiert. Die Verwendung des roten Kanals ermöglichte hierbei eine direkte Auswahl von FRET-aktiven Molekülen. Durch die pixelweise Detektion des Signals kann es dazu kommen, dass ein Molekül in mehreren benachbarten Pixeln detektiert wird. Um dies zu kompensieren wurde ein ROI („region of interest“) von 5 x 5 Pixeln gewählt (ca.  $0.9 \times 0.9 \mu\text{m}^2$ ), innerhalb derer das Signal einem Molekül zugeordnet wurde. Die so erhaltenen Koordinaten wurden ausgelesen und mittels der Einzelbilder konnte das zeitabhängige Fluoreszenzsignal innerhalb eines ROI bestimmt werden. Die weitere Analyse erfolgte hiernach einzeln für jede erhalten Signalspur, wobei aus den erhaltenen Einzelmolekülspuren manuell diejenigen mit klar erkennbaren und gegenläufigen Signalsprüngen in den beiden Farbkanälen ausgewählt wurden. Unter der Annahme eines einfachen kinetischen Modelles mit zwei Zuständen (siehe Formel 58) wurden die Spuren mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und einer einfachen Analyse über die Verweildauer des Moleküls im jeweiligen Zustand untersucht. Die Analyse mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie erfolgt über eine grün-rot Kreuzkorrelation (2.7 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)).

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

Die so erhaltene Kreuzkorrelationsfunktion wurde mit einer einfach-exponentiellen Modellfunktion angepasst.

$$G(t_c) = y_0 + A \cdot (1 - e^{-t/t_c})$$

Formel 60

Der zu beobachtende Anstieg der Funktionsamplitude spiegelt in diesem Fall die höhere Wahrscheinlichkeit, nach einem grünen Photon zum Zeitpunkt  $t$ , ein rotes Photon zum Zeitpunkt  $t + t_c$  zu detektieren wieder. Im Falle der Holliday-Strukturen entspricht die in der Modellfunktion angepasste Korrelationszeit  $t_c$  der Relaxationszeit des Systems, die über einen einfachen mathematischen Zusammenhang mit den Geschwindigkeitskonstanten im Zweizustandsmodell verknüpft ist.

$$t_c = t_R = \frac{1}{\sum k} = \frac{1}{k_{12} + k_{21}}$$

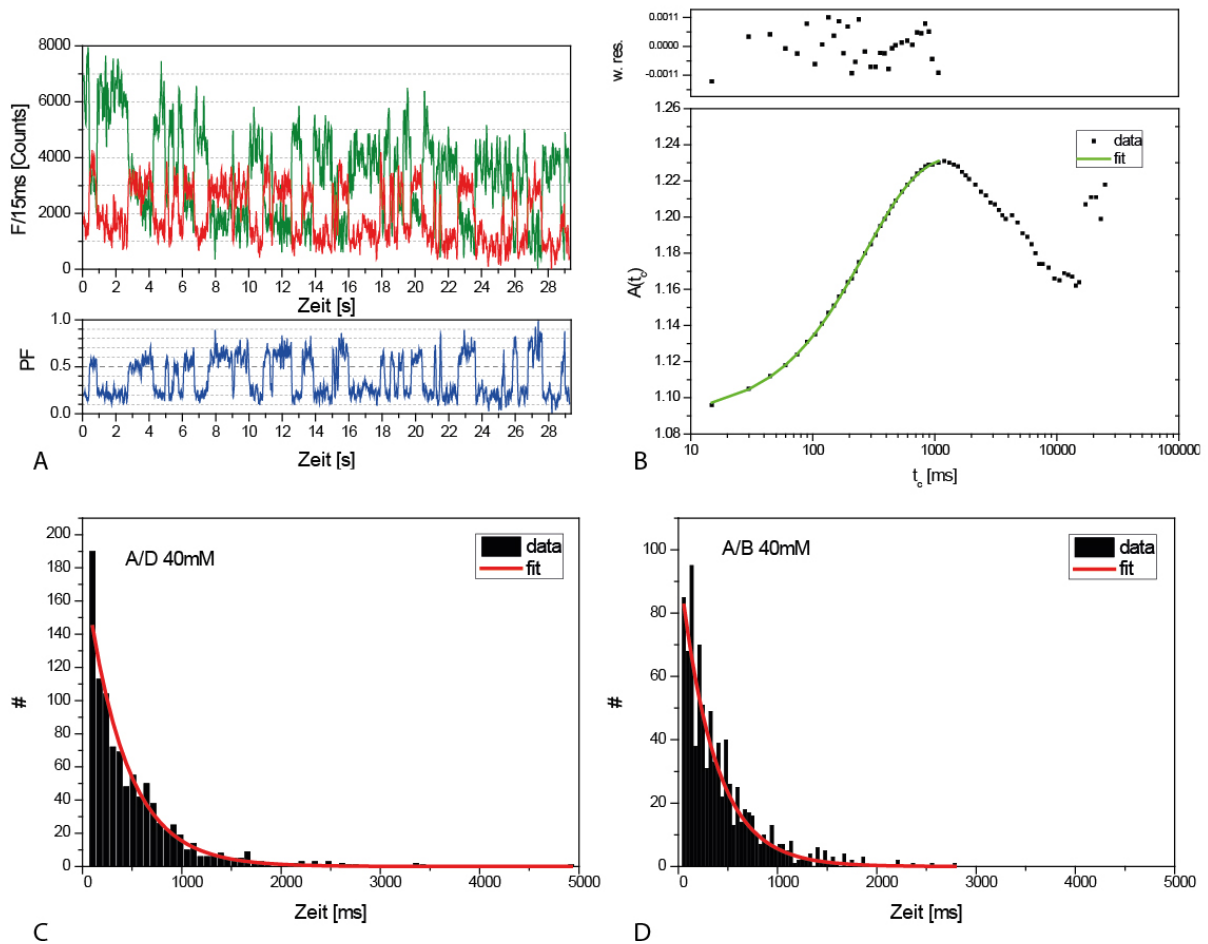
Formel 61

Zur Bestimmung der mittleren Lebensdauer eines Zustandes anhand der Signalspuren wurde aus den vorhandenen Signalen die apparente Transfereffizienz berechnet („proximity factor“, PF, siehe 2.4 Förster Resonanz Energietransfer (FRET)). An das resultierende Histogramm wurden zwei Gauß Verteilungen entsprechend des vereinfachten Zweizustandsmodelles angepasst. Anhand der Verteilungen konnte jedem Punkt der Signalspur ein Zustand zugewiesen werden, sofern sich das Signal innerhalb von  $2\sigma$  um den berechneten Mittelpunkt einer Verteilung befand. Im nächsten Schritt wurde darauf aufbauend die Zeit, in denen das Molekül einen Zustand besetzt, aus der Signalspur extrahiert. Das aus den Lebensdauern erstellte Histogramm für den jeweiligen Zustand wurde mit einem einfach exponentiellen Zerfall angepasst, um die entsprechende, charakteristische Lebensdauer  $\tau$  des Zustandes zu ermitteln. Anhand der charakteristischen Lebensdauern der einzelnen Zustände lässt sich die Relaxationszeit  $t_R$  des Systems berechnen.

$$t_R = \frac{\tau_{A/D} \cdot \tau_{A/B}}{\tau_{A/D} + \tau_{A/B}} = \frac{1}{k_{12} + k_{21}}$$

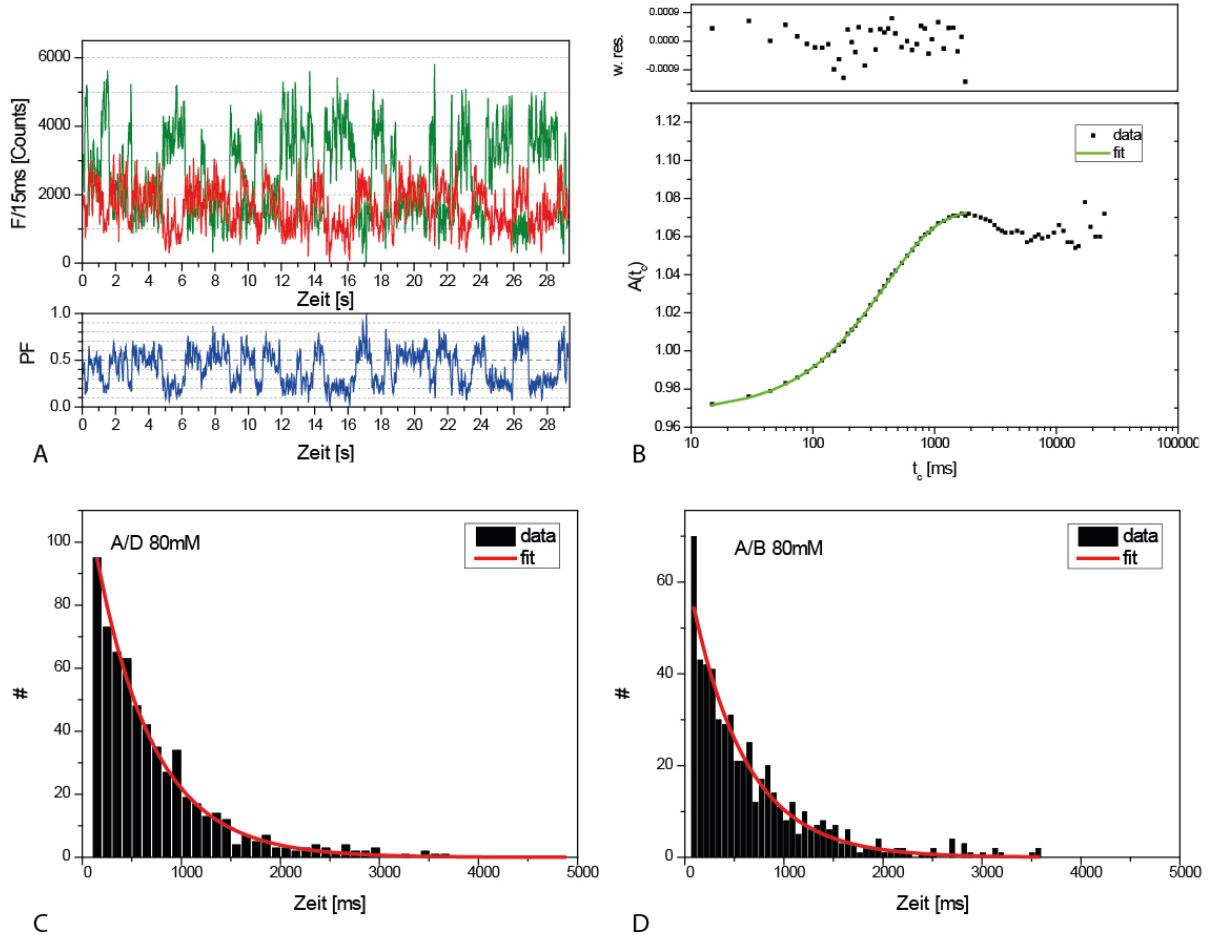
Formel 62

## 5.6 Ergebnisse und Diskussion



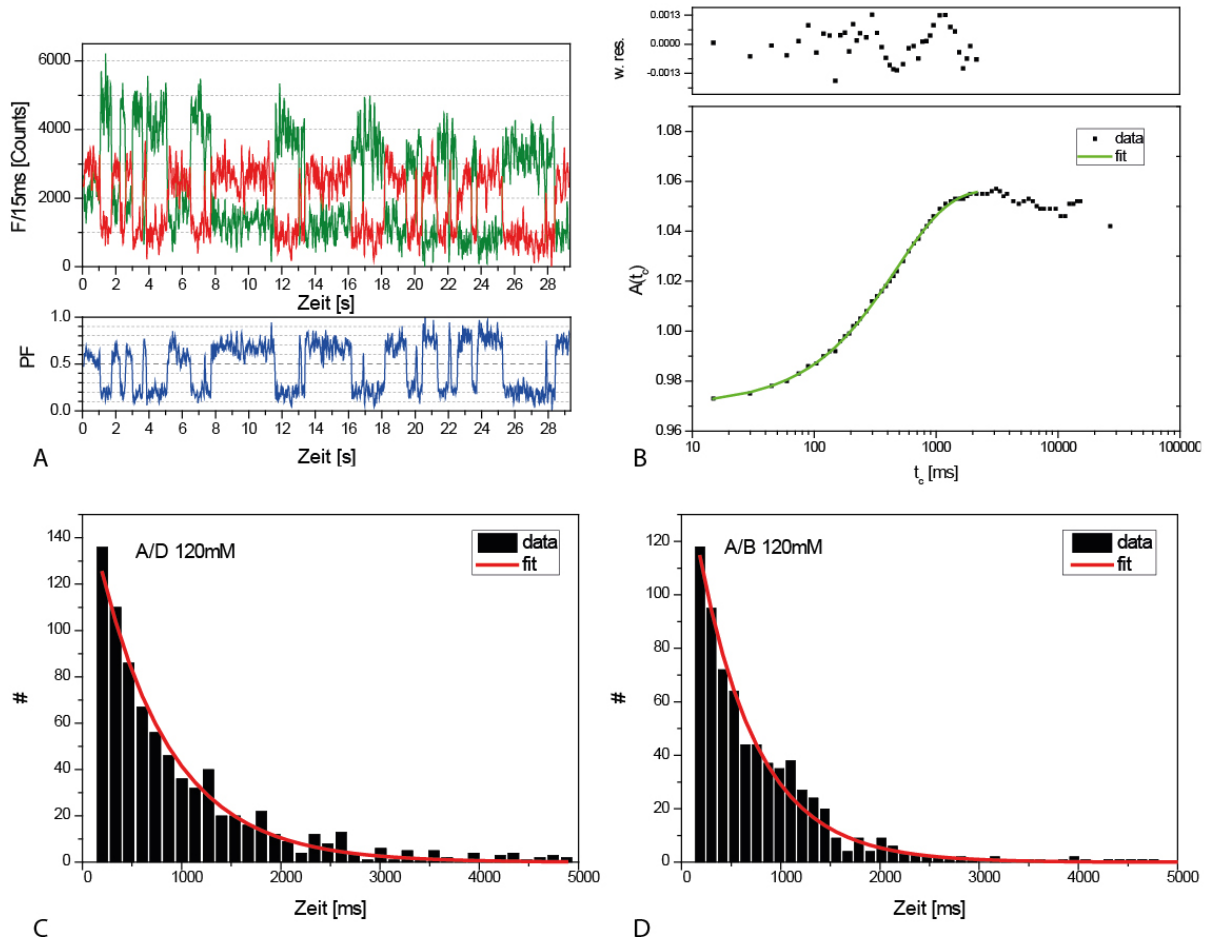
**Abbildung 57: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Holliday-Struktur bei 40 mM Magnesium.** Teilabbildung A zeigt beispielhaft eine Signalspur eines immobilisierten Einzelmoleküls. Dargestellt ist das Donorsignal (grün) und das Akzeptorsignal (rot) über einen Zeitraum von 30 s. Die zeitliche Auflösung beträgt 15 ms. Der zeitliche Verlauf des proximity factors (PF) gemäß Formel 20 ist in blau dargestellt. Teilabbildung B zeigt die Korrelationsfunktion für die kumulierten Messungen von 88 Einzelmolekülen sowie die Residuen einer einfach exponentiellen Modellfunktion (Formel 60). Aufgetragen ist die Autokorrelationsamplitude  $A(t_c)$  gegen die Zeit bei 40 mM Magnesium sowie die Modellfunktion  $f(t)=b_0+b_1*(1-\exp(-t/t_c))$  in grün. Angepasst wurde ausschließlich der exponentielle Anstieg der Autokorrelation. Teilabbildung C zeigt das Histogramm der Verweildauern für den Zustand A/D sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/D, Teilabbildung D das Histogramm der Verweildauern des Zustandes A/B sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/B.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen



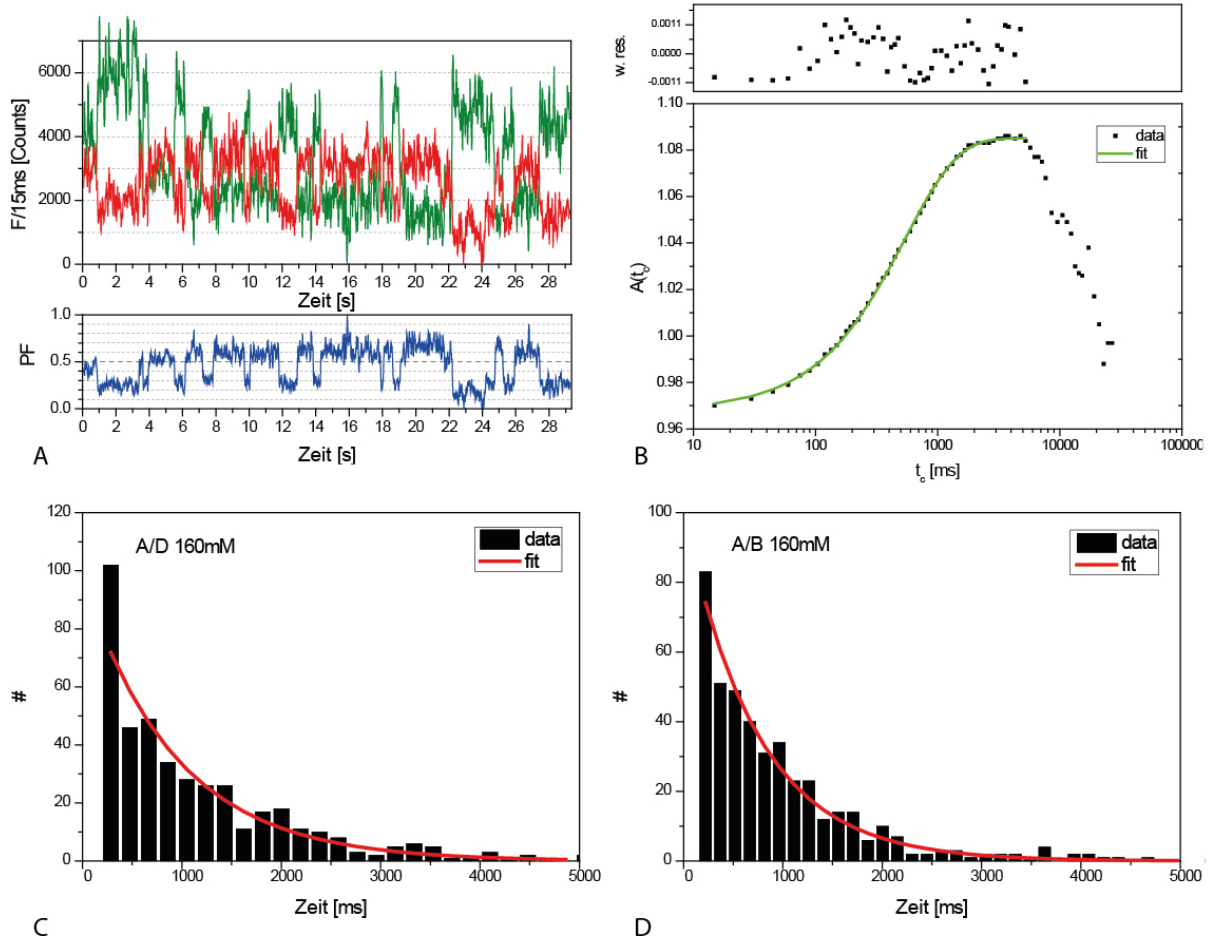
**Abbildung 58: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 80 mM Magnesium.** Teilabbildung A zeigt beispielhaft eine Signalspur eines immobilisierten Einzelmoleküls. Dargestellt ist das Donorsignal (grün) und das Akzeptorsignal (rot) über einen Zeitraum von 30 s. Die zeitliche Auflösung beträgt 15 ms. Der zeitliche Verlauf des proximity factors gemäß Formel 20 ist in blau dargestellt. Teilabbildung B zeigt die Korrelationsfunktion für die kumulierten Messungen von 91 Einzelmolekülen sowie die Residuen einer einfach exponentiellen Modellfunktion. Aufgetragen ist die Autokorrelationsamplitude  $A(t_c)$  gegen die Zeit bei 80 mM Magnesium sowie die Modellfunktion  $f(t)=b_0+b_1*(1-\exp(-t/t_c))$  in grün. Angepasst wurde ausschließlich der exponentielle Anstieg der Autokorrelation. Teilabbildung C zeigt das Histogramm der Verweildauern für den Zustand A/D sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/D, Teilabbildung D das Histogramm der Verweildauern des Zustandes A/B sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/B.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen



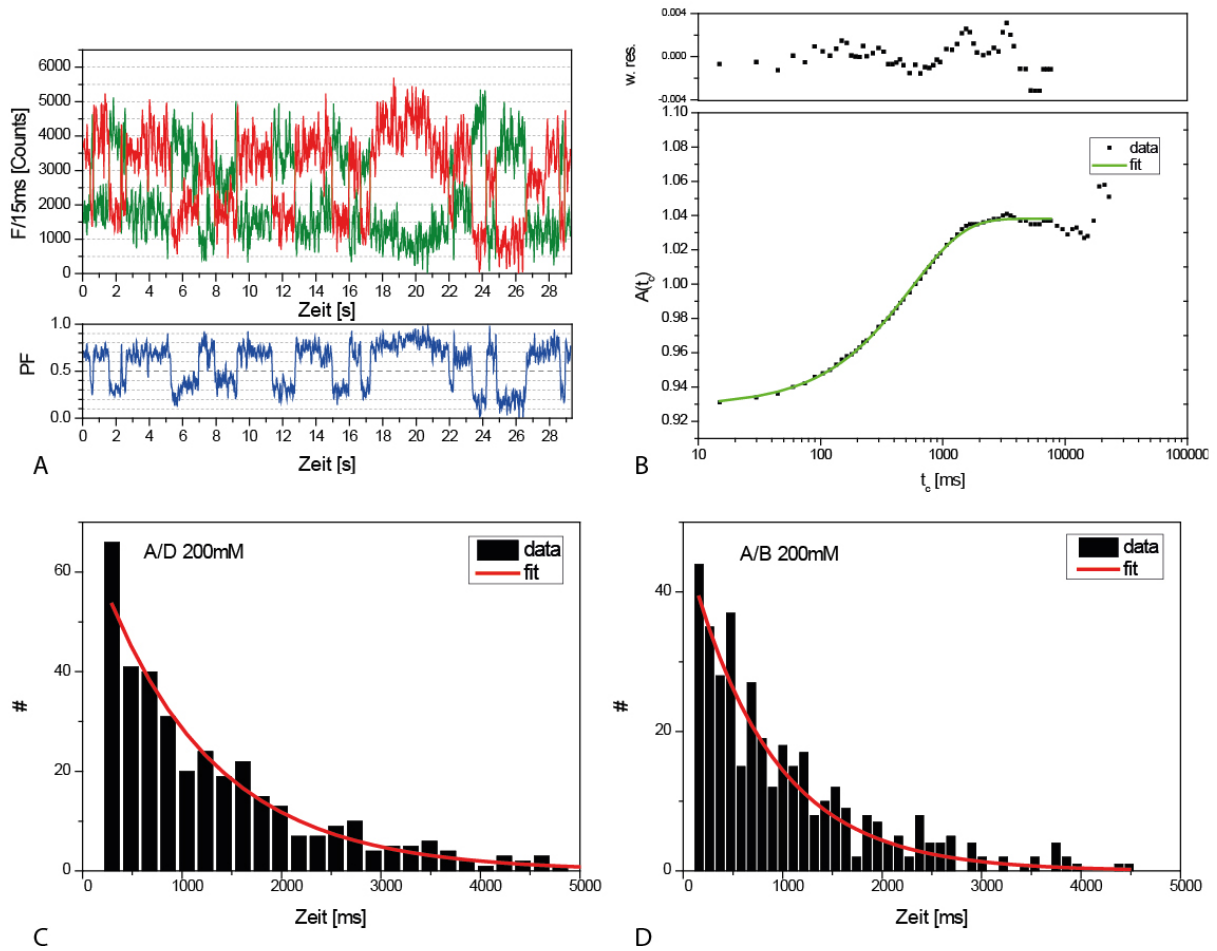
**Abbildung 59: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 120 mM Magnesium.** Teilabbildung A zeigt beispielhaft eine Signalspur eines immobilisierten Einzelmoleküls. Dargestellt ist das Donorsignal (grün) und das Akzeptorsignal (rot) über einen Zeitraum von 30 s. Die zeitliche Auflösung beträgt 15 ms. Der zeitliche Verlauf des proximity factors gemäß Formel 20 ist in blau dargestellt. Teilabbildung B zeigt die Korrelationsfunktion für die kumulierten Messungen von 68 Einzelmolekülen sowie die Residuen einer einfach exponentiellen Modellfunktion. Aufgetragen ist die Autokorrelationsamplitude  $A(t_c)$  gegen die Zeit bei 120 mM Magnesium sowie die Modellfunktion  $f(t)=b_0+b_1*(1-\exp(-t/t_c))$  in grün. Angepasst wurde ausschließlich der exponentielle Anstieg der Autokorrelation. Teilabbildung C zeigt das Histogramm der Verweildauern für den Zustand A/D sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/D, Teilabbildung D das Histogramm der Verweildauern des Zustandes A/B sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/B.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen



**Abbildung 60: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 160 mM Magnesium.** Teilabbildung A zeigt beispielhaft eine Signalspur eines immobilisierten Einzelmoleküls. Dargestellt ist das Donorsignal (grün) und das Akzeptorsignal (rot) über einen Zeitraum von 30 s. Die zeitliche Auflösung beträgt 15 ms. Der zeitliche Verlauf des proximity factors gemäß Formel 20 ist in blau dargestellt. Teilabbildung B zeigt die Korrelationsfunktion für die kumulierten Messungen von 48 Einzelmolekülen sowie die Residuen einer einfach exponentiellen Modellfunktion. Aufgetragen ist die Autokorrelationsamplitude  $A(t_c)$  gegen die Zeit bei 160 mM Magnesium sowie die Modellfunktion  $f(t)=b_0+b_1*(1-\exp(-t/t_c))$  in grün. Angepasst wurde ausschließlich der exponentielle Anstieg der Autokorrelation. Teilabbildung C zeigt das Histogramm der Verweildauern für den Zustand A/D sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/D, Teilabbildung D das Histogramm der Verweildauern des Zustandes A/B sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/B.

