

Enno Schweinberger

**Multidimensionale
Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie
von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Multidimensionale
Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie
von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Enno Schweinberger

aus Helmarshausen

Göttingen 2002

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2002
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2002
ISBN 3-89873-595-8

D7

Referent: Prof. Dr. J. Troe
Korreferent: Prof. Dr. L. F. Tietze

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2002

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2002
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-595-8

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Mai 2002 in der Abteilung Spektroskopie und photochemische Kinetik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen angefertigt.

Dem Direktor der Abteilung Spektroskopie und Kinetik des Max-Planck-Instituts für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. Jürgen Troe, danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen und ich bedanke mich für die Betreuung seitens der Universität Göttingen.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Dr. Claus Seidel, für die hervorragende Betreuung und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, ohne die diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Matthew Antonik, Sylvia Berger, Rüdiger Dede, Christian Eggeling, Suren Feleykan, Bernd Frederichs, Alexander Gaiduk, Tanya Gromyko, M. König, V. Kydryatsev, Elke Haustein, M. Khazarchyan, Ralf Kühnemuth, Pierre-Alain Muller, Ralf Müller, Philipp Oesterheld, Carl Sandhagen, Jörg Schaffer, Andreas Volkmer, Jerker Widengren und Nathan Zeitlin, auf deren Hilfsbereitschaft man sich jederzeit verlassen konnte.

Martin Fechner danke ich für seine stets kompetente Hilfe in Computer-Angelegenheiten.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in meiner Arbeit bekräftigt haben. Ohne ihre Unterstützung aller Art wäre es nicht zu dieser Arbeit gekommen.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Claudia für die ständige Geduld, Aufmunterung und Unterstützung insbesondere während der letzten Wochen.

Zusammenfassung

Kontext. In den letzten dreizehn Jahren haben sich die Methoden zum Nachweis von einzelnen Molekülen rasant weiterentwickelt. Treibende Kraft sind dabei die vielfältigen Vorteile der Einzelmoleküldetektion gegenüber herkömmlichen Ensemble-Techniken im Hinblick auf die ultimative Empfindlichkeit und die Untersuchung heterogener Systeme. Durch die Charakterisierung einzelner Moleküle können Verteilungen ihrer Eigenschaften einfach bestimmt und Reaktionen zeitlich direkt verfolgt werden. Hieraus eröffnen sich zahlreiche interessante Anwendungsmöglichkeiten für die Charakterisierung biologisch relevanter Systeme, wenn die Biomoleküle mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden können. Ein weiterer wichtiger Fortschritt auf dem Gebiet der Einzelmolekülspektroskopie mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion stellt die Bestimmung molekularer Abstände mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff dar. Diese besondere Technik steht jedoch gerade erst am Anfang ihrer Entwicklung. Insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung komplexerer Systeme gilt es, sowohl die Präzision der Messungen zu verbessern, als auch die Wechselwirkung zwischen Makromolekül und Fluorophoren in Betracht zu ziehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop zur Untersuchung einzelner frei in Lösung diffundierender Moleküle verwendet. Im Vergleich zu anderen Einzelmolekül-Meßverfahren besitzt die MFD-Technik dank des besonderen Detektions- und Analyseverfahrens einzigartige Vorteile, die sich auf die Multidimensionalität der Methode gründen. Dieser Begriff soll verdeutlichen, daß die gesamte Information der Fluoreszenz eines einzelnen Fluorophors vollständig erfaßt wird. Konkret können mit MFD die Fluoreszenzlebensdauer, -anisotropie und Intensität in zwei spektralen Bereichen zeitaufgelöst charakterisiert werden.

Ziele. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potential der MFD-Technik im Rahmen von Einzelmolekül-FRET-Messungen auf biologisch relevante Fragestellungen anzuwenden und dabei die Methode und Analysetechniken den Erfordernissen dieser Messungen anzupassen. Durch die simultane Verwendung mehrerer Fluoreszenzparameter sollte das Auflösungsvermögen bei der Bestimmung von molekularen Abständen erhöht werden. Gleichzeitig sollten Interaktionen zwischen den Fluorophoren und deren Umgebung erkannt werden, um

eine fundiertere Interpretation der Daten zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurden drei Systeme untersucht, wobei die Anforderungen an die Technik sowie die biologische Relevanz der untersuchten Fragestellung sukzessive stieg. Die erste Studie befaßte sich mit der Untersuchung einer linearen DNA-Doppelhelix; die zweite beschäftigte sich mit einer komplexeren DNA-Struktur, der Holliday-Junction, einem zentralen Zwischenprodukt bei dem molekulargenetischen Prozeß der homologen Rekombination. Im Rahmen der dritten Studie wurde schließlich ein Protein untersucht, dem eine Schlüsselrolle bei der Übertragung von Nervenimpulsen zukommt.