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen



**Abbildung 61: Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Hollidaystruktur bei 200 mM Magnesium.** Teilabbildung A zeigt beispielhaft eine Signalspur eines immobilisierten Einzelmoleküls. Dargestellt ist das Donorsignal (grün) und das Akzeptorsignal (rot) über einen Zeitraum von 30 s. Die zeitliche Auflösung beträgt 15 ms. Der zeitliche Verlauf des proximity factors gemäß Formel 20 ist in blau dargestellt. Teilabbildung B zeigt die Korrelationsfunktion für die kumulierten Messungen von 71 Einzelmolekülen sowie die Residuen einer einfach exponentiellen Modellfunktion. Aufgetragen ist die Autokorrelationsamplitude  $A(t_c)$  gegen die Zeit bei 200 mM Magnesium sowie die Modellfunktion  $f(t) = b_0 + b_1 \cdot (1 - \exp(-t/t_c))$  in grün. Angepasst wurde ausschließlich der exponentielle Anstieg der Autokorrelation. Teilabbildung C zeigt das Histogramm der Verweildauern für den Zustand A/D sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/D, Teilabbildung D das Histogramm der Verweildauern des Zustandes A/B sowie den einfach exponentiellen Zerfall für den Zustand A/B.



## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen

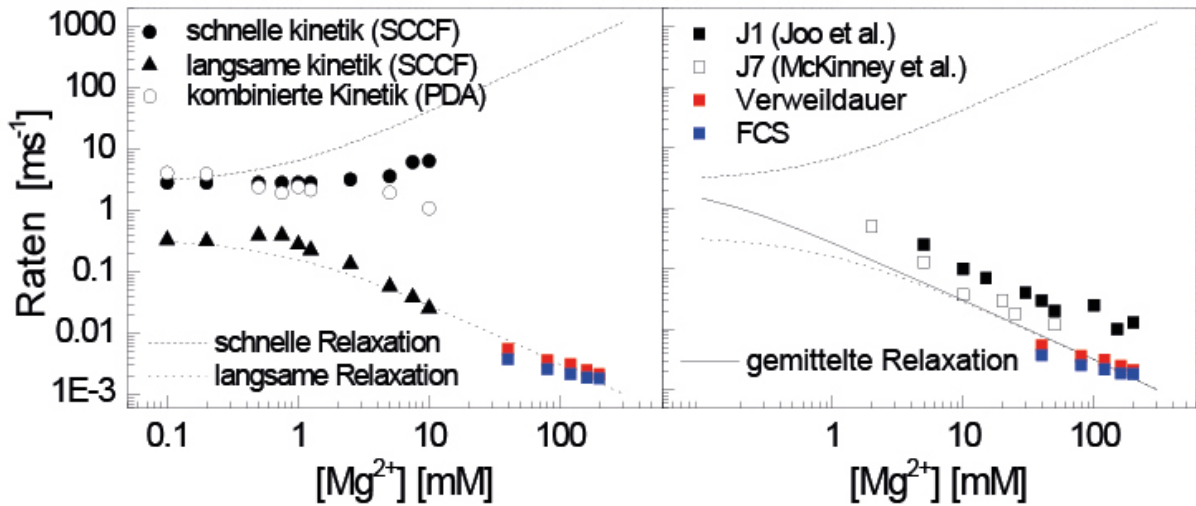
Für die Auswertung standen je Magnesium Konzentration  $\geq 48$  Einzelmolekülspuren zur Verfügung. Die aus den Messungen abgeleiteten, kinetischen Konstanten sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

**Tabelle 26: Übersicht der kinetischen Konstanten für den Übergang A/B-Konformer zu A/D-Konformer.** Aufgelistet sind sowohl die angepassten Konstanten aus der Fluoreszenzkorrelation (FCS) als auch die entsprechenden Konstanten aus der Verweildaueranalyse der Zustände A/B und A/D (Spur).

	200 mM Mg <sup>2+</sup>	160 mM Mg <sup>2+</sup>	120 mM Mg <sup>2+</sup>	80 mM Mg <sup>2+</sup>	40 mM Mg <sup>2+</sup>
<b>FCS</b>					
<b>t<sub>R</sub> [ms]</b>	546.90	533.25	464.45	389.34	266.70
<b>k<sub>R</sub> [1/ms]</b>	0.00183	0.00188	0.00215	0.00257	0.00375
<b>Spur</b>					
<b>τ<sub>A/D</sub> [ms]</b>	1106.22	913.42	713.49	570.30	394.63
<b>τ<sub>A/B</sub> [ms]</b>	826.94	720.09	584.05	539.60	344.15
<b>t<sub>R</sub> [ms]</b>	473.20	402.66	321.16	277.26	183.83
<b>k<sub>R</sub> [ms<sup>-1</sup>]</b>	0.00211	0.00248	0.00311	0.00361	0.00544

Beide Auswertungen zeigen wie erwartet einen Trend zu langsameren Relaxationszeiten mit steigender Magnesiumkonzentration. Ein Vergleich der gefundenen Raten bzw. Relaxationszeiten mit Ergebnissen aus FRET-Experimenten mit frei in Lösung diffundierenden Molekülen zeigt eine gute Übereinstimmung. Anhand der Ergebnisse an frei diffundierenden Molekülen wurde ein erweitertes, kinetisches Modell vorgeschlagen. Innerhalb des Modelles wird eine offene Konformation der Holliday-Struktur nicht benötigt, schließt einen möglichen Übergangszustand mit einer entsprechenden, offenen Konformation jedoch nicht aus. Das Modell basiert auf einer Trennung der Magnesiumbindung von der mit FRET detektierbaren Konformationsänderung und wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit ausführlich diskutiert (Valeri 2009). Eine Ausführliche Beschreibung ist dieser Arbeit in manuskriptform angehängt (Anhang A). Die experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit simulierten Daten, die auf entsprechenden Modellen aufbauen, sowie bereits veröffentlichten Daten aus Oberflächenexperimenten (Abbildung 62).

## 5 Einzelmoleküldynamiken in immobilisierten Holliday-Strukturen



**Abbildung 62: Experimentell ermittelte Raten und Vergleich mit veröffentlichten Daten.** Die linke Teilabbildung zeigt die ermittelten Raten in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration. Die Ergebnisse (Verweildaueranalyse in rot, FCS in blau) sind zusammen mit den Einzelmolekülergebnissen für selbiges Molekül dargestellt (Valeri 2009) (in schwarz). Die für die Analyse der Kinetik verwendete Methode ist ebenfalls mit angegeben (SCCF: „Species Cross Correlation Function“ (Felekyan et al. 2012), PDA: „Probability Distribution Analysis“ (Kalinin et al. 2007)). Aufgrund des experimentellen Aufbaus konnte nur die langsame Relaxation ermittelt werden. Die rechte Teilabbildung zeigt einen Vergleich der Ergebnisse mit entsprechenden Ergebnissen vergleichbarer Holliday-Strukturen. Die gepunktete und gestrichelte Linie zeigt in beiden Teilabbildungen das Ergebnis der Simulation für die schnelle und die langsame Relaxation. Die durchgezogene Linie in der rechten Teilabbildung zeigt die simulierte, gemittelte Relaxation.

## Zusammenfassung

### Zusammenfassung

Die fehlerfreie Replikation des Erbgutes ist eine Voraussetzung für das Überleben von Organismen, vom einzelligen Bakterium bis zum tierischen bzw. pflanzlichen Organismus. Der genaue Mechanismus und die strukturellen sowie kinetischen Zusammenhänge konnten trotz intensiver Forschung bis heute nicht im Detail geklärt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen den Fokus auf die Analyse des dynamischen Verhaltens des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* mit dem Hintergrund bereits bestehender struktureller und funktionaler Informationen.

Es konnte gezeigt werden, dass es eine weitere, von bisherigen Strukturuntersuchungen nicht erfasste Konformation gibt, die sich in jedem funktionalen Zustand des Enzyms sowohl in Einzelmolekülfluoreszenzexperimenten als auch zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie finden lässt. Des Weiteren zeigten die durchgeführten Einzelmolekülexperimente sowie Ergebnisse aus Korrelationsexperimenten ein durchgehend dynamisches Verhalten der Polymerase, unabhängig von gebundenen Substraten oder Liganden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Analyse von hochprozessiven Enzymen und deren katalytischer Funktion nicht ausschließlich auf Strukturdaten beruhen kann, sondern dass die Verschiebung eines dynamischen Gleichgewichtes unterschiedlicher Konformationen ebenfalls einen funktionellen Zustand charakterisieren kann. Dabei wurde besonders die Rolle eines konservierten Tyrosins im Zentrum des Enzyms beleuchtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass besagtes Tyrosin sowohl über die Hydroxylfunktion als auch über den aromatischen Ring die Gleichgewichtslage des Enzyms beeinflusst.

Ausgehend von den gefunden experimentellen Ergebnissen wird ein zu den bestehenden Modellen erweitertes dynamisches Modell der Polymerase vorgeschlagen, welches die neu gefundene Konformation als intermediären Zustand zwischen substratgebundenem Enzym und katalytisch aktivem Enzym einordnet. Der neue Zustand könnte somit eine Rolle in der Unterscheidung von korrektem und inkorrektem Nukleotid spielen. Erste Simulationen konnten zeigen, dass sich die experimentelle gefunden Ergebnisse mit dem postulierten Modell reproduzieren lassen.

## Zusammenfassung

Neben der Bedeutung der hohen Replikationsgenauigkeit von prozessiven DNA-Polymerasen und der damit verbundenen Stabilität des Erbguts für das Überleben eines Organismus ist die Möglichkeit der Rekombination von genetischem Material wesentliche Voraussetzung für die genetische Vielfalt.

Die Holliday Struktur ist Bestandteil des „Crossing overs“ in Mikroorganismen, bei dem zwei homologe DNA-Sequenzen rekombiniert werden. Strukturanalysen zeigten dabei zwei Konformationen der Holliday-Struktur. Ausgehend von Gelelektrophoretischen Experimenten wurde eine offene Konformation als dritte Konformation oder Intermediat angenommen. Einzelmolekülstudien zeigten dagegen keinen Hinweis auf eine offene Struktur. Um diese Ergebnisse weiter zu vervollständigen, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren zur Immobilisierung von Molekülen auf Glasoberflächen etabliert und Einzelmolekülmessungen an immobilisierten Holliday-Strukturen durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Experimente ergänzen die bereits bestehenden Ergebnisse und unterstützen die Einführung eines alternativen Modelles aus vier Zuständen ohne signifikante Bedeutung einer möglichen offenen Struktur.

## Summary

### Summary

The replication of DNA with high fidelity is one requirement for the survivability of organisms, whether prokaryotic or eukaryotic. Despite intensive research and growing numbers of publications regarding the field of DNA-polymerases, the exact mechanism how this high fidelity is achieved is still unknown. This work is focused on the dynamic behavior of the Klenow-Fragment of DNA-polymerases I from *Escherichia coli*, using already known structural and functional information as a starting point.

Using time dependent and single molecule fluorescence spectroscopy, an additional structural conformation could be found in every functional state of the enzyme. In addition, it could be shown that it is not possible to assign a defined structural state to a functional state, showing the extensive dynamic behavior of the protein regardless of any bound substrate or ligand. These findings are an example for highly processive enzymes, where analysis of the enzyme's catalytic function cannot be done using structural information only. Instead, a functional state is often characterized by a dynamic equilibrium between multiple structural states. Analyzing in detail the meaning of a conserved tyrosine for the dynamic properties of a functional state, it could be shown that both the hydroxyl function and the aromatic ring are independently influencing the dynamic equilibrium of the protein conformations.

Based on the experimental results, a new model connecting the conformational states with the functional states is proposed, placing the newly found conformation as an intermediate state between the open structure of substrate bound enzyme and the closed catalytic active conformation. This makes the new conformation a possible candidate for an additional control step in the nucleotide insertion cycle. First simulation show, that with the postulated model it is possible to recover the experimental results.

Besides the importance of high fidelity replication by DNA-polymerases for the stability of DNA and survivability of organisms, the recombination of genetic material is of major importance for diversity in life.

## Summary

The Holliday junction is part of the crossing over process, allowing genetic recombination in microorganisms by recombining two homologous DNA strands. From structural analysis it is known, that the Holliday junction can exist in two different conformations with an open conformation postulated in between. However, single molecule studies indicate that this open structure is only a short lived intermediate. To increase the data pool, single molecule experiments on immobilized junctions were performed and analysed in this thesis, supporting an alternative model with four conformational states without an open intermediate.

## Danksagung

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, ohne die es mit Sicherheit nicht zu dieser Arbeit gekommen wäre:

Prof. Dr. Claus Seidel für die Betreuung, zahlreichen Diskussionen und für die Motivation diese Dissertation erfolgreich abzuschließen

Dr. Suren Felekyan für die Hilfe bei den Einzelmolekülmessungen und der Datenanalyse und Erstellung der Kreuzkorrelationsfunktion sowie der Simulationen.

Thomas-Otavio Peulen für die Datenauswertung der eTCSPC Experimente und fruchtbaren Diskussionen bezüglich der Arbeit, sowie erheiternder Diskussionen abseits der Arbeit.

Dr. Anne Koch, Katharina Hemmen, und Dr. Ralf Kühnemuth gilt mein Dank für das Korrekturlesen dieser Dissertation.

Dr. Stefan Marawske für die Zusammenarbeit im Projekt Holliday Strukturen. Viel wichtiger war jedoch die Unterstützung und Freundschaft in allen Lagen auch und gerade abseits der Arbeit.

Dr. Andreas Renner für seine akribische Korrektur der schriftlichen Ausarbeitung und für all die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Schön, wenn aus Kollegen Freunde werden und noch schöner, wenn daraus gute Freunde werden.

Marcel Merkwitz für technische Unterstützung und seine Freundschaft.

Meiner Frau Dr. Lydia Richert für das Korrekturlesen, für das unermüdliche Antreiben, für die unendliche Geduld, den beispiellosen Rückhalt in allen Lebenslagen und vor allem für die vielen aufbauenden Worte in den Zeiten, wo es nicht so rund lief.

Der gesamten Seidel-Arbeitsgruppe für den Zusammenhalt und dem guten Arbeitsklima.

Prof. Dr. Georg Groth für das Zweitgutachten.

Und abschließend Dr. Uwe Sackmann, der mich vor vielen Jahren auf diesen Weg geführt hat, der sich jetzt mal wieder vor mir teilt. Vielen Dank Uwe!

### Literaturverzeichnis

- Anderson, G. W., J. E. Zimmerman, et al. (1963). "N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis." J Am Chem Soc 85(19): 3039-3039.
- Basu, A. and M. J. Modak (1987). "Identification and amino acid sequence of the deoxynucleoside triphosphate binding site in Escherichia coli DNA polymerase I." Biochemistry 26(6): 1704-1709.
- Beese, L. S., V. Derbyshire, et al. (1993). "Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA." Science 260(5106): 352-355.
- Beese, L. S., J. M. Friedman, et al. (1993). "Crystal structures of the Klenow fragment of DNA polymerase I complexed with deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate." Biochemistry 32(51): 14095-14101.
- Bell, J. B., K. A. Eckert, et al. (1997). "Base miscoding and strand misalignment errors by mutator Klenow polymerases with amino acid substitutions at tyrosine 766 in the O helix of the fingers subdomain." J Biol Chem 272(11): 7345-7351.
- Benesch, R. E. and R. Benesch (1953). "Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods." Science 118(3068): 447-448.
- Berezhna, S. Y., J. P. Gill, et al. (2012). "Single-molecule Forster resonance energy transfer reveals an innate fidelity checkpoint in DNA polymerase I." J Am Chem Soc 134(27): 11261-11268.
- Berger, S. (2001). Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie. Dissertation, Georg-August-Universität
- Bessman, M. J., A. Kornberg, et al. (1956). "Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid." Biochim Biophys Acta 21(1): 197-198.
- Böhmer, M., M. Wahl, et al. (2002). "Time-resolved fluorescence correlation spectroscopy." Chemical Physics Letters 353(5-6): 439-445.
- Braithwaite, D. K. and J. Ito (1993). "Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases." Nucleic Acids Res 21(4): 787-802.
- Broker, T. R. and I. R. Lehman (1971). "Branched DNA molecules: intermediates in T4 recombination." J Mol Biol 60(1): 131-149.
- Cai, Q., A. K. Kusnetzow, et al. (2007). "Nanometer distance measurements in RNA using site-directed spin labeling." Biophysical Journal 93(6): 2110-2117.
- Clegg, R. M. (1992). "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids." Methods Enzymol 211: 353-388.
- Condon, E. (1926). "A Theory of Intensity Distribution in Band Systems." Physical Review 28(6): 1182-1201.



## Literaturverzeichnis

- Doublie, S., S. Tabor, et al. (1998). "Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution." Nature 391(6664): 251-258.
- Duckett, D. R., A. I. Murchie, et al. (1988). "The structure of the Holliday junction, and its resolution." Cell 55(1): 79-89.
- Echols, H. and M. F. Goodman (1991). "Fidelity mechanisms in DNA replication." Annu Rev Biochem 60: 477-511.
- Ehrenberg, M. and R. Rigler (1974). "Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations." Chemical Physics 4(3): 390-401.
- Eichman, B. F., J. M. Vargason, et al. (2000). "The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: sequence effects on the structure of four-way junctions." Proc Natl Acad Sci U S A 97(8): 3971-3976.
- Elson, E. L. and D. Magde (1974). "Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory." Biopolymers 13: 1-27.
- Felekyan, S., S. Kalinin, et al. (2012). "Filtered FCS: Species Auto- and Cross-Correlation Functions Highlight Binding and Dynamics in Biomolecules." Chemphyschem 13(4): 1036-1053.
- Felekyan, S., S. Kalinin, et al. (2012). "Filtered FCS: species auto- and cross-correlation functions highlight binding and dynamics in biomolecules." ChemPhysChem 13: 1036-1053.
- Felekyan, S., H. Sanabria, et al. (2013). "Analyzing Förster resonance energy transfer (FRET) with fluctuation algorithms." Methods in Enzymology in press.
- Fenley, M. O., G. S. Manning, et al. (1998). "Excess counterion binding and ionic stability of kinked and branched DNA." Biophys Chem 74(2): 135-152.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Annalen der Physik 437(1-2): 55-75.
- Franck, J. and E. G. Dymond (1926). "Elementary processes of photochemical reactions." Transactions of the Faraday Society 21 (February): 536-542.
- Freemont, P. S., J. M. Friedman, et al. (1988). "Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 85(23): 8924-8928.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, et al. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. The Proteomics Protocols Handbook. J. M. Walker, Humana Press: 571-607.
- Guajardo, R. and R. Sousa (1997). "A model for the mechanism of polymerase translocation." J Mol Biol 265(1): 8-19.

## Literaturverzeichnis

- Ha, T. (2001). "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer." Methods 25(1): 78-86.
- Ha, T., I. Rasnik, et al. (2002). "Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase." Nature 419(6907): 638-641.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol 166(4): 557-580.
- Hastings, W. K. (1970). "Monte-Carlo Sampling Methods Using Markov Chains and Their Applications." Biometrika 57(1): 97-&.
- Herlitze, S. and M. Koenen (1990). "A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction." Gene 91(1): 143-147.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene 77(1): 51-59.
- Hochuli, E., W. Bannwarth, et al. (1988). "Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent." Nat Biotech 6(11): 1321-1325.
- Hohlbein, J., L. Aigrain, et al. (2013). "Conformational landscapes of DNA polymerase I and mutator derivatives establish fidelity checkpoints for nucleotide insertion." Nature Communications 4: 2131.
- Holliday, R. (1964). "The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in Ustilago and Saccharomyces." Genetics 50: 323-335.
- Isaksson, M., S. Kalinin, et al. (2004). "Partial donor-donor energy migration (PDDEM): A novel fluorescence method for internal protein distance measurements." Physical Chemistry Chemical Physics 6(11): 3001-3008.
- Janissen, R. (2008). Biomolecular based nano manipulation with a combined atomic force microscope and single molecule fluorescence setup. Ph.D., Dusseldorf.
- Johnson, K. A. (2008). "Role of induced fit in enzyme specificity: a molecular forward/reverse switch." J Biol Chem 283(39): 26297-26301.
- Joo, C., S. A. McKinney, et al. (2004). "Exploring rare conformational species and ionic effects in DNA Holliday junctions using single-molecule spectroscopy." J Mol Biol 341(3): 739-751.
- Joyce, C. M. and T. A. Steitz (1994). "Function and structure relationships in DNA polymerases." Annu Rev Biochem 63: 777-822.
- Kalinin, S., S. Felekyan, et al. (2007). "Probability distribution analysis of single-molecule fluorescence anisotropy and resonance energy transfer." Journal of Physical Chemistry B 111(34): 10253-10262.

## Literaturverzeichnis

- Kalinin, S. and L. B. A. Johansson (2004). "Energy migration and transfer rates are invariant to modeling the fluorescence relaxation by discrete and continuous distributions of lifetimes." Journal of Physical Chemistry B 108(9): 3092-3097.
- Kalinin, S., E. Sisamakos, et al. (2010). "On the origin of broadening of single-molecule FRET efficiency distributions beyond shot noise limits." Journal of Physical Chemistry B 114: 6197–6206.
- Kalinin, S. P., T.; Sindbert, S.; Rothwell, P. J.; Berger, S.; Restle, T.; Goody, R. S.; Gohlke, H.; Seidel, C. A. M. (2012). "A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling." Nat Methods.
- Kasha, M. (1950). "Characterization of electronic transitions in complex molecules." Discussions of the Faraday Society 9(0): 14-19.
- Kati, W. M., K. A. Johnson, et al. (1992). "Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase." J Biol Chem 267(36): 25988-25997.
- Klenow, H. and K. Overgaard-Hansen (1970). "Proteolytic cleavage of DNA polymerase from Escherichia Coli B into an exonuclease unit and a polymerase unit." FEBS Lett 6(1): 25-27.
- Kohlstaedt, L. A., J. Wang, et al. (1992). "Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor." Science 256(5065): 1783-1790.
- Kuchta, R. D., P. Benkovic, et al. (1988). "Kinetic mechanism whereby DNA polymerase I (Klenow) replicates DNA with high fidelity." Biochemistry 27(18): 6716-6725.
- Kuchta, R. D., V. Mizrahi, et al. (1987). "Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow)." Biochemistry 26(25): 8410-8417.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lakowicz, J. R. (1999 ). Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Kluwer.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. New York, Springer Science+Business Media.
- Li, Y., S. Korolev, et al. (1998). "Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation." EMBO J 17(24): 7514-7525.
- Lilley, D. M. (2000). "Structures of helical junctions in nucleic acids." Q Rev Biophys 33(2): 109-159.
- Lilley, D. M. (2008). "Analysis of branched nucleic acid structure using comparative gel electrophoresis." Q Rev Biophys 41(1): 1-39.

## Literaturverzeichnis

- Lipman, E. A., B. Schuler, et al. (2003). "Single-molecule measurement of protein folding kinetics." Science 301(5637): 1233-1235.
- Loeb, L. A. and T. A. Kunkel (1982). "Fidelity of DNA synthesis." Annu Rev Biochem 51: 429-457.
- Loscha, K. V., A. J. Herft, et al. (2012). "Multiple-Site Labeling of Proteins with Unnatural Amino Acids." Angewandte Chemie International Edition 51(9): 2243-2246.
- Magde, D., E. Elson, et al. (1972). "Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy." Physical Review Letters 29(11): 705-708.
- Marawske, S. (2011). Fluorescence Spectroscopy and Imaging of polymer bound fluorophores and immobilised bio-molecules. Ph.D., Dusseldorf.
- Margittai, M., J. Widengren, et al. (2003). "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1." Proc Natl Acad Sci U S A 100(26): 15516-15521.
- Maus, M., M. Cotlet, et al. (2001). "An Experimental Comparison of the Maximum Likelihood Estimation and Nonlinear Least-Squares Fluorescence Lifetime Analysis of Single Molecules." Analytical Chemistry 73(9): 2078-2086.
- McKinney, S. A., A. C. Declais, et al. (2003). "Structural dynamics of individual Holliday junctions." Nat Struct Biol 10(2): 93-97.
- Metropolis, N., A. W. Rosenbluth, et al. (1953). "Equation of State Calculations by Fast Computing Machines." Journal of Chemical Physics 21(6): 1087-1092.
- Minnick, D. T., K. Bebenek, et al. (1999). "Side chains that influence fidelity at the polymerase active site of Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment)." J Biol Chem 274(5): 3067-3075.
- Mollegaard, N. E., A. I. Murchie, et al. (1994). "Uranyl photoprobing of a four-way DNA junction: evidence for specific metal ion binding." EMBO J 13(7): 1508-1513.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. W. Ray, Academic Press. Volume 155: 335-350.
- Murchie, A. I., R. M. Clegg, et al. (1989). "Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules." Nature 341(6244): 763-766.
- Muschielok, A., J. Andrecka, et al. (2008). "A nano-positioning system for macromolecular structural analysis." Nat Methods 5(11): 965-971.
- Nowakowski, J., P. J. Shim, et al. (1999). "Crystal structure of an 82-nucleotide RNA-DNA complex formed by the 10-23 DNA enzyme." Nat Struct Biol 6(2): 151-156.

## Literaturverzeichnis

- Ollis, D. L., P. Brick, et al. (1985). "Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP." Nature 313(6005): 762-766.
- Olmsted, M. C. and P. J. Hagerman (1994). "Excess counterion accumulation around branched nucleic acids." J Mol Biol 243(5): 919-929.
- Patel, S. S., I. Wong, et al. (1991). "Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant." Biochemistry 30(2): 511-525.
- Rasnik, I., S. A. McKinney, et al. (2006). "Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging." Nat Methods 3(11): 891-893.
- Rehm, H. (2002). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag.
- Rothwell, P. J., W. J. Allen, et al. (2013). "dNTP-dependent Conformational Transitions in the Fingers Subdomain of KlenTaq1 DNA Polymerase: INSIGHTS INTO THE ROLE OF THE "NUCLEOTIDE-BINDING" STATE." J Biol Chem 288(19): 13575-13591.
- Rothwell, P. J., V. Mitaksov, et al. (2005). "Motions of the fingers subdomain of klenTaq1 are fast and not rate limiting: implications for the molecular basis of fidelity in DNA polymerases." Mol Cell 19(3): 345-355.
- Rothwell, P. J. and G. Waksman (2005). "Structure and mechanism of DNA polymerases." Adv Protein Chem 71: 401-440.
- Roy, R., S. Hohng, et al. (2008). "A practical guide to single-molecule FRET." Nat Methods 5(6): 507-516.
- Santoso, Y., C. M. Joyce, et al. (2010). "Conformational transitions in DNA polymerase I revealed by single-molecule FRET." Proc Natl Acad Sci U S A 107(2): 715-720.
- 214 Schrodinger, LLC (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Schuler, B., E. A. Lipman, et al. (2002). "Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy." Nature 419(6908): 743-747.
- Schwacha, A. and N. Kleckner (1995). "Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination." Cell 83(5): 783-791.
- Sigal, N. and B. Alberts (1972). "Genetic recombination: the nature of a crossed strand-exchange between two homologous DNA molecules." J Mol Biol 71(3): 789-793.
- Sin, K. K., C. P. Chan, et al. (2006). "A highly sensitive fluorescent immunoassay based on avidin-labeled nanocrystals." Anal Bioanal Chem 384(3): 638-644.
- Sindbert, S., S. Kalinin, et al. (2011). "Accurate Distance Determination of Nucleic Acids via Forster Resonance Energy Transfer: Implications of Dye Linker Length and Rigidity." J Am Chem Soc 133(8): 2463-2480.

## Literaturverzeichnis

- Sindbert, S., S. Kalinin, et al. (2011). "Accurate distance determination of nucleic acids via Forster resonance energy transfer: implications of dye linker length and rigidity." Journal of the American Chemical Society 133(8): 2463-2480.
- Sisamakris, E., A. Valeri, et al. (2010). Chapter 18 - Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection. Methods in Enzymology. G. W. Nils, Academic Press. Volume 475: 455-514.
- Sloane, D. L., M. F. Goodman, et al. (1988). "The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme." Nucleic Acids Res 16(14A): 6465-6475.
- Sousa, R., Y. J. Chung, et al. (1993). "Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution." Nature 364(6438): 593-599.
- Steitz, T. A. (1998). "A mechanism for all polymerases." Nature 391(6664): 231-232.
- Steitz, T. A., S. J. Smerdon, et al. (1994). "A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases." Science 266(5193): 2022-2025.
- Torella, J. P., S. J. Holden, et al. (2011). "Identifying molecular dynamics in single-molecule FRET experiments with burst variance analysis." Biophys J 100(6): 1568-1577.
- Uemori, T., Y. Sato, et al. (1997). "A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization." Genes Cells 2(8): 499-512.
- Valeri, A. (2009). Fluorescence Resonance Energy Transfer between multiple chromophores studied by single-molecule spectroscopy. Ph.D., Dusseldorf.
- Vande Berg, B. J., W. A. Beard, et al. (2001). "DNA structure and aspartate 276 influence nucleotide binding to human DNA polymerase beta. Implication for the identity of the rate-limiting conformational change." J Biol Chem 276(5): 3408-3416.
- Vogel, S. S., C. Thaler, et al. (2006). "Fanciful FRET." Sci STKE 2006(331): re2.
- Wallrabe, H. and A. Periasamy (2005). "Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy." Curr Opin Biotechnol 16(1): 19-27.
- Wang, J., A. K. Sattar, et al. (1997). "Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69." Cell 89(7): 1087-1099.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid." Nature 171(4361): 964-967.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature 171(4356): 737-738.
- Weber, G. (1952). "Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method." Biochem J 51(2): 145-155.

## Literaturverzeichnis

Widengren, J., V. Kudryavtsev, et al. (2006). "Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection." Analytical Chemistry 78(6): 2039-2050.

Wu, E. Y. and L. S. Beese (2011). "The structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a mismatched nucleotide reveals an "ajar" intermediate conformation in the nucleotide selection mechanism." J Biol Chem 286(22): 19758-19767.

Wu, P. and L. Brand (1994). "Resonance energy transfer: methods and applications." Anal Biochem 218(1): 1-13.

Xie, J. and P. G. Schultz (2005). "Adding amino acids to the genetic repertoire." Current Opinion in Chemical Biology 9(6): 548-554.

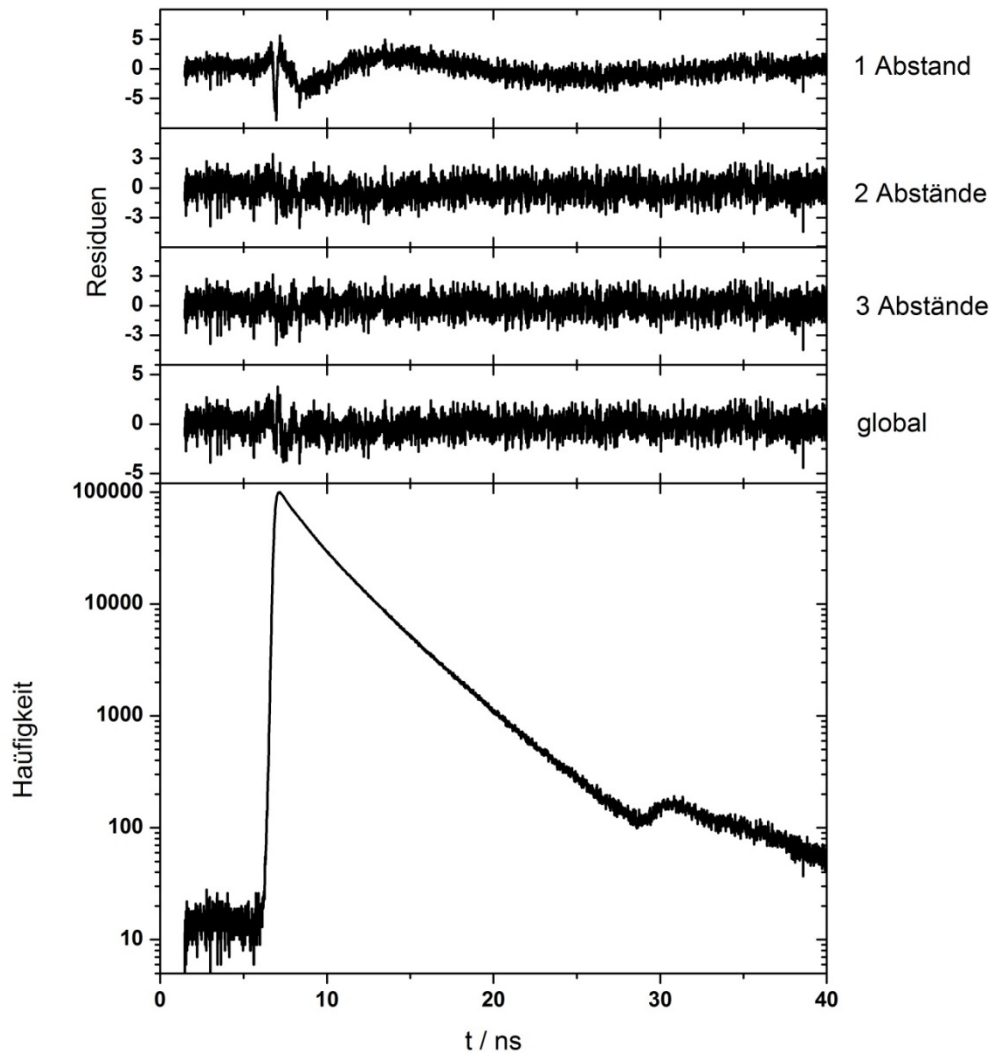
Zhuang, X., L. E. Bartley, et al. (2000). "A single-molecule study of RNA catalysis and folding." Science 288(5473): 2048-2051.

## Anhänge

### Anhang B: eTCSPC Modellanpassungen

Im Folgenden sind die gemessenen Fluoreszenzzerfälle, auf denen die Ergebnisse der eTCSPC-Experimente beruhen, dargestellt. Jede Abbildung zeigt den gemessenen Zerfall sowie die gewichteten Residuen für die jeweilige Modellfunktion mit einem Abstand, zwei Abständen, drei Abständen sowie der globalen Anpassung. Abschließend folgt eine Tabelle mit einer Auflistung der Ergebnisse und eine graphische Übersicht gemäß der in Abbildung 45 verwendeten Farbcodierung.

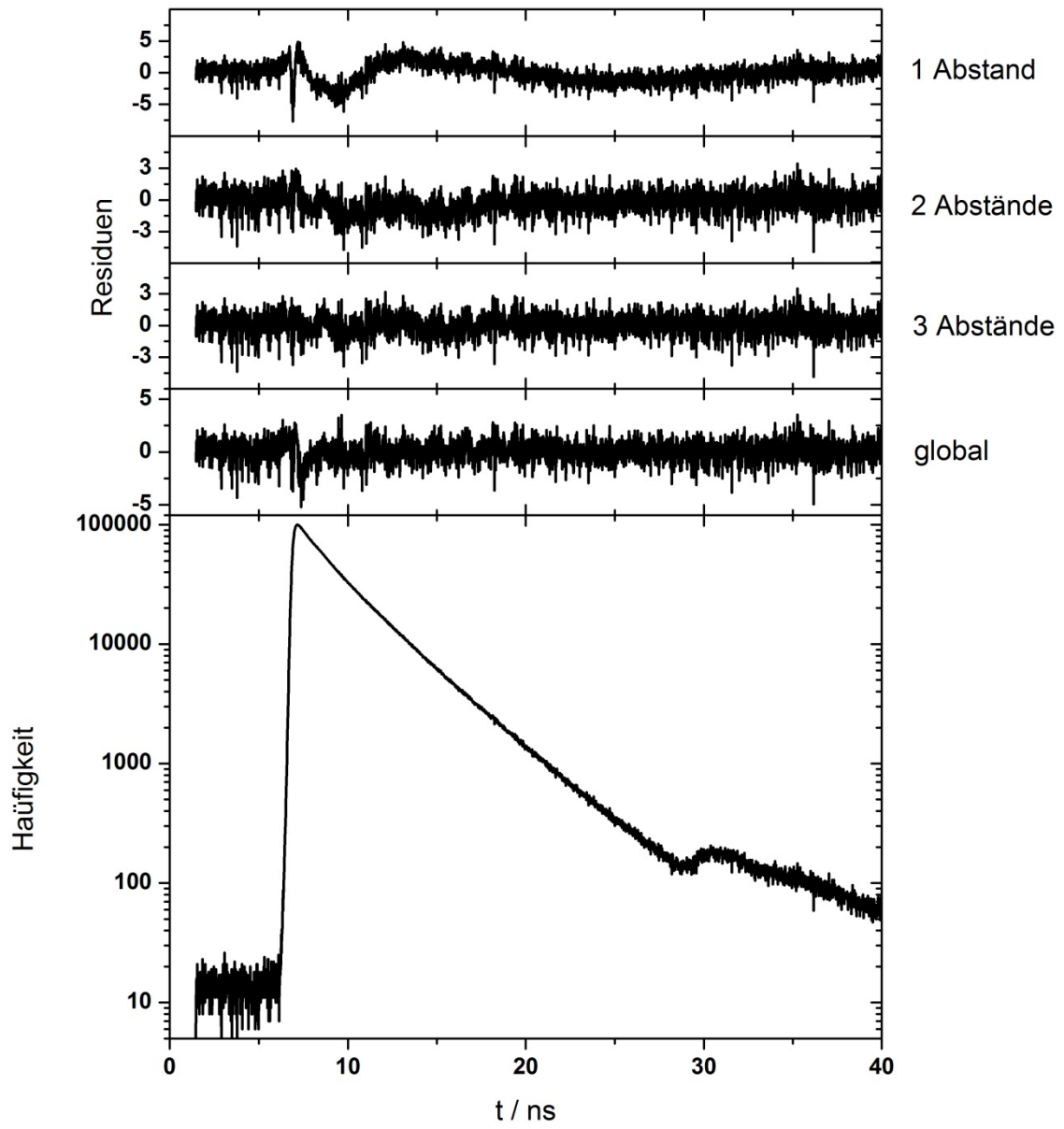
#### Freies Enzym Wildtyp





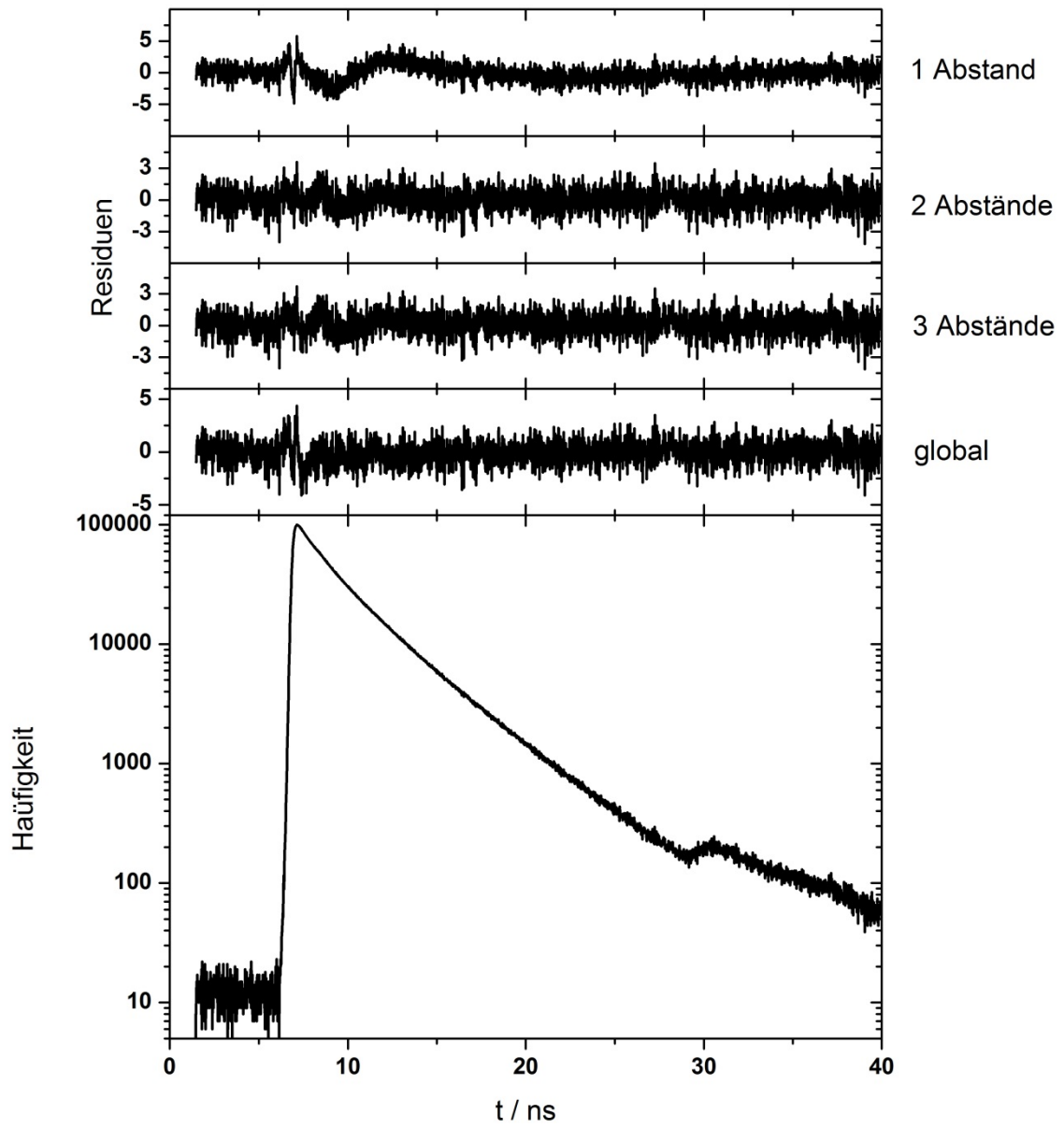
# Anhänge

## Freies Enzym Variante Y766S



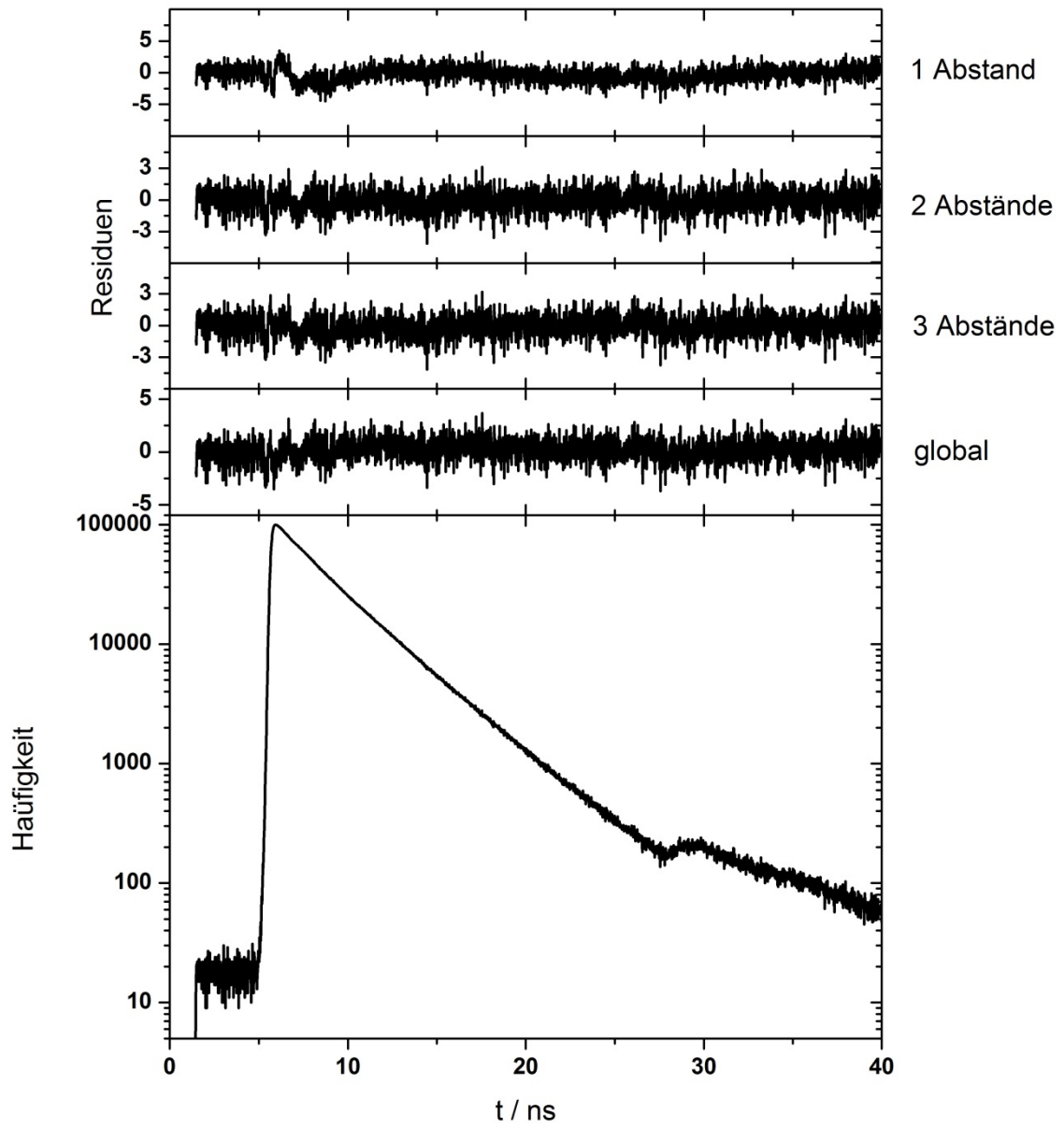
# Anhänge

## Freies Enzym Y766F



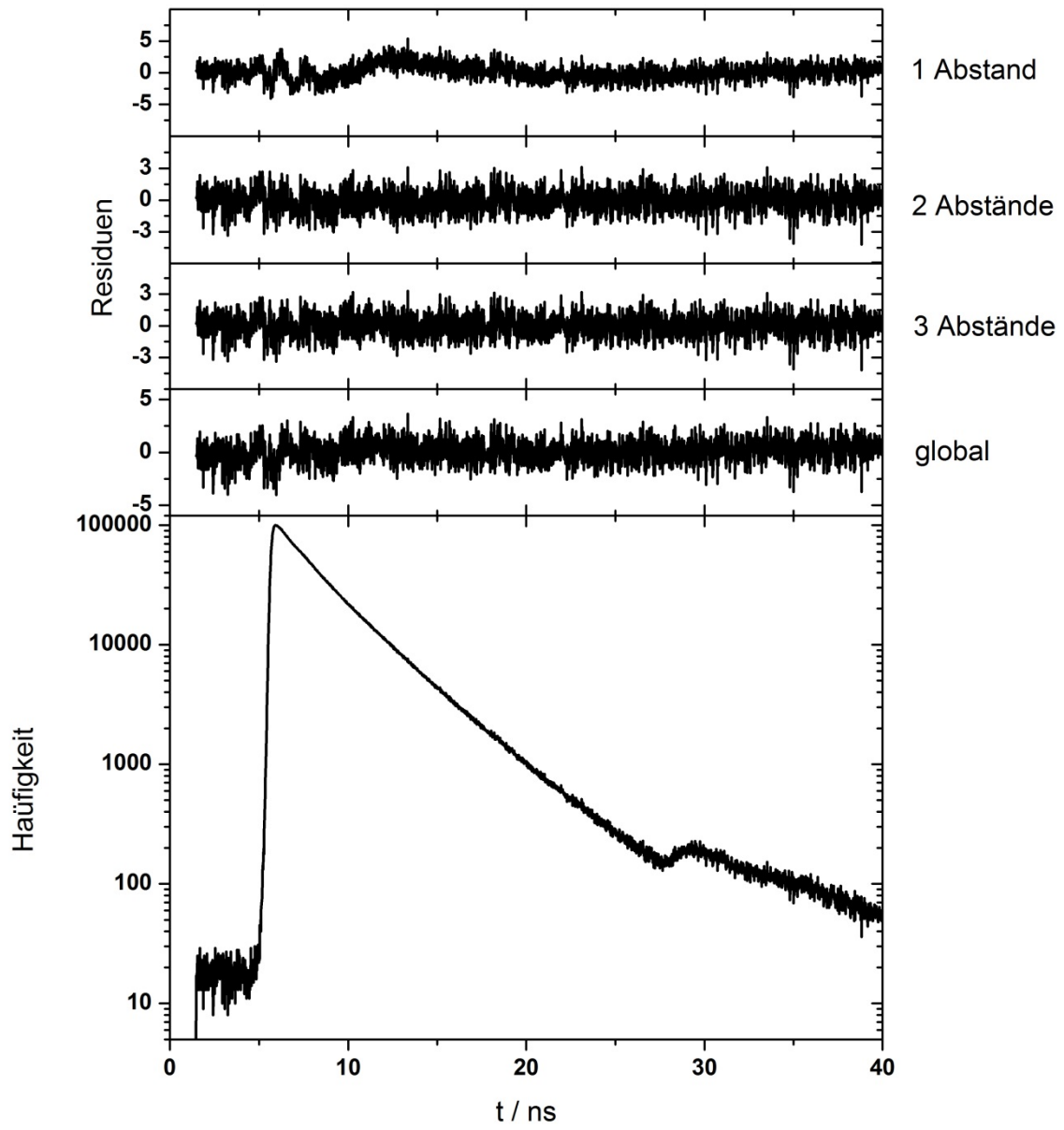
# Anhänge

## Enzym-DNA-Komplex Wildtyp



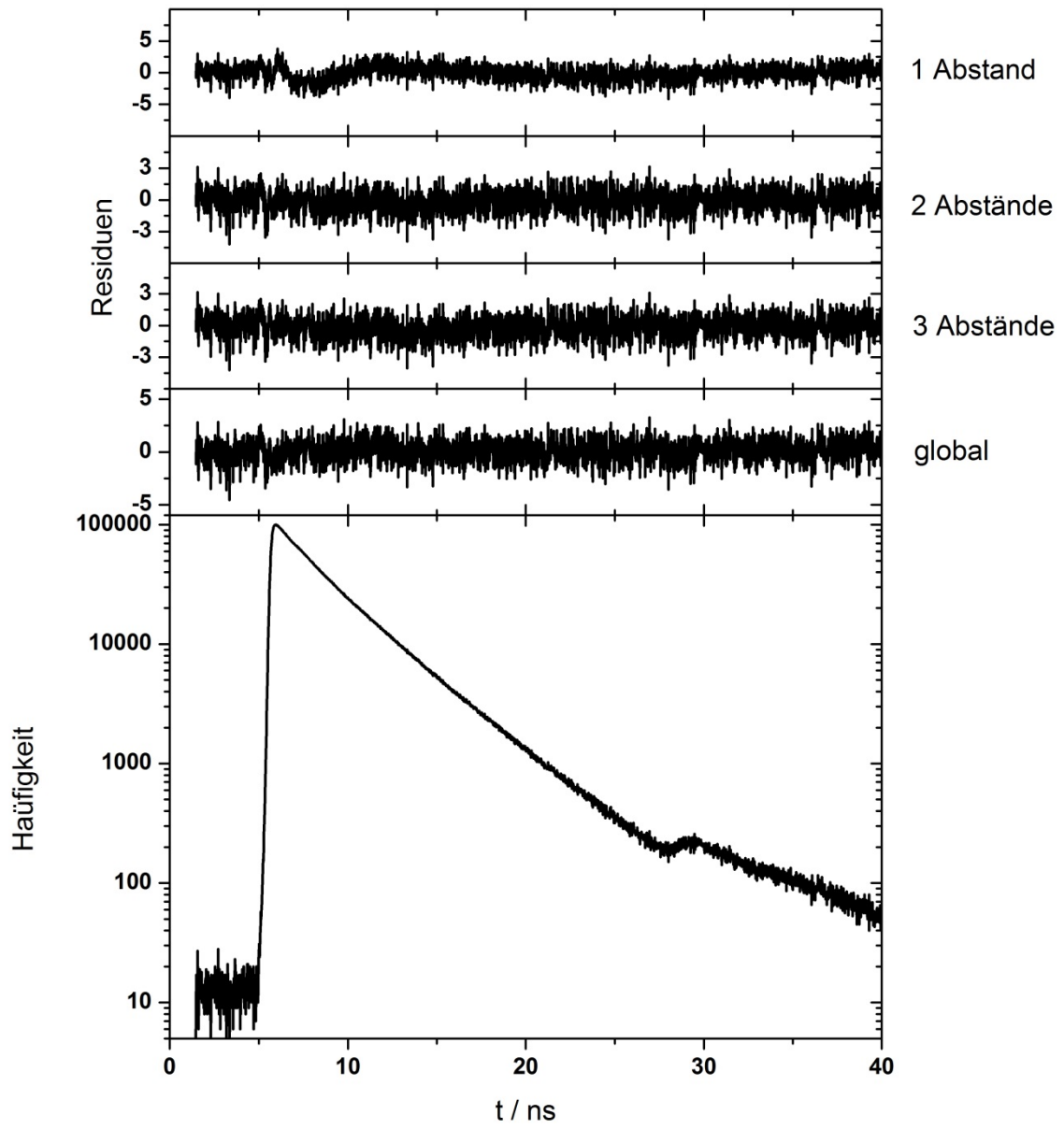
# Anhänge

## Enzym-DNA-Komplex Y766S



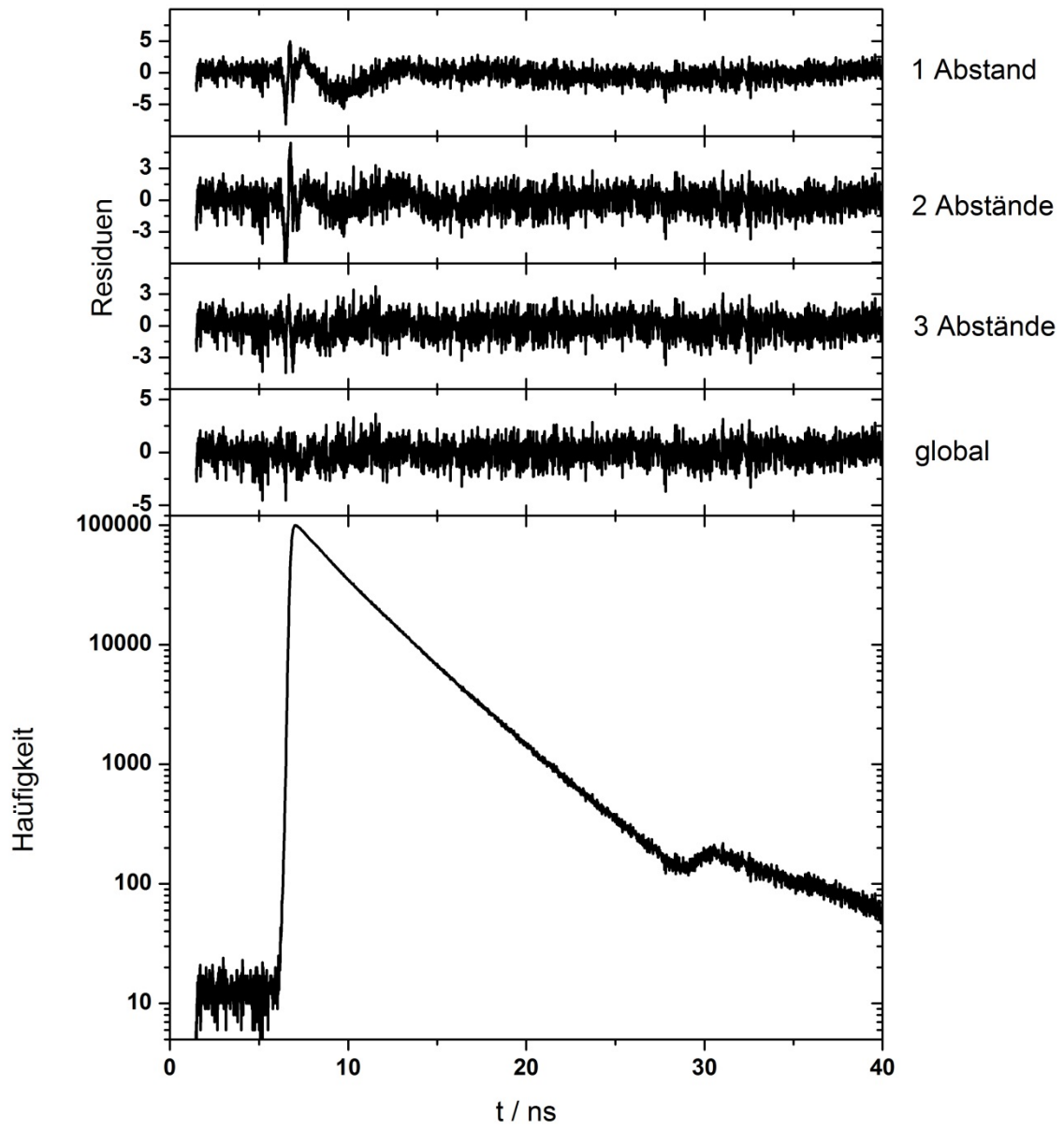
# Anhänge

## Enzym-DNA-Komplex Y766F



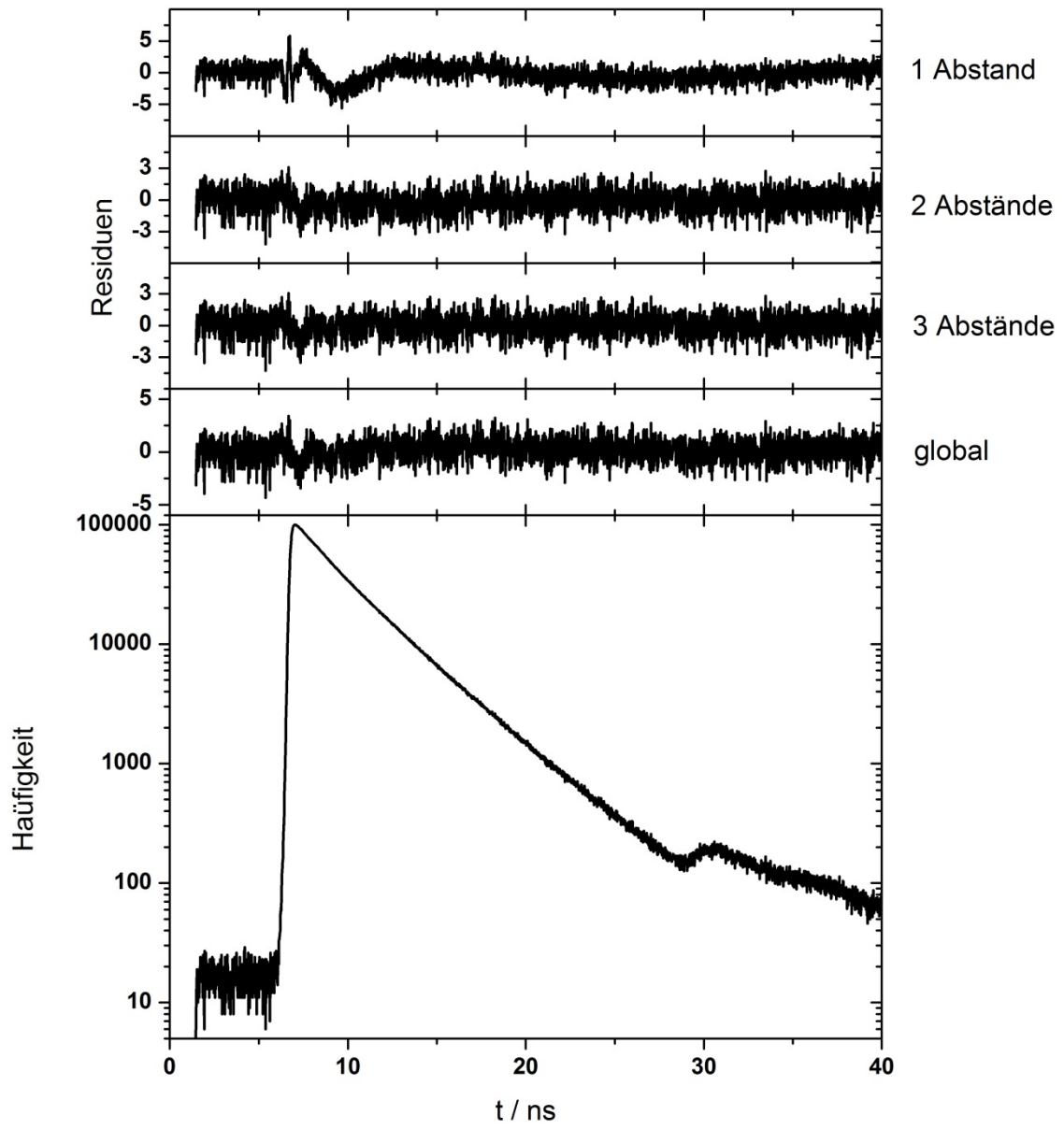
# Anhänge

## Enzym-NTP-Komplex Wildtyp



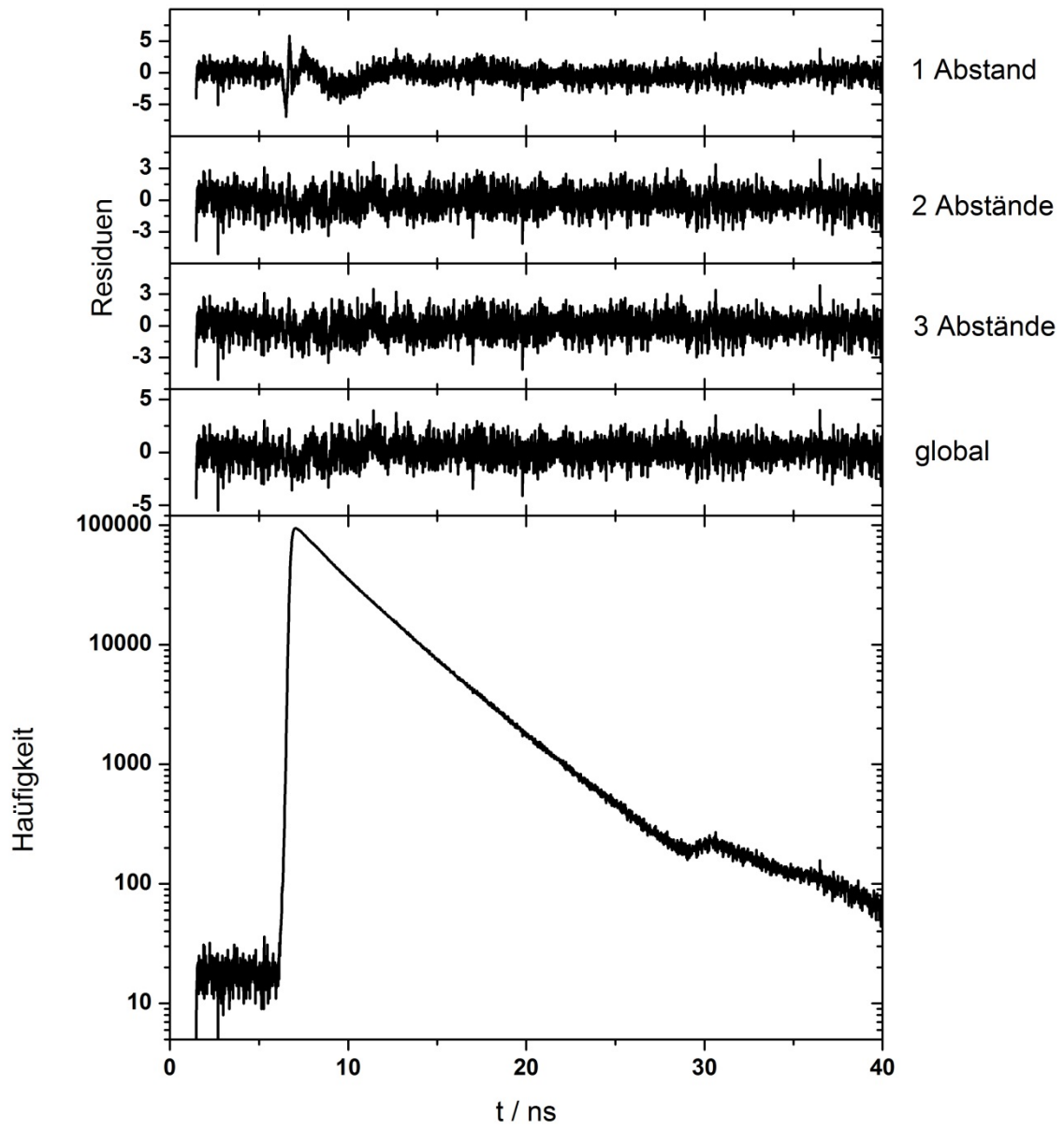
# Anhänge

## Enzym-NTP-Komplex Y766S



# Anhänge

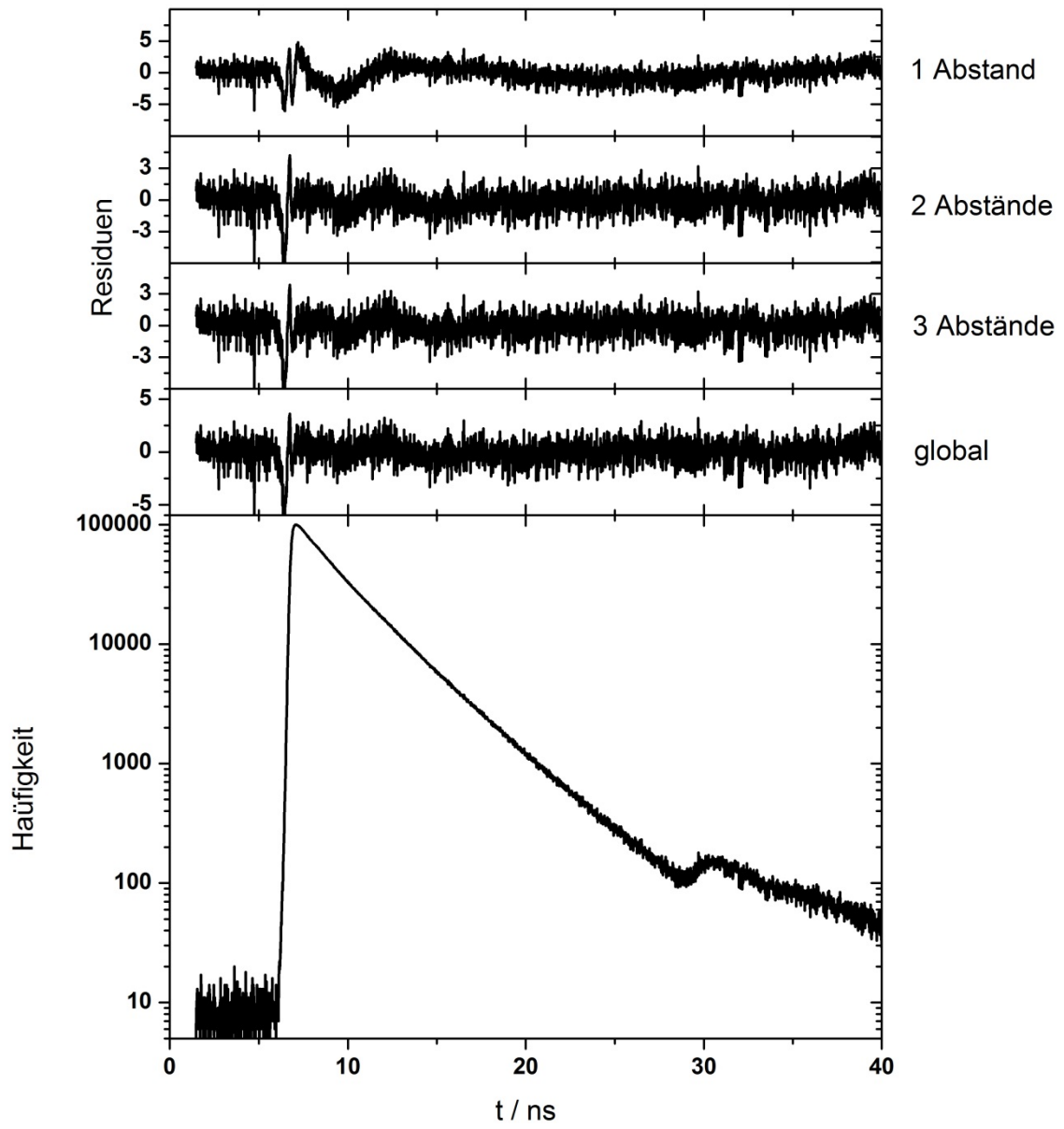
## Enzym-NTP-Komplex Y766F





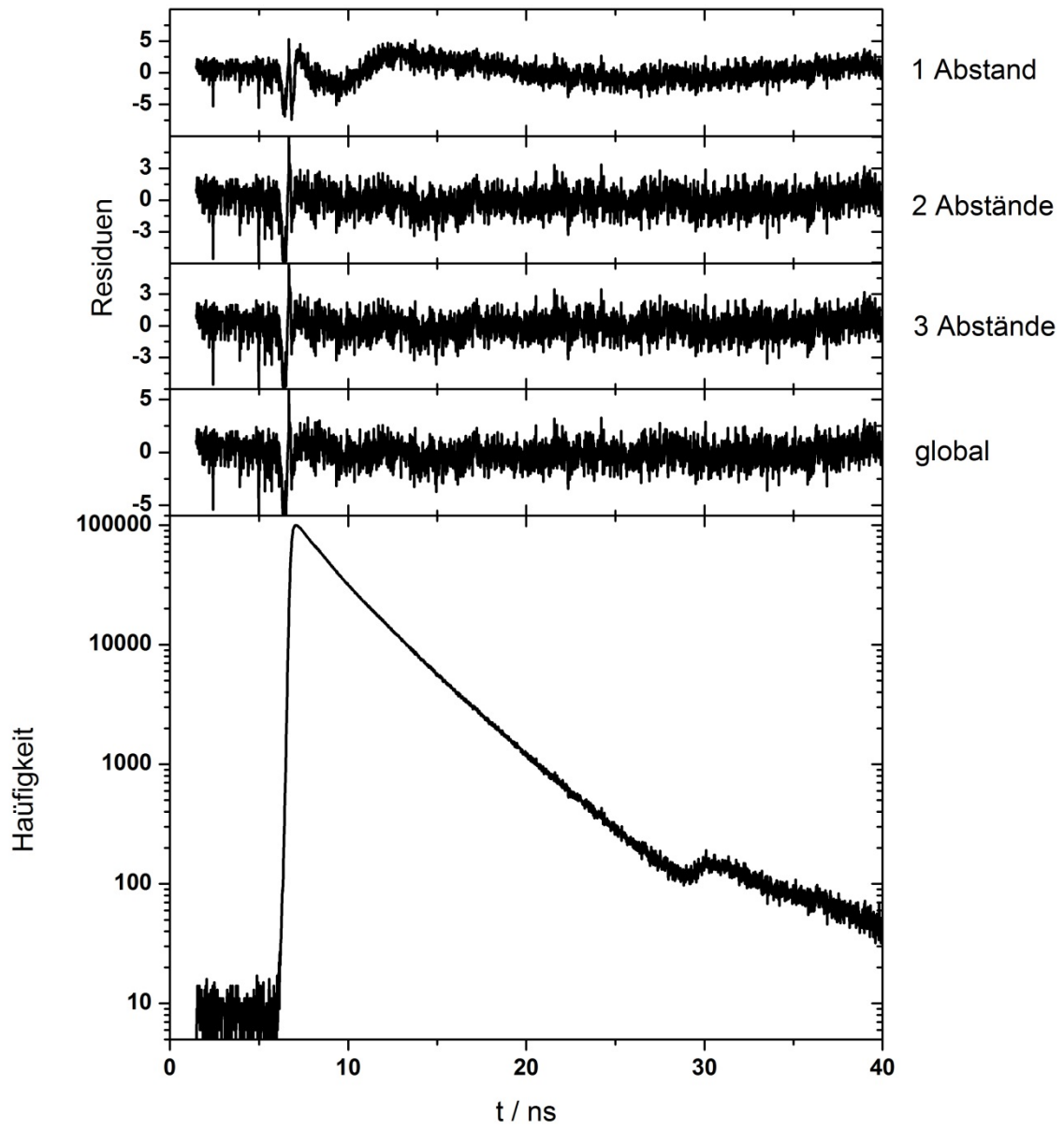
# Anhänge

## Korrektes Nukleotid Wildtyp



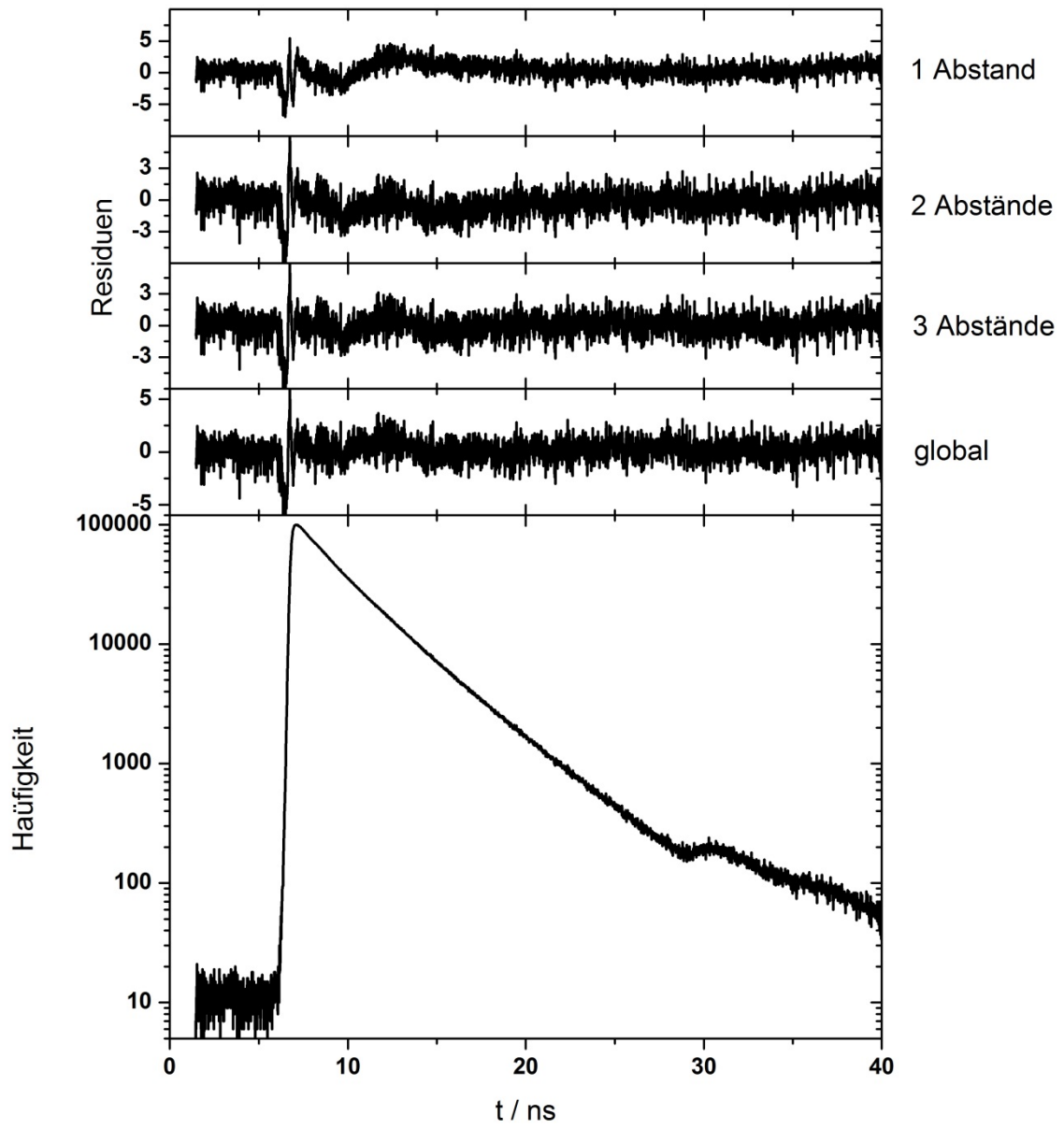
# Anhänge

## Korrektes Nukleotid Y766S



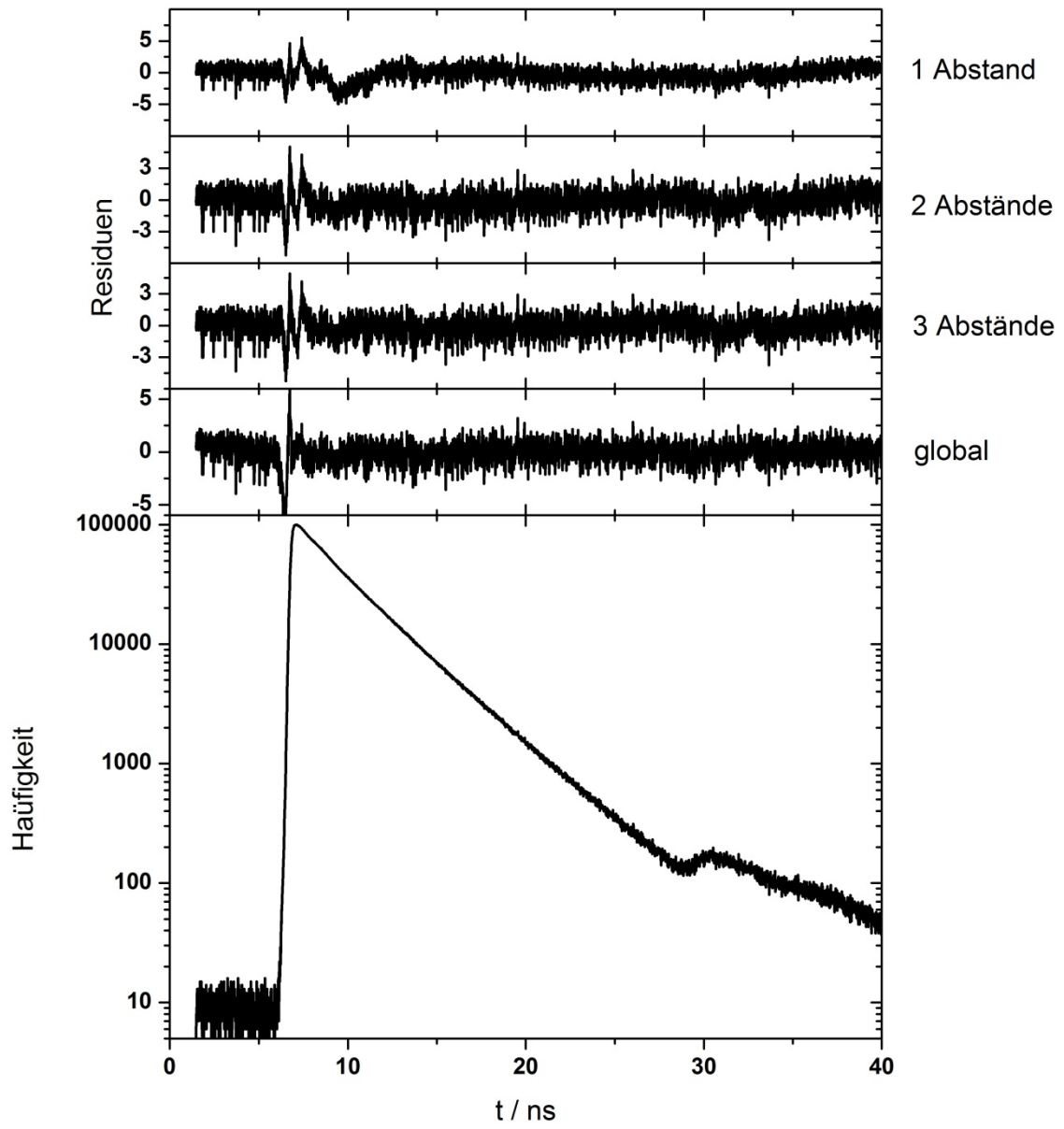
# Anhänge

## Korrektes Nukleotid Y766F



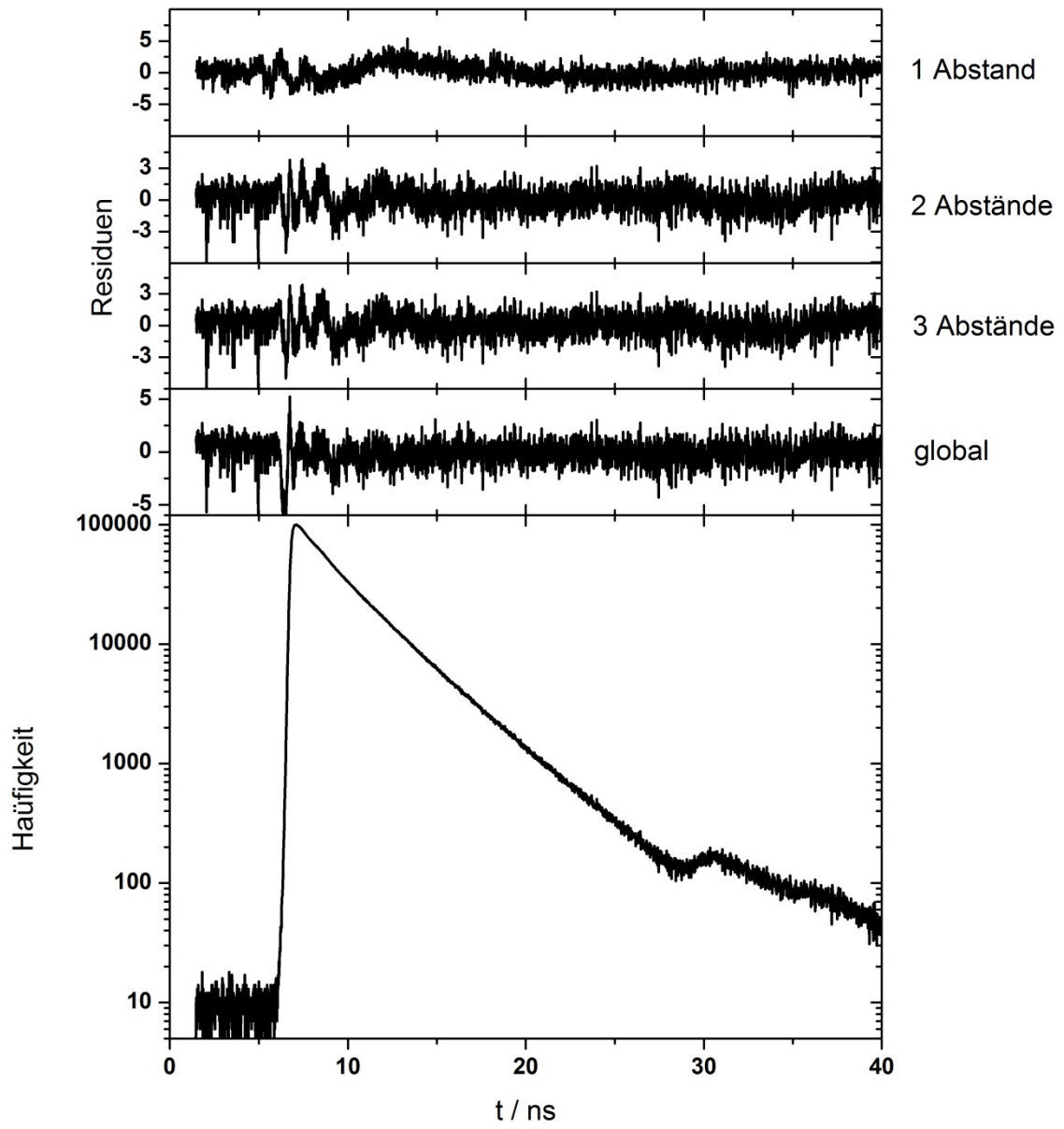
# Anhänge

## Inkorrektes Nukleotid Wildtyp



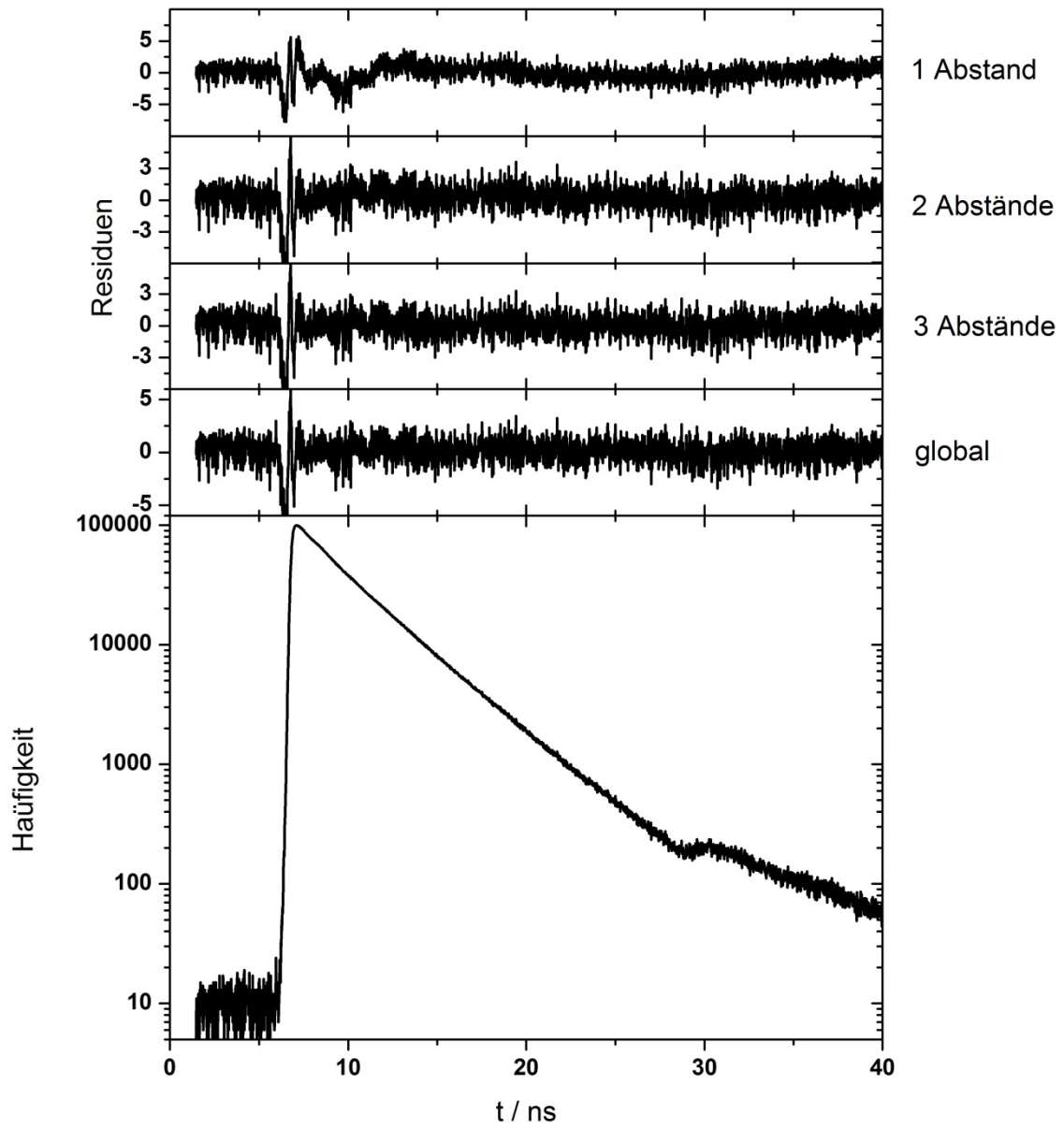
# Anhänge

## Inkorrektes Nukleotid Y766S



# Anhänge

## Inkorrektes Nukleotid Y766F



## Anhänge

Ergebnisse finale globale Anpassung mit drei Abständen und freiem Donorfarbstoff												
	$\sigma = 6 \text{ \AA}$						$\sigma = \text{Modellparameter (final 6.7 \AA)}$					
	Abstände	63,2 \AA	52,2 \AA	38,7 \AA	Chi <sup>2</sup>	xDonly	63,3 \AA	52,5 \AA	38,8 \AA	Chi <sup>2</sup>	xDonly	
	x1	x2	x3				x1	x2	x3			
freies Enzym												
	wt	31	44	25	1,11	12	29	45	26	1,07	12	
	Y766S	42	37	21	1,12	15	41	37	22	1,11	15	
	Y766F	5	65	30	1,20	28	2	67	31	1,18	28	
Enzym + NTP												
	wt	64	25	11	1,10	12	63	25	11	1,10	12	
	Y766S	53	35	12	1,15	16	51	36	13	1,13	16	
	Y766F	61	29	10	1,14	27	61	29	10	1,13	27	
Enzym + DNA												
	wt	66	23	11	1,12	21	66	23	11	1,07	21	
	Y766S	35	52	13	1,15	19	33	54	12	1,15	19	
	Y766F	40	45	15	1,11	30	39	46	15	1,11	30	
Korrekt												
	wt	48	38	14	1,29	9	47	39	14	1,29	9	
	Y766S	39	42	19	1,43	12	38	43	19	1,40	12	
	Y766F	42	45	13	1,34	24	41	46	13	1,32	24	
Inkorrekt												
	wt	68	21	11	1,30	11	67	21	12	1,28	11	
	Y766S	46	39	15	1,45	14	44	40	16	1,44	14	
	Y766F	67	20	13	1,45	24	67	20	13	1,43	24	

## Anhänge

Ergebnisse Modellanpassung 1 Abstand , 2 Abstände individuell															
	1 Abstand $\sigma = 6 \text{ \AA}$						2 Abstände $\sigma = 6 \text{ \AA}$								
	R1/Å	Chi <sup>2</sup>	xDonly	R1/Å	R2/Å	x1	x2	Chi <sup>2</sup>	xDonly	R1/Å	R2/Å	x1	x2	Chi <sup>2</sup>	xDonly
freies Enzym	w	52,20	1,80	0,23	57,50	42,30	0,64	0,36	0,36	57,50	42,30	0,64	0,36	1,07	0,15
	s	53,30	2,44	0,28	60,10	43,50	0,65	0,35	0,35	60,10	43,50	0,65	0,35	1,29	0,17
	f	49,60	1,70	0,34	53,50	40,90	0,63	0,37	0,37	53,50	40,90	0,63	0,37	1,09	0,29
Enzym + NTP	w	57,00	1,88	0,24	62,30	46,80	0,77	0,23	0,23	62,30	46,80	0,77	0,23	1,33	0,13
	s	55,50	1,86	0,28	6035,00	44,40	0,75	0,25	0,25	6035,00	44,40	0,75	0,25	1,14	0,18
	f	56,60	1,60	0,38	60,30	43,10	0,82	0,18	0,18	60,30	43,10	0,82	0,18	1,11	0,29
Enzym + DNA	w	57,00	1,44	0,33	63,20	46,10	0,77	0,23	0,23	63,20	46,10	0,77	0,23	1,06	0,20
	s	53,50	1,63	0,28	59,30	46,00	0,65	0,35	0,35	59,30	46,00	0,65	0,35	1,08	0,20
	f	53,80	1,44	0,39	59,80	45,10	0,68	0,32	0,32	59,80	45,10	0,68	0,32	1,15	0,31
Korrekt	w	54,70	2,17	0,21	59,40	44,10	0,73	0,27	0,27	59,40	44,10	0,73	0,27	1,31	0,12
	s	53,40	2,74	0,23	58,90	43,70	0,68	0,32	0,32	58,90	43,70	0,68	0,32	1,41	0,14
	f	54,00	1,93	0,34	57,90	43,20	0,75	0,25	0,25	57,90	43,20	0,75	0,25	1,48	0,28
Inkorrekt	w	57,30	1,73	0,24	64,00	49,60	0,72	0,28	0,28	64,00	49,60	0,72	0,28	1,25	0,11
	s	54,50	2,01	0,26	62,50	47,80	0,60	0,40	0,40	62,50	47,80	0,60	0,40	1,38	0,15
	f	56,40	1,99	0,37	62,00	44,20	0,79	0,21	0,21	62,00	44,20	0,79	0,21	1,52	0,25

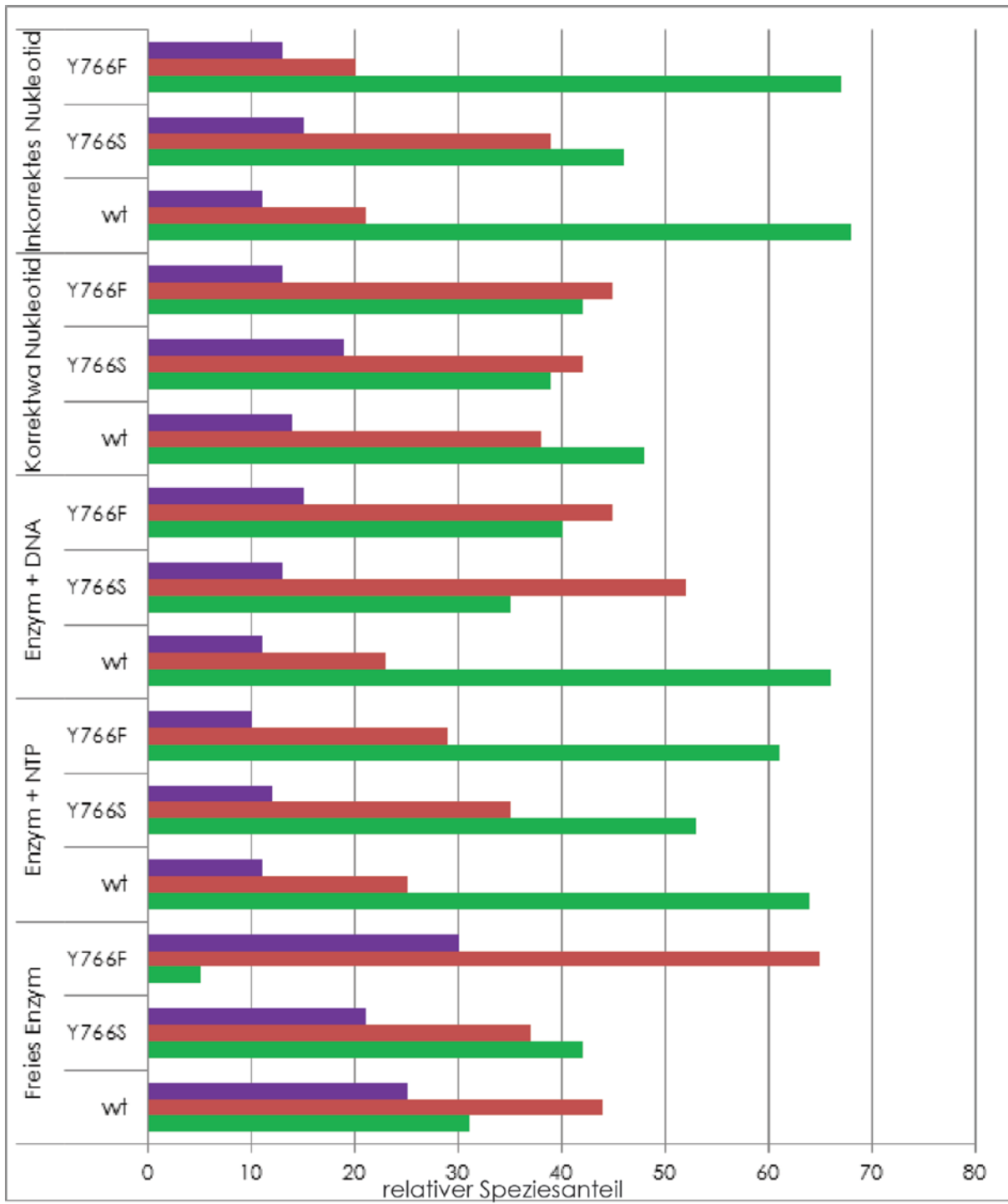


## Anhänge

Ergebnisse Modellanpassung 3 Abstände individuell  $\sigma = 6 \text{ \AA}$

	R1/Å	R2/Å	R3/Å	x1	x2	x3	Chi <sup>2</sup>	xDonly
freies Enzym	w	68,30	52,50	39,20	0,28	0,48	0,24	1,02
	s	88,50	58,70	43,10	0,22	0,50	0,28	1,06
	f	56,60	52,20	39,70	0,12	0,54	0,34	1,11
Enzym + NTP	w	103,10	61,60	45,50	0,07	0,72	0,20	1,12
	s	72,10	55,00	41,60	0,40	0,46	0,14	1,09
	f	60,60	56,90	43,10	0,77	0,05	0,18	1,12
Enzym + DNA	w	69,80	59,20	45,10	0,39	0,43	0,18	1,15
	s	59,30	59,30	46,00	0,38	0,27	0,35	1,07
	f	65,10	57,90	44,80	0,21	0,49	0,30	1,18
Korrekt	w	59,30	44,00	43,60	0,73	0,23	0,04	1,31
	s	60,50	56,00	43,50	0,44	0,26	0,30	1,40
	f	200,00	58,50	44,40	0,08	0,67	0,25	1,31
Inkorrekt	w	74,50	58,60	48,10	0,40	0,44	0,16	1,21
	s	62,50	57,50	47,80	0,60	0,00	0,40	1,38
	f	62,00	44,20	26,40	0,79	0,21	0,00	1,43

## Anhänge



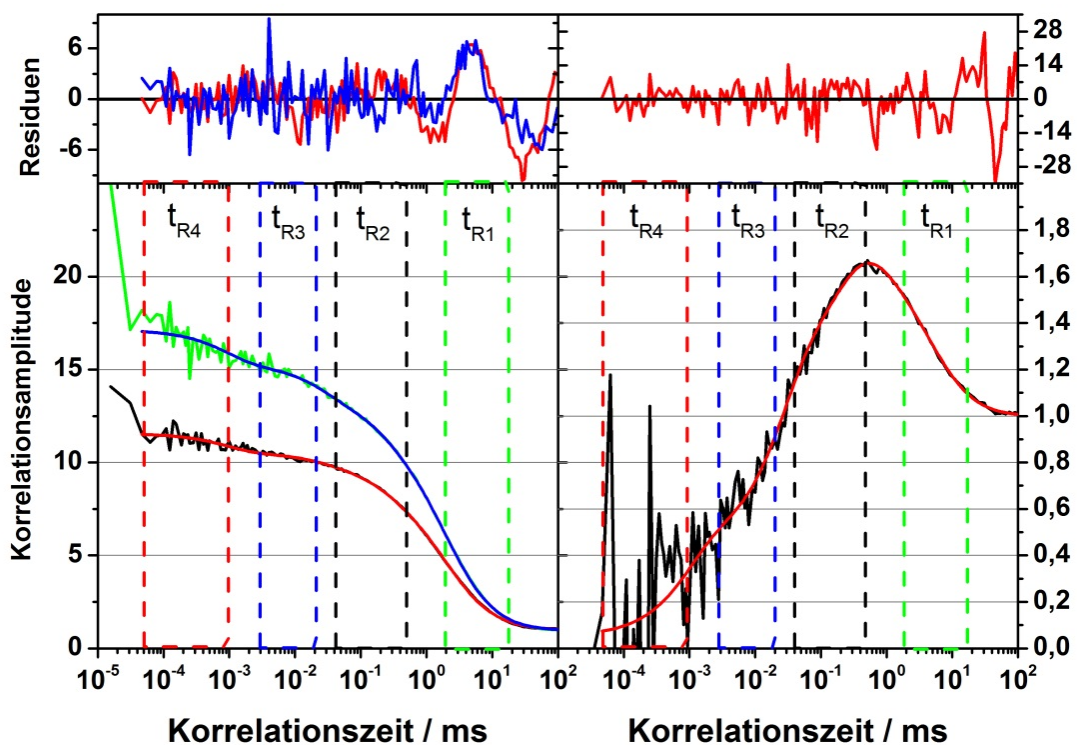
## Anhänge

### Anhang B: SCCF Ergebnisse

Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der Spezieskreuzkorrelationsexperimente für die Variante KF-D548C-A488 G743C-A647. Für die Bedingung „Korrektes Nukleotid“ konnte aufgrund von Aggregationseffekten nur eine Autokorrelation des langen Abstandes verwendet werden (Suren Felekyan, persönliche Diskussion). Dargestellt sind in schwarz rechts die Kreuzkorrelation, in schwarz links die Autokorrelation des langen Abstandes und in grün links die Autokorrelation des kurzen Abstandes. In rot bzw. blau sind die jeweiligen Modellfunktionen eingezeichnet. Im oberen Teil der Abbildung finden sich die zur jeweiligen Modellfunktion zugehörigen Residuen. Die angepassten Zeiten sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

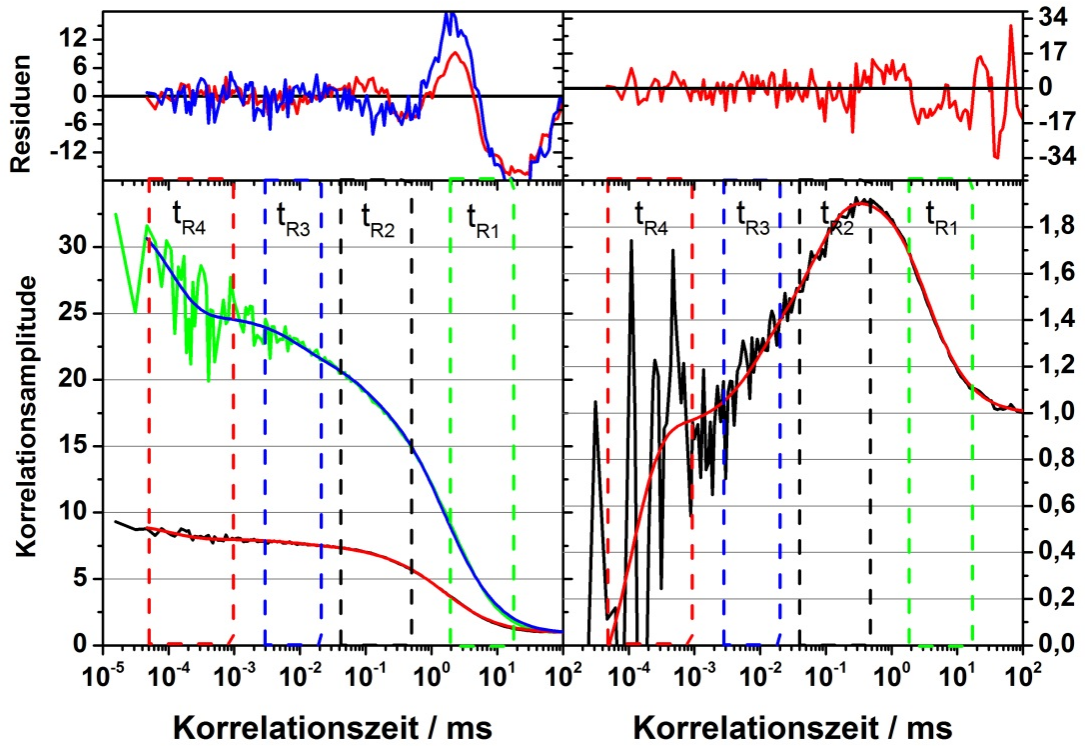
	$t_{R1}/ms$	$t_{R2}/ms$	$t_{R3}/ms$	$t_{R4}/ms$
<b>freies Enzym</b>	4.98	0.20	0.02	0.001
<b>Enzym + ATP</b>	19.98	0.27	0.03	0.0007
<b>Enzym + DNA</b>	1.27	0.08	0.01	0.0001
<b>Korrektes Nukleotid</b>	1.88	0.06	0.0004	0.00001
<b>Inkorrektes Nukleotid</b>	1.56	0.20	0.03	0.001

#### Freies Enzym

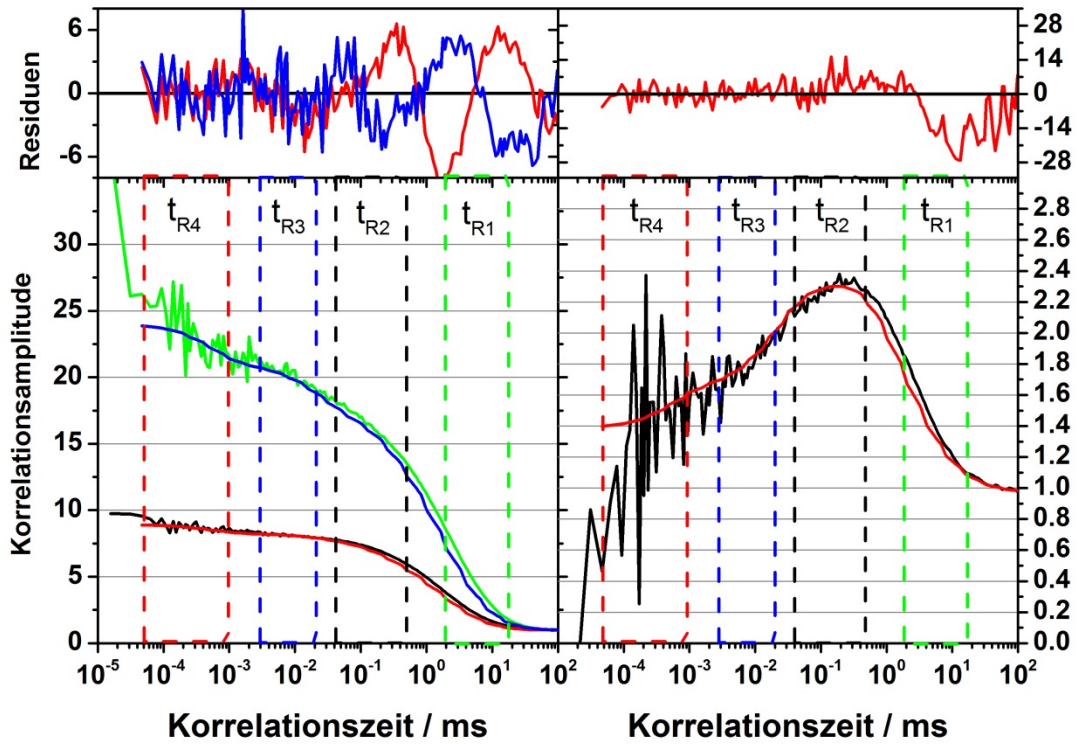


# Anhänge

## Enzym-DNA-Komplex

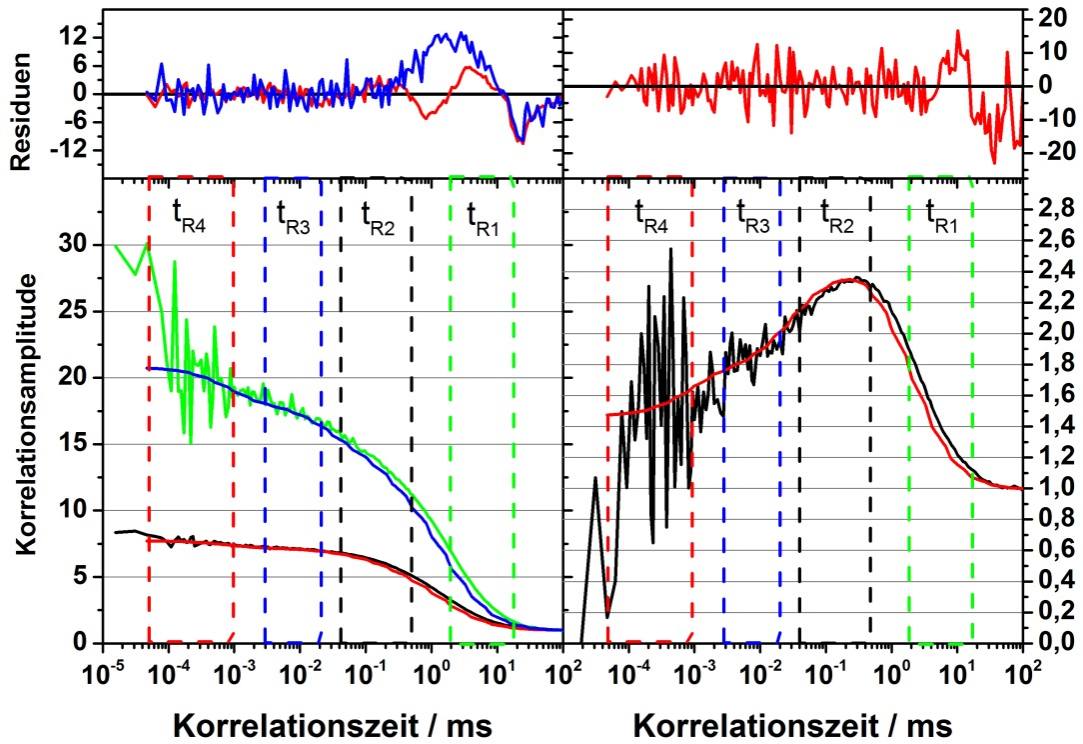


## Enzym-NTP-komplex

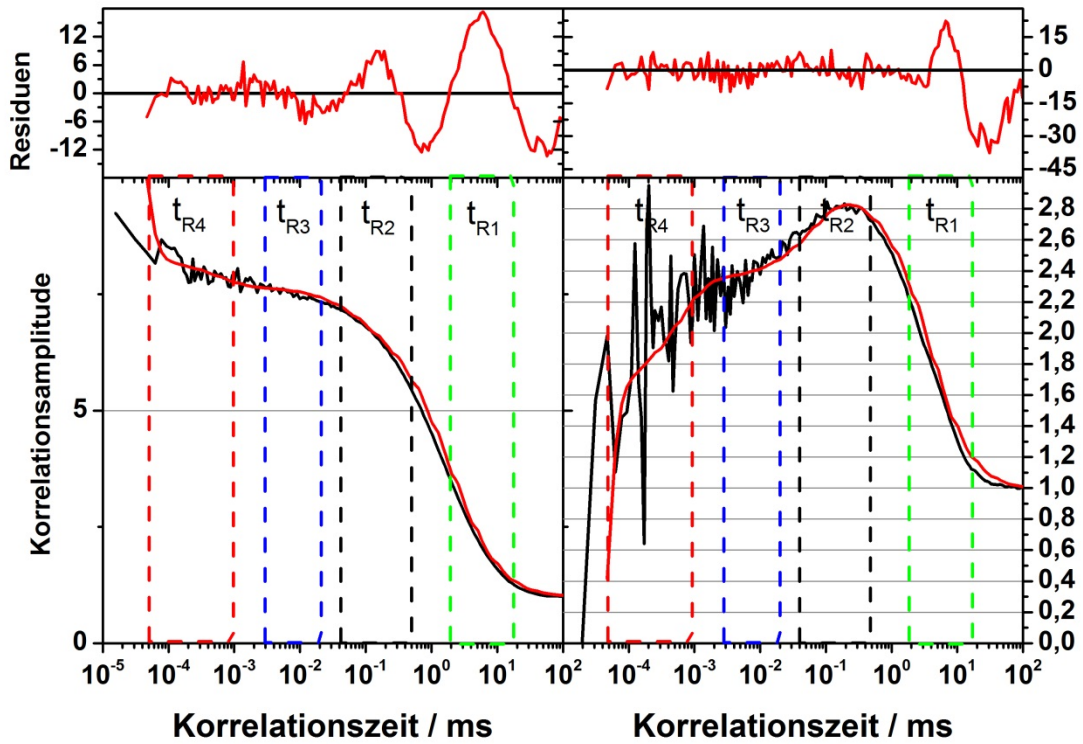


# Anhänge

## Inkorrektes Nukleotid



## Korrektes Nukleotid



## Anhänge

### Anhang D: Aminosäuresequenzen

#### Klenow-Fragment D548C,G743C

Proteinname	DNA Polymerase I Fragment 324-928, Variante D548C G743C
Molekulargewicht	68105.9 g/mol
Anzahl der Aminosäuren	605
Theoretischer pI	5,71
Extinktionskoeffizient	58790 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> bei 280 nm
Aminosäure-Sequenz	VISYDNYVTILDEETLKAWIAKLEKAPVFAFDTEETDS LDNISANLVGLSFAIEPGVAAYIPVAHDYLDAPDQIS RERALELLKPLLEDEKALKVGNLKYDRGILANYGIE LRGIAFDTMLESYILNSVAGRHDMSLAERWLKHKTI TFEEIAGKGNQLTFNQIALEEAGRYAAEDADVTLQL HLKMWPDQKHKGPLNVFENIEMPLVPVLSRIERNV KI <sup>C</sup> PKVLHNSSEELTLRLAELEKKAHEIAGEEFNLSS TKQLQTLFEKQGIKPLKKTGGAPSTSEEVLLELAL DYPLPKVILEYRGLAKLKSTYTDKPLMINPKTGRVH TSYHQAVTATGRLSSTDPNLQNI PVRNEEGRRIRQAF IAPEDYVIVSADYSQIELRIMAHLSRDKGLLTAFAG KDIHRATAAEVFC <sup>L</sup> PLETVTSEQRRSAKAINFGLIYG MSAFGLARQLNIPRKEAQKYMPLYFERYPGVLEYMER TRAQAKEQGYVETLDGRRLYLPDIKSSNGARRAAAER AAINAPMQGTAADI IKRAMIAVDLQAEQPRVRMIM QVHDELVFEVHKDDVDAVAKQIHQLMENCTRLDVPLL VEVGSGENWDQAH

#### Klenow-Fragment D548C,G743C,Y766S

Proteinname	DNA Polymerase I Fragment 324-928, Variante D548C G743C Y766S
Molekulargewicht	68029.8 g/mol
Anzahl der Aminosäuren	605
Theoretischer pI	5,71
Extinktionskoeffizient	57300 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> bei 280 nm
Aminosäure-Sequenz	VISYDNYVTILDEETLKAWIAKLEKAPVFAFDTEETDS LDNISANLVGLSFAIEPGVAAYIPVAHDYLDAPDQIS RERALELLKPLLEDEKALKVGNLKYDRGILANYGIE LRGIAFDTMLESYILNSVAGRHDMSLAERWLKHKTI TFEEIAGKGNQLTFNQIALEEAGRYAAEDADVTLQL HLKMWPDQKHKGPLNVFENIEMPLVPVLSRIERNV KI <sup>C</sup> PKVLHNSSEELTLRLAELEKKAHEIAGEEFNLSS TKQLQTLFEKQGIKPLKKTGGAPSTSEEVLLELAL DYPLPKVILEYRGLAKLKSTYTDKPLMINPKTGRVH TSYHQAVTATGRLSSTDPNLQNI PVRNEEGRRIRQAF IAPEDYVIVSADYSQIELRIMAHLSRDKGLLTAFAG KDIHRATAAEVFC <sup>L</sup> PLETVTSEQRRSAKAINFGLIS <sup>G</sup> MSAFGLARQLNIPRKEAQKYMPLYFERYPGVLEYMER TRAQAKEQGYVETLDGRRLYLPDIKSSNGARRAAAER AAINAPMQGTAADI IKRAMIAVDLQAEQPRVRMIM QVHDELVFEVHKDDVDAVAKQIHQLMENCTRLDVPLL VEVGSGENWDQAH

## Anhänge

### Klenow-Fragment D548C,G743C,Y766F

Proteinname	DNA Polymerase I Fragment 324-928, Variante D548C G743C Y766F
Molekulargewicht	68089.9 g/mol
Anzahl der Aminosäuren	605
Theoretischer pI	5,71
Extinktionskoeffizient	57300 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> bei 280 nm
Aminosäure-Sequenz	VISYDNYVTILDEETLKAWIAKLEKAPVFAFDTETDS LDNISANLVGLSFAIEPGVAAYIPVAHDYLDAPDQIS RERALELLKPLLEDEKALKVGNLKYDRGILANYGIE LRGIAFDTMLESYILNSVAGRHDMSLAERWLKHKTI TFEEIAGKGNQLTFNQIALEEAGRYAAEDADVTLQL HLKMWPDQKHKGPLNVFENIEMPLVPVLSRIERNV KI <sup>C</sup> PKVLHNHSEELTLRLAELEKKAHEIAGEEFNLSS TKQLQTILFEKQGIKPLKKTGGAPSTSEEVLLELAL DYPLPKVILEYRGLAKLKSTYTDKPLMINPKTGRVH TSYHQAVTATGRLSSTDPNLQNI PVRNEEGRRIRQAF IAPEDYVIVSADYSQIELRIMAHLSRDKGLLTAFAGEG KDIHRATAAEVFC <sup>L</sup> PLETVTSEQRRSAKAINFG <sup>L</sup> IFG MSAFGLARQLNI PRKEAQKYMDLYFERYPGVLEYMER TRAQAKEQGYVETLDGRRLYL PDIKSSNGARRAAAER AAINAPMQGTAADI IKRAMIAVDAWLQAEQPRVRMIM QVHDELVFEVHKDDVDVAVAKQIHQLMENCTRLDVPLL VEVGSGENWDQAH

### Anhang E: Manuskript

Die Beiträge des Doktoranden sind wie folgt:

- Präparation der Glasoberflächen zur Immobilisierung des Moleküls an Oberflächen
- Probenpräparation für die TIRF-Spektroskopie
- Beteiligung an den Messungen von immobilisierten Probenmolekülen und der Datenanalyse
- Beteiligung an der Manuskripterstellung
- Gesamtbeitrag: 8%

## Single-molecule FRET detects intermediates and fast dynamics of DNA Holliday junctions

Alessandro Valeri <sup>a,\*</sup>, Suren Felekyan <sup>a,\*</sup>, Stanislav Kalinin <sup>a,\*</sup>, Markus Richert <sup>a</sup>, Stefan Marawske <sup>a</sup>, Enno Schweinberger <sup>a</sup>, Ralf Kühnemuth <sup>a</sup>, Claus A.M. Seidel <sup>a</sup>

A.V. and E.S. designed the studies; A.V. and S.F. prepared samples and did the measurements on the confocal setup; M.R. and S.M. prepared samples and did the measurements on the TIRF setup; S.F., R.K. and S.K. were responsible for the correlation analysis; S.F., S.K. and S.M. developed the software; A.V., E.S., S.F., S.K., M.R., S.M., R.K. and C.A.M.S. wrote the manuscript; C.A.M.S. supervised the project

<sup>a</sup> Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, Geb. 26.32, 40225 Düsseldorf, Germany; \* contributed equally

**Holliday junctions are four-way DNA junctions that occur during genetic recombination. Previous studies have shown that in the presence of Mg<sup>2+</sup> ions Holliday junctions continually switch between two stacking conformations with rates strongly dependent on the ion concentration. We performed FRET studies using confocal single molecule detection (SMD) with diffusing molecules or evanescent excitation of immobilized single molecules as well as ensemble fluorescence lifetime studies. We access the full dynamic time range of fluorescence from ns to s in order to capture all dynamic ranges. A complex Mg-dependent kinetics was found. The minimal model that describes the observed kinetics consists of four states, with only two distinct FRET levels. All methods and analysis techniques consistently reveal continuous interconversion also in absence of Mg<sup>2+</sup> whereas binding of Mg<sup>2+</sup> “locks” the junctions in the respective states. Our results shape a new view on structural properties of four-way DNA junctions, identifying a dynamic equilibrium instead of an accumulation of a single open structure at low Mg<sup>2+</sup>.**

Holliday junctions (HJ) are four-way DNA junctions formed during genetic recombination through strand exchange between two homologous duplexes (1, 2). Therefore, this structure represents an important intermediate in all processes responsible for the repair of damaged genetic material (3-6) and also provides the necessary genetic diversity needed for evolution. The outcome of all processes in which the junctions are involved depends ultimately on the way the junction is cleaved by its resolving enzymes. Thus, a deeper knowledge of the structural and dynamical properties of the Holliday junction itself is important.

Previously it has been shown that under physiological conditions (1-2 mM Mg<sup>2+</sup>) the junction adopts a compact (or folded) conformation where the helices are coaxially paired in a right-handed anti-parallel fashion, with an angle of approximately 60°

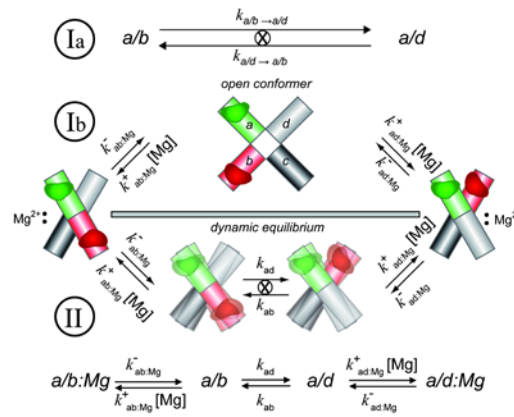


## Anhänge

between the helical axes (8-11). Two conformers with anti-parallel backbone orientation are possible depending on the way the four arms stack. The DNA sequence, especially near the branching point, determines the stability of the possible conformers (12, 13). The rate of interconversion between the two conformers depends on the metal ion (especially  $Mg^{2+}$ ) concentration, with high  $[Mg^{2+}]$  slowing the exchange (14, 15). Furthermore, the presence of metal ions is also known to decrease branch migration rates up to three orders of magnitude (16).

It is proposed that conformer exchange and branch migration go through the same, highly flexible state where the junction is in an open conformation, a state similar to the one with no bound metal ions. However, at present there is no structural information on the transient species populated during these conformational changes (14, 15, 17). The so far proposed kinetic scheme of the conformer interconversion of HJs includes three states with two stacked conformers  $a/b$  and  $a/d$  and an *open* transition (scheme Ia in Figure 1) or intermediate state (scheme Ib) in an extended, unstacked conformation (14, 18, 19). The  $a/b$  and  $a/d$  conformers are believed to be stabilized by  $Mg^{2+}$  binding in the junction region, whereas at low  $Mg^{2+}$  concentration the model Ib obviously predicts accumulation of the *open* state (Figure 1). However, this *open* form has never been directly detected in single-molecule experiments (15). Although the presumed existence of this state helps to explain many ensemble experiments, alternative interpretations are usually possible (a Mg-dependent shift in the  $a/b \leftrightarrow a/d$  equilibrium is the most straightforward one). Another controversy with models Ia and Ib is their behavior at high  $Mg^{2+}$ . In this case, the population of *open* becomes negligible and schemes Ia and Ib can be considered kinetically equivalent. Apparent 2-state dynamics (Ia) with interconversion rates  $k_{a/b \rightarrow a/d}$  and  $k_{a/d \rightarrow a/b}$  is then observed. One can easily show (SI 5.3.2) that both models predict these rates to be essentially independent of  $[Mg^{2+}]$ , provided that the rate constants in schemes Ia-Ib are also Mg-independent. This obviously contradicts to many experimental studies (14, 15, 17), which reported a strong Mg-dependence of the switching rates of HJs.

## Anhänge



**Figure 1.** Top (I) sketch: 3-state interconversion model with  $a/b$  and  $a/d$  stacked and the open conformers. The green and red lobes represent the spatial distributions of the donor and the acceptor dyes, respectively. The  $\otimes$  symbol indicates the open conformer as a transition state in the interconversion mechanism. As a consequence, the scheme Ia can be approximated by 2-state equilibrium. Bottom (II) sketch: new 4-state model with the states  $a/b:Mg$ ,  $a/b$  (here both high-FRET),  $a/d$ , and  $a/d:Mg$  (both mid-FRET) from left to right. Mg-free  $a/b$  and  $a/d$  are shown as superimposed structures to indicate their conformational flexibility.

With this work, we aim to establish a consistent model of Mg-dependent structural dynamics of DNA four-way junctions. We applied various fluorescence techniques in combination with single-molecule detection which allow one to resolve dynamic biomolecular heterogeneity over timescales ranging from nanoseconds to hours. Our results led to an enhanced 4-state kinetic model with two FRET levels and two kinetic levels instead of the so far anticipated open state

## Results

We studied an immobile (no branch migration) DNA HJ (see Material and Methods) labeled with Alexa488 (donor) and Atto647N (acceptor) dyes forming a FRET pair with the Förster radius  $R_0 = 49.3 \text{ \AA}$ . We employed three labeling schemes (Table 1) to unambiguously distinguish the two stacked ( $a/b$  and  $a/d$ ) and the open conformer by their characteristic FRET efficiencies: High-FRET (HF), Mid-FRET (MF) and Low-FRET

## Anhänge

(LF). The labeled HJs are named such that D() and A() refer to the donor and the acceptor, respectively, and the letters *a* to *d* refer to the helix where the dye is placed.

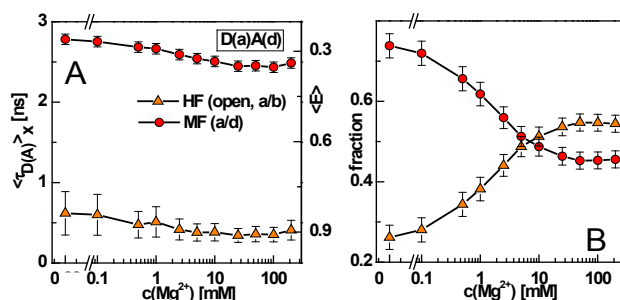
**Table 1.** Sketches and corresponding FRET levels of the HJ conformers for different labeling schemes. Green and red lobes indicate the donor and the acceptor positions respectively. The grey background indicates similar FRET species.

Label scheme	Conformer/ FRET species					
	open		a/b		a/d	
D(a)A(b)		MF		MF		HF
D(a)A(c)		LF		MF		MF
D(a)A(d)		HF		HF		MF

**Two stacked conformers are observed at all Mg<sup>2+</sup> concentrations.** To characterize the three potential conformers with ultimate time resolution, we performed ensemble fluorescence lifetime measurements of the HJ by ensemble Time Correlated Single Photon Counting (eTCSPC) at Mg<sup>2+</sup> concentrations ranging from 0 to 200 mM. eTCSPC resolves all FRET species that live longer than the fluorescence decay time (~ns). Thus, this technique is very well suited to obtain a snapshot of the equilibrium populations and the fluorescence lifetimes of the species present in our experiments.

The fluorescence decays were fitted with a model accounting for two FRET states and a donor-only population (Eq. S1, Fig. S1). To recover correct species fractions, it is mandatory to consider donor-acceptor distance distributions in the FRET states due to dye linker movement (20) (see SI section 3.1). Typical Mg<sup>2+</sup> dependences for species-averaged fluorescence lifetimes  $\langle \tau_{D(A)} \rangle_x$  (Eq. S2A) and for the species fractions *x* of HJ D(*a*)A(*d*) are shown in Figure. 2.

## Anhänge



**Figure 2.** Mg-titrations: eTCSPC results for the labeling scheme D(a)A(d). The average lifetimes of the species (ca. 0.5, 2.6 and 4.1 ns for HF, MF and D-only, respectively), are only weakly dependent on Mg<sup>2+</sup> (panel A). The fractions of HF and MF clearly show a shift in equilibrium between two conformers (panel B) while the fraction of D-Only (~5%) is independent of Mg<sup>2+</sup>.

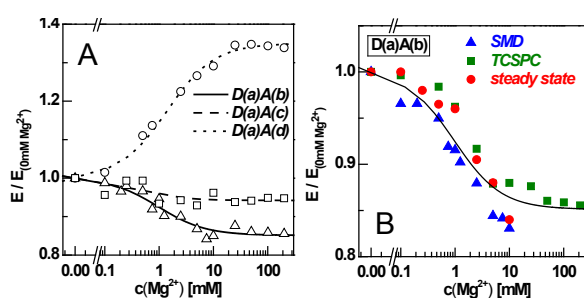
Two important results are observed: (1) the existence of the same two FRET species at all Mg<sup>2+</sup> concentrations (triangles and circles in Figure 2A) and (2) a shift of the equilibrium populations as a function of Mg<sup>2+</sup> (Figure 2B). Mainly the latter effect causes Mg<sup>2+</sup>-dependent change of the average FRET efficiency of the ensemble, whereas the lifetimes of the FRET states change very little (by <0.3 ns) (Figure 2A). The mean species-averaged fluorescence lifetimes (eq. S2A) of three species detected by eTCSPC are 0.5, 2.6 and 4.1 ns, respectively. These decay times are compatible with High-FRET (HF), Mid-FRET (MF) and with a state showing no transfer of energy, No-FRET (NF; ~5%), attributed to molecules labeled only with donor dye (D-only). Considering the labeling positions on the four stems of the FRET construct D(a)A(d), MF can be attributed to the a/d conformer while HF can be attributed to both the a/b or the open conformer (see Table 1 and SI 3.1). This uncertainty does not change the fact that a/d is present at all salt concentrations.

The increase of FRET signal at low Mg<sup>2+</sup> concentrations can either be due to the transition from the stacked to the open conformation (case A) or due to a shift between the equilibrium populations of a/b and a/d (case B). To obtain evidence for case B, we investigated two additional labeling schemes of the same junction. The donor was kept in the same position, D(a<sub>α</sub>7), while the acceptor was placed once

## Anhänge

on arm *c*,  $A(c_{\gamma 9})$ , and once on arm *b*,  $A(b_{\beta 10})$  (see Material and Methods). Figure 3 displays the  $Mg^{2+}$ -titrations for the different FRET constructs. Junction  $D(a)A(c)$  is designed so that the donor-acceptor distance is nearly the same in the *a/b* and *a/d* conformations (MF) while it changes to LF in the *open* one (see Table 1 and SI 3.1). If the *open* conformer accumulates at low salt concentrations, a decrease in  $E$  with falling  $Mg^{2+}$  would be expected. However, no significant change in the FRET signal over the complete range of  $Mg^{2+}$  concentrations (dashed line Figure 3A) was observed for this sample. This indicates that at low  $[Mg^{2+}]$  the contribution of the *open* conformer is not significant, thus supporting the idea that case B best describes the system. In junction  $D(a)A(b)$ , the FRET states are similar to those in  $D(a)A(d)$  but, due to the different positioning of the acceptor, the assignments result inverted as expected (*a/d* is HF, *a/b* and *open* are MF; see Table 1). Moreover, also for  $D(a)A(b)$  at 0 mM  $[Mg^{2+}]$  one FRET species is insufficient in accuracy to describe the eTCSPC and SMD data (SI section 5). Thus, in contrast to what is reported so far (8, 18), *open* is not the only populated conformation even at 0 mM  $Mg^{2+}$  concentration. To exclude the possibility that the presence of *a/b* or *a/d* at low  $Mg^{2+}$  concentrations is due to  $Na^+$  ions, the measurement at 0 mM  $[Mg^{2+}]$  was repeated in sodium chloride free Tris/Borate/EDTA (TBE) buffer and yielded the same results (see Table S3).

From the  $Mg^{2+}$  titrations (Figure 3A; see also SI 3.2) it is evident that  $D(a)A(b)$  and  $D(a)A(d)$  can be described by very similar apparent association equilibrium,  $K_{app}$  of  $1.03 \text{ mM}^{-1} [Mg^{2+}]$  and  $0.79 \text{ mM}^{-1} [Mg^{2+}]$  respectively, suggesting that in both cases the equilibria are governed by similar rate constants and only the FRET levels are exchanged. The latter hypothesis is supported by the fact that for two HJs the fractions of FRET populations found in eTCSPC and SMD experiments show similar dependence on the  $Mg^{2+}$  concentration (see SI 3.1.1). The absolute  $K_{app}$  values are smaller than those reported previously, which is most likely due to the presence of 50 mM NaCl in our buffer(14). At 0.5 mM NaCl, we obtained a lower dissociation constant of ca. 270  $\mu\text{M}$  (Fig. S3F).



## Anhänge

**Figure 3.** (A)  $Mg^{2+}$ -dependence of normalized  $E/E_{(0mM\ Mg^{2+})}$  FRET efficiencies for different junctions: for D(a)A(c) and D(a)A(d), the data points are obtained by eTCSPC measurements, while for D(a)A(b) they represent the average FRET efficiency values obtained from SMD, steady state fluorescence, and eTCSPC measurements. The solid, dotted and dashed lines represent the fit of a Hill equation ( $n = 1$ ; see SI 3.2) to the three data sets.  $K_{app}$  are  $1.03\ mM^{-1}$  and  $0.79\ mM^{-1}$  for D(a)A(b) and D(a)A(d), respectively, while for D(a)A(c) the change in  $E$  is insufficient for a reliable fit of  $K_{app}$ . A global fit for these three curves yields  $K_{app} = 0.89\ mM^{-1}$  (B) Comparison between different techniques for D(a)A(b). The  $Mg^{2+}$ -dependence of normalized  $E/E_{(0mM\ Mg^{2+})}$  was studied by SMD and eTCSPC (blue triangles, red circles and green squares, respectively). To quantitatively estimate the average FRET efficiency  $E$  in SMD experiments, the data were analyzed by PDA. The black line shows the fit of a Hill equation (see SI 3.2) to averaged data from all three techniques.

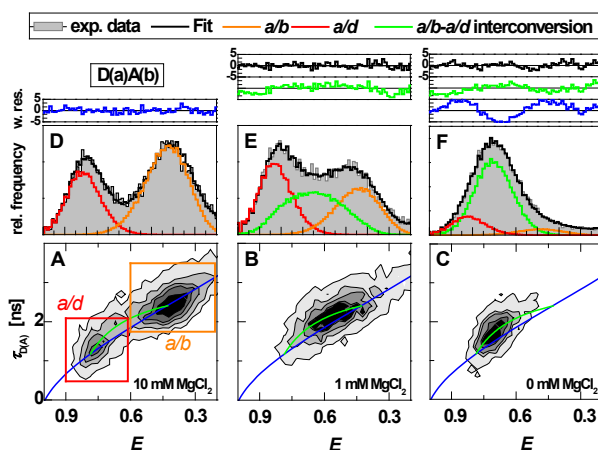
For D(a)A(b), in addition to eTCSPC experiments, steady state fluorescence measurements were performed at all  $Mg^{2+}$  concentrations (red circles in Figure 3B). The dependence of the FRET signal on  $Mg^{2+}$  concentration is the same as in the time resolved experiments. However, in these experiments only average signals of two FRET states revealed by eTCSPC are recorded. In this perspective, it is possible to attribute the changes in FRET efficiency observed in similar experiments (15, 18, 21) to the change in equilibrium populations of two conformers, not necessarily involving accumulation of the open state.

**Single-molecule FRET measurements.** Ensemble measurements alone cannot detect any eventual interconversion dynamics between the species. Therefore, in order to study the interconversion mechanism, we resorted to single-molecule FRET (smFRET) to further characterize the FRET species avoiding ensemble averaging. In case of single-molecule experiments, D(a)A(b) appeared to provide optimal FRET levels and separation between the states. The freely diffusing labeled molecules generated brief fluorescence bursts. These bursts were selected by threshold criteria and for each of them the signal intensities, lifetimes ( $\tau$ ) and anisotropies ( $r$ ) of the donor (D)

## Anhänge

and acceptor (A) dyes were determined. FRET efficiency,  $E$ , was obtained after correcting the recorded signal for mean background, spectral crosstalk and detection efficiencies of color channels (SI 5.1.3). The results obtained for key concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  are shown in Figure 4A-C, where the lifetime of the donor in the presence of the acceptor,  $\tau_{D(A)}$ , is plotted against  $E$  (complete series in SI 5.1.1, Fig. S2). The HJ samples resulted to be fully functional with interconversion dynamics strongly dependent on  $\text{MgCl}_2$  concentration. At higher salt concentrations three distinct populations could be observed, one displaying lower FRET ( $E \approx 0.40$ ,  $\tau_{D(A)} \approx 2.5$  ns), one higher FRET ( $E \approx 0.75$ ,  $\tau_{D(A)} \approx 1.3$  ns) and one no FRET ( $E \approx 0$ ,  $\tau_{D(A)} \approx 3.9$  ns). The states individuated in single-molecule experiments matched closely those of HF (that corresponds to  $a/d$ ), MF (corresponds to  $a/b$ ) and NF obtained in ensemble lifetime experiments (SI 5.1.2). At 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , the sample can be considered to be static on the ms timescale, because all populations perfectly fit to the static FRET line (black line in Figure 4A-C; corrected for linker flexibility, see SI 5.1.4). However, as the salt concentration is lowered, the FRET populations start to merge, indicating that the conformers interconvert on a timescale faster than diffusion. In accordance with ensemble experiments, an increase of the average FRET signal is observed as the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration decreases (blue triangles in Figure 3B). In the absence of  $\text{Mg}^{2+}$ , the only visible population is located completely off the static FRET line (22) suggesting that the HJs dynamically fluctuate between two conformers (green line in Figure 4A-C, SI 5.1.4).

## Anhänge



**Figure 4.** Single-molecule measurements of D(a)A(b) at key  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations. A-C) 2D Histograms of donor lifetime in the presence of the acceptor,  $\tau_{D(A)}$  as a function of E. Two FRET populations, HF and MF, are clearly visible at 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (red and orange box in A, respectively). As the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration is lowered the species start to coalesce and merge completely at 0 mM  $\text{MgCl}_2$ . The blue and light green lines are the static and dynamic FRET lines (see SI 5.1.4). The dynamic FRET line is obtained by the interconversion of MF and HF states. D-F). PDA fits of one-dimensional FRET efficiency E histograms are shown on the upper panel of the 2D-histogram graphs, respectively. The contributions of the static conformers a/b and a/d (orange and red respectively) and the dynamically interconverting ones (green) are shown. Static and dynamic heterogeneities are easily distinguished in a global fit with multiple time windows (tw) of 0.5 ms, 1.0 ms and 3.0 ms; see SI 5.2; the displayed data correspond to tw = 3 ms. The FRET states were best fitted by different models indicated by global  $\chi^2$  values and weighted residuals on top panels for different  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations; (D) 2 static states only ( $\chi^2=1.4$ , blue) at 10 mM, (E) 2 static states plus 1 dynamic term ( $\chi^2=1.3$ , grey) in comparison to a dynamic one only ( $\chi^2=3.3$ , green) at 1 mM and (F) 2 static states only ( $\chi^2=7.2$ , blue), one dynamic term only ( $\chi^2=3.2$ , green) and a combined static and dynamic model ( $\chi^2=1.6$ , grey) at 0 mM [ $\text{Mg}^{2+}$ ].

**Photon Distribution Analysis (PDA).** To quantitatively analyze the smFRET data, Photon Distribution Analysis (PDA) (22-25) was performed. PDA efficiently separates static and dynamic (22) heterogeneities from photon shot-noise, background, and acceptor dye broadening.

At 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , smFRET data can be fitted with two static FRET states (Figure 4D; see SI 5.2 and Fig. S3 for further details on PDA). So far, this is consistent with the 2- or 3-state kinetic models (schemes Ia and Ib in Figure 1) because the conformers are static on the observation timescale (ms). The mean donor-acceptor distances of the two stacked conformers resulted to be 52 Å and 38 Å for a/b and a/d, respectively, in good agreement with eTCSPC data (SI 4.1). Furthermore, using structural models of the HJ conformers based on the known crystal structure 1DCW(10) (Fig. S1D-E), we simulated dyes' accessible volumes (AVs) (20, 26) and calculated expected FRET-averaged donor-acceptor distances. The AV predictions were 46 Å and 38 Å for a/b and a/d, respectively, also consistent with PDA results.



## Anhänge

On the other hand, for all other  $\text{MgCl}_2$  concentrations the established models Ia and Ib failed to adequately describe our smFRET data. First, the FRET population at 0 mM  $\text{MgCl}_2$  was insufficiently fitted with a single static state to test if the presence of the open conformer can explain the observed distribution ( $\chi_r^2=31$ , not shown). A two-state static model also appeared to be inappropriate ( $\chi_r^2=7.2$ ; Figure 4F). The fit of the data with a two-state dynamic term (Figure 4F) yielded significantly better results. Remarkably, the fitted mean DA distances of the dynamic states (50 Å and 37 Å) closely matched those found for the static *a/b* and *a/d* conformers at 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (see SI 5.2.3), suggesting that these dynamic FRET states originate from the same, or at least very similar, molecular structures as in the compact populations. This finding is fully consistent with the eTCSPC results (Figure 2).

Next, at an intermediate  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of 1 mM (Figure 4B) the approximated 2-state equilibrium predicts slow interconversion between *a/b* and *a/d* conformers, which should be described by a single dynamic term. In fact, this model is clearly not optimal ( $\chi_r^2=3.3$ ; Figure 4E). An improved fit with  $\chi_r^2=1.3$  can be obtained by considering a superposition of dynamic and static states found at low and high  $\text{Mg}^{2+}$ , respectively (Figure 4E and SI 5.2.3).

Taken together, PDA results indicate that at least two interconverting states are needed in the absence of  $\text{Mg}^{2+}$ , and two other quasi-static states are observed at high  $\text{MgCl}_2$  (10 mM). This already suggests that at least four states are needed to satisfactorily fit the data for all salt concentrations. At 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  all four states are simultaneously present, further supporting this conclusion.

**New 4-state model.** eTCSPC and PDA results led to a revision of the 3-state model introduced so far (Figure 1). In analogy to the work of Kobitski et al. on RNA (27), if the Mg-binding/unbinding equilibrium is explicitly taken into account, the simplest model required to explain the PDA and eTCSPC results to be scheme II shown in Figure 1. Here *a/b:Mg* and *a/d:Mg* are the compact Mg-bound conformers, *a/b* and *a/d* are the compact conformers in absence of the divalent ions,  $k_{ab:Mg}^+$  and  $k_{ad:Mg}^+$  are the rate constants of  $\text{Mg}^{2+}$  binding,  $k_{ab:Mg}^-$  and  $k_{ad:Mg}^-$  are the rate constants of  $\text{Mg}^{2+}$  unbinding,  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$  are the interconversion rate constants between *a/b* and *a/d* conformers.

## Anhänge

The data were then fitted again using the new 4-state model. The states  $a/b:Mg$  and  $a/d:Mg$  were assumed to be static on the observation timescale, and the FRET efficiencies of these states were forced to be equal to those of the interconverting  $a/b$  and  $a/d$  conformations, respectively. Surprisingly (14, 15), up to 1 mM  $MgCl_2$  concentration the interconversion rates found by PDA are nearly  $Mg$ -independent (refer to SI 5.2.3). This is easily explained by the fact that the  $Mg$ -binding/unbinding rates at low  $Mg^{2+}$  concentrations are much slower than the  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$  interconversion rates measured during diffusion through the observation volume in SMD experiments. For this reason these processes result decoupled and the  $Mg$ -bound states contribute to the PDA fit as apparently static populations. The rates recovered by PDA are then determined mainly by the rate constants  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$ , which are  $Mg$ -independent as expected from our kinetic model (scheme II in Figure 1). At high salt concentrations the static states dominate, while the dynamic term takes over as the  $Mg^{2+}$  concentration is lowered (see SI 5.2.3 for details), which is also fully consistent with the new 4-state model. The PDA static fractions correspond to the steady state fractions of  $a/b:Mg$  and  $a/d:Mg$ .

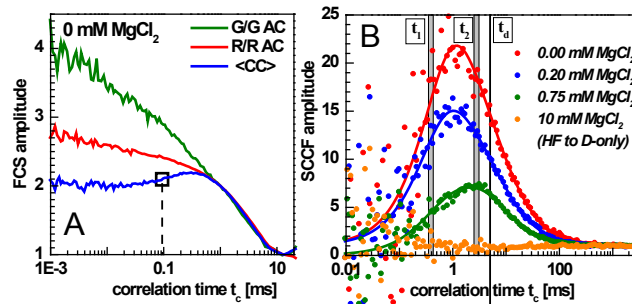
**Filtered Fluorescence Correlation Spectroscopy (fFCS).** To access simultaneously the relaxation times of all equilibria shown in Figure 4, FCS and fFCS was performed (28, 29). A green-red cross-correlation function obtained for the  $D(a)A(b)$  junction in the absence of  $Mg^{2+}$  ions for selected FRET bursts is presented in Figure 5A. A clear anti-correlation in the  $\sim 100 \mu s$  range indicates that interconversion of the FRET species already takes place at 0 mM  $MgCl_2$ , which excludes the idea of the accumulation of single species of an extended HJ. For a quantitative analysis, Species Cross-Correlation Functions (SCCF) were obtained as described in (29, 30) using species-specific fluorescence lifetime filters (see Fig. S4). SCCF allows specifically addressing the species from the 2D MFD-plots indicated by squares in Figure 4. Due to the fact that  $a/b$  and  $a/d$  are structurally similar to  $a/b:Mg$  and  $a/d:Mg$ , respectively, resulting in similar fluorescence lifetimes, the selected FRET populations correspond to  $(a/b + a/b:Mg)$  and  $(a/d + a/d:Mg)$ . In this case, the SCCF describes the likelihood that a species with fluorescence decay pattern of  $(a/b + a/b:Mg)$  conformers changes to a species with decay pattern of  $(a/d + a/d:Mg)$  conformers, and vice versa. The theoretical function for SCCF is given by  $G(t_c) = 1 + (1/N)G_{diff}(t_c)X(t_c)$ , where  $G_{diff}(t_c)$  is the diffusion term,  $N$  is the total number of molecules in the detection volume, and  $X(t_c)$  is the kinetic term accounting for the processes in Figure 1, scheme II. In  $X(t_c)$ ,

## Anhänge

three exponential terms with relaxation times ( $t_1$ ,  $t_2$  and  $t_3$ ) are generally expected which represent the solutions of the kinetic master equation (28, 31) (SI 5.3.1). The approximate analytical solutions for the correlation times are useful to reveal kinetic processes represented by the obtained relaxation times. Under the assumption that the Mg-binding/unbinding rate constants are the same for both conformers and that the two kinetic steps are decoupled as proven by PDA, the evaluated solutions are  $t_1 = 1/(k_{ab}+k_{ad})$ ,  $t_2 = 1/k_{-Mg}$ ,  $t_3 = 1/(k_{-Mg}+k_{+Mg}[Mg])$ , with amplitudes  $A_1 = -1/(1+K_{Mg}[Mg])$ ,  $A_2 = -K_{Mg}[Mg]/(1+K_{Mg}[Mg])$ , and  $A_3 = 0$ , where  $k_{+Mg} = k_{+ab:Mg} = k_{+ad:Mg}$ ,  $k_{-Mg} = k_{-ab:Mg} = k_{-ad:Mg}$ , and  $K_{Mg}$  is the equilibrium association constant of Mg-binding ( $K_{Mg} = k_{+Mg}/k_{-Mg}$ ). We notice that the third relaxation term ( $A_3$ ,  $t_3$ ) vanishes, which is due to only two FRET levels present in our model. Under these conditions a double-exponential relaxation model for the SCCF results to

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot G_{diff}(t_c) \cdot \left( 1 + A_1 \cdot e^{-\frac{t_c}{t_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t_c}{t_2}} \right)$$

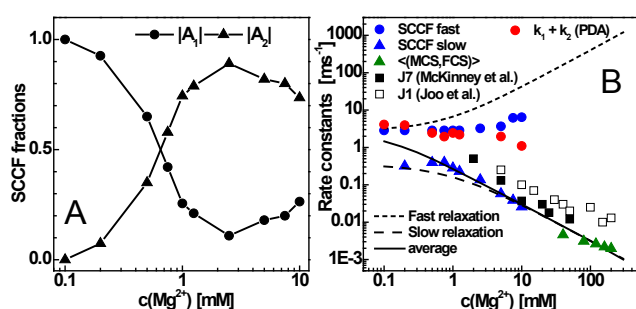
In Figure 5B the SCCF curves and respective fits for 0, 0.2, 0.75 and 10 mM  $MgCl_2$  concentrations are plotted. The fit results for all  $Mg^{2+}$  concentrations are plotted in Figure 6B. As expected for scheme II in Figure 1 (see expressions for  $t_1$  and  $t_2$  above), at low salt concentrations the relaxation rates found by SCCF are independent of  $Mg^{2+}$  concentration with good approximation. At  $Mg^{2+}$  concentrations higher than 2 mM, the rate constants  $k_{ab}$ ,  $k_{ad}$ ,  $k_{+ab:Mg}$  and  $k_{+ad:Mg}$  become comparable. As a consequence, the apparent rates recovered by SCCF now show a strong dependence on the  $Mg^{2+}$  concentration (see Figure 6 and Discussion).



**Figure 5.** FCS and filtered FCS results. A) G/G and R/R auto- and color cross-correlation (CC) curves for FRET bursts at 0 mM  $MgCl_2$  are shown. The color cross-correlation (blue line, the average of the G/R and R/G cross-correlations) curve clearly shows an anti-correlation term at  $\sim 100 \mu s$  (black box). B) HF to MF SCCF curves at 0, 0.2 and 0.75 mM  $MgCl_2$  concentrations (red, blue and green, respectively) are plotted. The ranges of the relaxation times  $t_1$  and  $t_2$  are indicated as grey bars (0.35 to 0.43 ms and 2.5 to 3.1 ms, respectively).

## Anhänge

**Dynamic-PDA vs. SCCF.** All methods (dynamic-PDA, FCS and SCCF) consistently detect the presence of dynamic processes at low salt conditions where only the open conformation was previously believed to be populated (Figure 6B). Up to  $\sim 1$  mM  $\text{Mg}^{2+}$  concentration the equilibria in Figure 4 are effectively decoupled and the rate constants obtained with PDA describe the same relaxation process that in SCCF is associated to  $t_1$ . The rate constants recovered with the two techniques are essentially the same over the range of investigated  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations (Figure 6A-B). The different trend for the rate constants at  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations higher than 1 mM is due to incomplete decoupling of the interconversion equilibrium and Mg-binding/unbinding equilibria so that averaging is expected in the PDA results (rates depend on a combination of  $k_{ab}$ ,  $k_{ad}$ ,  $k^{+ab:\text{Mg}}$  and  $k^{+ad:\text{Mg}}$ ). The relative fractions of the slow and fast relaxation processes found in SCCF qualitatively agree with the relative fractions of  $(a/b + a/d)$  and  $(a/b:\text{Mg} + a/d:\text{Mg})$  found by dynamic PDA (Fig. S3).



**Figure 6.** Filtered FCS (SCCF) results and their comparison with other techniques. (A) Amplitudes of the two relaxation terms in the SCCF curves. (B) Relaxation rates found in SCCF: the fast relaxation ( $1/t_1$ ) and the slow relaxation ( $1/t_2$ ) are represented as filled blue circles and blue triangles, respectively. The fast relaxation is here compared with the PDA results (red circles). The dashed and dotted lines show the expected Mg-dependence of the fast and slow relaxation times, respectively (simulated data). Simulation parameters are  $k_{ad} = 0.8 \text{ ms}^{-1}$ ,  $k_{ab} = 2 \text{ ms}^{-1}$ ,  $k^{-ab:\text{Mg}} = k^{-ad:\text{Mg}} = 0.35 \text{ ms}^{-1}$ ,  $k^{+ab:\text{Mg}} = 2 \text{ ms}^{-1}$  and  $k^{+ad:\text{Mg}} = 4 \text{ ms}^{-1}$ . The black line represents the average between the fast and slow relaxation. In addition, results from smFRET surface measurement of immobilized HJs at high  $\text{Mg}^{2+}$  concentration are given (green triangles). Comparison to previously published data is also included (open and filled squares).

**Theoretical behavior and comparison to published results.** Finally, to revise the observed behavior for  $t_1$  and  $t_2$ , the kinetic master equation (Eq. S27) was numerically solved for a set of rate constants consistent with the experiment (Fig. 6). The assumption of  $k^{+ab:\text{Mg}} \neq k^{+ad:\text{Mg}}$  is required to explain Mg-dependence of the relative fractions of  $(a/b + a/b:\text{Mg})$  and  $(a/d + a/d:\text{Mg})$  (see SI 5.3.2). Qualitatively, the experimental data agree well with the theoretical model (Figure 6B). Due to decoupling of fast and slow processes at low  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations, rates show only a minor dependence on the ion concentration. However, at higher  $\text{Mg}^{2+}$

## Anhänge

concentrations the rate of Mg-binding becomes comparable with  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$ . For a molecule in e.g.  $a/b$ , this can be understood as a competition of  $a/b \rightarrow a/d$  and  $a/b \rightarrow a/b:Mg$  processes, which shortens the lifetime of  $a/b$ . The mean rate constants which rapidly fall with  $Mg^{2+}$  concentration can be directly compared to the rates reported in literature (14, 15). In these studies, the Holliday junction dynamic is investigated by fitting the lifetime of each FRET state of single immobilized molecules by a single exponential that practically gives an average of the two relaxation processes. In Figure 6B the rates found by Ha and co-workers for similar junctions J1 (15) and J7 (14) are given (closed and open squares, respectively). In addition, the change of interconversion rates between the two conformers is influencing the equilibrium between the limiting structures of the junctions and, therefore, changes the mean structure accessible in ensemble measurements which is consistent with published results of electrophoretic gel-studies (8).

To better understand the dynamic properties of HJs during recombination, it is of importance to compare  $1/t_1$  and the rates reported in literature at  $Mg^{2+}$  concentrations comparable to physiological condition (1.5 mM). Figure 6B clearly shows that the  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$  values reported in this paper are at least one order of magnitude faster compared to the apparent average rates found previously (11, 12). This suggests that these rate constants are probably sequence dependent and that Mg-binding/unbinding is governed by electrostatic interactions defined by the junction sequence.

To confirm that the rates extrapolated at higher  $Mg^{2+}$  concentrations are dependent of the junction's sequence, smFRET measurements of immobilized HJs were done at high Mg-concentrations (green triangles in Figure 6B; see also Fig. S5 and S6). For these experiments the difference with the published data is significant compared with experimental errors.

In addition, at high  $Mg^{2+}$  concentration the  $a/b \rightarrow a/d$  the apparent interconversion rate constant is  $k_{ad} k_{ab:Mg} / (k_{ab:Mg}^{+} [Mg])$  (SI 5.3.2), i.e. it is inversely proportional to the  $Mg^{2+}$  concentration, resulting in a linear dependence on a  $\log(k)$ - $\log[Mg^{2+}]$  plot (Figure 6B) with a slope of  $-1$ .

## Anhänge

### Discussion

With the use of ensemble eTCSPC, dynamic-PDA, FCS and filtered FCS we demonstrated that the commonly accepted interconversion model in case of HJ conformers is not adequate and must be seen in a new light. At least two relaxation mechanisms are present, acting on timescales differing by one or more orders of magnitude. In both relaxation mechanisms structurally similar species are involved displaying FRET distances consistent with the folded structures *a/b* and *a/d*. To explain these findings, a new 4-state model, Figure 1, has been introduced. Our observation of dynamic processes at 0 mM Mg<sup>2+</sup> concentration is in contrast with the common assumption of a static situation where the only populated conformer is the *open* one (18) but is fully consistent with the 4-state model proposed in this work. Previously, Overmars and Altona (32) observed "extreme line broadening" in NMR data in the absence of Mg<sup>2+</sup>, which further supports our findings. This is of particular importance because these dynamic properties deeply influence the interactions between the DNA and the proteins involved in the dissociation of the junctions.

The model proposed in this work is also able to explain how the interconversion rate is affected by Mg<sup>2+</sup> concentration without the need to resort to rate constants that are Mg-dependent (14, 15). A direct consequence of scheme II (Fig. 1) is that the observed switching rates are determined not only by the rate constants  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$ , but also by Mg binding and unbinding kinetics. Compared to junctions J1 and J7, our HJs show 2x - 3x lower Mg-binding constants but at the same time at least 2x slower interconversion at high Mg. This suggests that the rate constants  $k_{ab}$  and  $k_{ad}$  are significantly lower for our junctions compared to J1 and J7 and thus must be determined by the sequence.

Finally, we note that all the apparent differences between the results presented in this work and those reported in literature (14, 15, 18) can be explained by taking into account the limited time resolution of the applied spectroscopic techniques, suggesting that these results are not contradictory but rather confirm our model.

Conformational lifetimes in the order of a few hundred milliseconds are slow on the NMR chemical shift time scale, but fast on the time scale (hours) necessary for the electrophoretic separation of molecular species. Therefore, in a conformational equilibrium situation one expects to obtain a time-averaged mobility in electrophoreses of four-way junctions that are designed to display different mobilities

## Anhänge

for the various conformational species. From NMR spectroscopy and chemical protection experiments, it is likely that some junctions occur as equilibrium between two coaxially stacked forms. However, in gel electrophoresis, a splitting of bands is rarely observed and this gives rise to the idea that the conformational transitions are fast compared to the slow equilibration in gel pores. Mg independent step represents in our model destacking of the bases in the junction. The stacking energy is known to be very sensitive to the sequence, thus a significant variability of the rate constant for destacking  $k_{ds}$  should be expected. Indeed this effect is found in the sequence dependence of branch migration (13).

### Materials and Methods

**DNA four-way junctions.** The HJs investigated in this work were obtained by annealing four different strands of DNA each 30 bases long. To limit the structural fluctuations to the interconversion equilibrium only, the sequences (Purimex, Grebenstein) were chosen so that branch migration was forbidden:  $\alpha$  (5'-CCT AAT TAC CAG TCC AGA TTA ATC AGT ACG),  $\beta$  (5'-CGT ACT GAT TAA TCT CCG CAA ATG TGA ACG),  $\gamma$  (5'-CGT TCA CAT TTG CGG TCT TCT ATC TCC ACG) and  $\delta$  (5'-CGT GGA GAT AGA AGA GGA CTG GTA ATT AGG). For immobilized smFRET TIRF measurements, a modified 5'-biotinylated  $\gamma$ -strand was used. To obtain the desired labeled strands, the donor (Alexa 488) and the acceptor (Atto 647N) were covalently bound to modified dTs through the commercially available C6-aminolinker at the positions: D( $a_{\alpha 7}$ ), A( $b_{\beta 10}$ ), A( $c_{\gamma 9}$ ) and A( $d_{\delta 9}$ ). In the nomenclature adopted in this work D() and A() refer to the donor and the acceptor, respectively, the letters  $a$  to  $d$  to the arm of the junction where the label is situated, the greek letters  $\alpha$  to  $\delta$  to the labeled strand and the number to the position of the modified base counted from the 5' end of the strand. As reported by Clegg and co-workers (33), particular care has to be taken during the hybridization step in order to obtain stable four-way junctions (see SI 1.1).

**Measurement conditions.** Single-molecule and ensemble measurements were performed at 20 °C in buffer (10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH=7.5) and the desired  $Mg^{2+}$  concentrations were obtained by adding aliquots of a 1 M stock solution of  $MgCl_2$ . Single-molecule TIRF measurements were performed at 20 °C in buffer (50 mM Tris, 20 mM NaCl, 4% glucose, 400  $\mu$ M Trolox, 250 U/ml glucose oxidase, 1500 U/ml catalase, pH 7.5 (34)). To test for the influence of  $Na^+$  on the stacking of HJs, some measurements were performed in TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM Boric Acid, 2 mM EDTA, pH=8.3).

**Single molecule experiments.** The experiments were carried out with a confocal epi-illuminated set-up (13) with spectral detection windows for donor (533/46 nm) and acceptor (720/150 nm). The fluorescently labeled HJs were excited by a linearly polarized, active-mode-locked Argon-ion laser (496 nm, 73 MHz, 150 ps). To extend the range of accessible relaxation times to ca. 10 ms, HJs were measured in an enlarged confocal volume ( $\approx 9.5$  fl) that allowed for a longer dwelling time of the molecules in the detection volume (diffusion time  $\approx 5$  ms). Experiments with immobilized HJs were performed on a home-built TIRF setup using a fiber-coupled cw Ar-ion laser operated at 488 nm. The total internal reflection conditions are created with the help of a TIRF objective (N.A = 1.45). In order to detect the fluorescence from donor (535/50 nm) and acceptor (680/60 nm) simultaneously, an image splitter was installed between the microscope and an emCCD camera.

**Acknowledgements.** The base sequences were suggested by David Millar (Scripps Research Institute, San Diego USA).

### References

1. Holliday R (1964) A new mechanism of gene conversion in fungi. *Genet Res* 5:282-304.
2. Potter H & Dressler D (1976) Mechanism of genetic-recombination - electron-microscopic observation of recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(9):3000-3004.
3. Broker TR & Lehman IR (1971) Branched DNA molecules - intermediates in T4 recombination. *J Mol Biol* 60(1):131-149.
4. Sigal N & Alberts B (1972) Genetic recombination - nature of a crossed strand-exchange between 2 homologous DNA molecules. *J Mol Biol* 71(3):789-793.
5. Orrweaver TL, Szostak JW, & Rothstein RJ (1981) Yeast transformation - a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(10):6354-6358.

## Anhänge

6. Schwacha A & Kleckner N (1995) Identification of double holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* 83(5):783-791.
7. Declais AC & Lilley DMJ (2008) New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 18(1):86-95
8. Duckett DR, et al. (1988) The structure of the Holliday junction and its resolution. *Cell* 55:79-89.
9. Murchie AIH, et al. (1989) Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules. *Nature* 341:763-766.
10. Eichman BF, Vargason JM, Mooers BM, & Ho PS (2000) The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: Sequence effects on the structure of four-way junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):3971-3976.
11. Ortiz-Lombardia M, et al. (1999) Crystal structure of a DNA holliday junction. *Nat Struct Biol* 6:913-917.
12. Müick SM, Fee RS, Millar DP, & Chazin WJ (1997) Crossover isomer bias is the primary sequence-dependent property of immobilized Holliday junctions. (Translated from English) *Proc Natl Acad Sci USA* 94(17):9080-9084 (in English).
13. Karymov MA, et al. (2008) Structure, Dynamics, and Branch Migration of a DNA Holliday Junction: A Single-Molecule Fluorescence and Modeling Study. *Biophys J* 95(9):4372-4383.
14. McKinney SA, Déclais AC, Lilley DMJ, & Ha T (2003) Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nat Struct Mol Biol* 10:93-97.
15. Joo C, McKinney SA, Lilley DMJ, & Ha T (2004) Exploring Rare Conformational Species and Ionic Effects in DNA Holliday Junctions Using Single-molecule Spectroscopy. *J Mol Biol* 341:739-751.
16. Panyutin IG & Hsieh P (1994) The kinetics of spontaneous DNA branch migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(6):2021-2025.
17. Ha T, Hohng S, & Joo C (2004) Single-Molecule Three-Color FRET. *Biophys J* 87:1328-1337.
18. Lilley DMJ (2000) Structures of helical junctions in nucleic acids. *Q Rev Biophys* 33(2):109-159.
19. Hohng S, et al. (2007) Fluorescence-force spectroscopy maps two-dimensional reaction landscape of the Holliday junction. *Science* 318(5848):279-283.
20. Sindbert S, et al. (2011) Accurate Distance Determination of Nucleic Acids via Forster Resonance Energy Transfer: Implications of Dye Linker Length and Rigidity. *J Am Chem Soc* 133(8):2463-2480.
21. Clegg RM, et al. (1992) Fluorescence resonance energy transfer analysis of the structure of the four-way DNA junction. *Biochemistry* 31:4846-4856.
22. Kalinin S, Valeri A, Antonik M, Felekyan S, & Seidel CAM (2010) Detection of structural dynamics by FRET: A photon distribution and fluorescence lifetime analysis of systems with multiple states. *J Phys Chem B* 114:7983-7995.
23. Antonik M, Felekyan S, Gaiduk A, & Seidel CAM (2006) Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. *J Phys Chem B* 110(13):6970-6978.
24. Kalinin S, Felekyan S, Antonik M, & Seidel CAM (2007) Probability distribution analysis of single-molecule fluorescence anisotropy and resonance energy transfer. *J Phys Chem B* 111(34):10253-10262.
25. Kalinin S, Felekyan S, Valeri A, & Seidel CAM (2008) Characterizing multiple molecular states in single-molecule multiparameter fluorescence detection by probability distribution analysis. *J Phys Chem B* 112(28):8361-8374.
26. Muschielok A, et al. (2008) A nano-positioning system for macromolecular structural analysis. *Nat Meth* 5(11):965-971.
27. Kobitski AY, Nierth A, Helm M, Jaschke A, & Nienhaus GU (2007) Mg<sup>2+</sup>-dependent folding of a Diels-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis. *Nucleic Acids Res* 35(6):2047-2059.
28. Gregor I & Enderlein J (2007) Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Photochem Photobiol Sci* 6(1):13-18.
29. Felekyan S, Kalinin S, Sanabria H, Valeri A, & Seidel CAM (2012) Filtered FCS: species auto- and cross-correlation functions highlight binding and dynamics in biomolecules. *ChemPhysChem* 13:1036-1053.
30. Felekyan S, Kalinin S, Valeri A, & Seidel CAM (2009) Filtered FCS and species cross correlation function. *Proc. SPIE Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences IX* eds Ammasi P & So TCP (Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering), pp 71830D71831-71814.
31. Nettels D, Gopich IV, Hoffmann A, & Schuler B (2007) Ultrafast dynamics of protein collapse from single-molecule photon statistics. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(8):2655-2660.
32. Overmars FJJ & Altona C (1997) NMR study of the exchange rate between two stacked conformers of a model Holliday junction. *J Mol Biol* 273:519-524.
33. Vamosi G & Clegg RA (2008) Helix-Coil Transition of a Four-Way DNA Junction Observed by Multiple Fluorescence Parameters. *J Phys Chem B* 112(41):13136-13148.
34. Ha T (2001) Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* 25:78-86.