FRET-Analyse auf Einzelmolekülniveau. Generell werden die in einer Einzelmolekül-MFD-Messung erhaltenen Meßgrößen in einer Serie von zweidimensionalen Häufigkeits-histogrammen der Parameterpaare analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei 2D-Diagramme entwickelt, die für die Analyse von Einzelmolekül-FRET-Messungen von besonderer Bedeutung sind:

1. Aus dem Histogramm des Parameterpaars Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie im jeweiligen spektralen Bereich kann die Beweglichkeit des Donor- bzw. Akzeptor-fluorophors abgeschätzt werden. Auf diese Weise konnte zum ersten Mal im Rahmen einer Einzelmolekül-FRET-Studie der Einfluß von Orientierungseffekten auf die berechneten Abstände experimentell überprüft werden. Dabei wurde in keiner der drei Studien ein Anhaltspunkt für eine so eingeschränkte Beweglichkeit der Fluorophore gefunden, daß die Verwendung des Wertes von $2/3$ für den Orientierungsfaktor zu größeren Fehlern in der Abstandsberechnung führen könnte.
2. Mit der MFD-Technik werden bei Einzelmolekül-FRET-Experimenten zwei von einander unabhängige Parameter bestimmt, die ein direktes Maß für die Effizienz des Energie-transfers und somit für den Abstand darstellen: (i) die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors, τ_{DA} , und (ii) das Intensitätsverhältnis von Donor- zu Akzeptorfluoreszenz, F_D/F_A , wobei aus Gründen der Anschaulichkeit zum Teil das Intensitätsverhältnis direkt als Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor ausgedrückt wurde. Da die lokal beeinflussbaren Fluoreszenzeigenschaften von Donor- und Akzeptorfarbstoff im Effekt zwei Systemfreiheitsgrade darstellen, gelingt es nur mit einer zweidimensionalen Analyse in einem $\tau_{DA} - F_D/F_A$ Diagramm, den korrelierten FRET-Effekt

von den lokalen photophysikalischen Effekten zu trennen. Durch die Eliminierung der inhomogenen Verbreiterungen wird eine sehr viel genauere Bestimmung von Abständen erreicht, als wenn jeder der beiden Parameter für sich analysiert wird.

Methodenentwicklung zur Analyse von intramolekularen Gleichgewichtsreaktionen. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung intramolekularer Gleichgewichtsreaktionen. Derartige Untersuchungen sind in FRET-Ensemblemessungen schwer zugänglich, da eine Synchronisation aller in der Probe vorhandenen Probemoleküle erforderlich wäre. Im Rahmen der Arbeit wurden zwei vollkommen unterschiedliche Methoden zur Analyse der Kinetik in Einzelmolekül-FRET-Messungen mit individuellen Vor- und Nachteilen entwickelt: (i) In der Zeitfensteranalyse werden die Einzelmolekülereignisse in kleine Zeitintervalle zerlegt und die Fluoreszenzsignale direkt analysiert, und (ii) die Daten vieler ausgewählter Einzelmolekülereignisse werden gemeinsam einer Korrelationsanalyse unterzogen, um die Relaxationszeit quantitativ zu bestimmen

DNA-Strukturstudie. Es wurde eine Serie von 13 verschiedenen linearen DNA-Duplex-Moleküle mit FRET untersucht, bei denen der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor (Alexa 488 und Cyanin 5) durch die Anzahl der dazwischenliegenden Basenpaare variiert wurde. Das Ziel bestand darin, unter Nutzung der definierten und rigiden DNA-Struktur das Auflösungsvermögen der MFD-Technik bei Einzelmolekül-FRET-Experimenten zu bestimmen.

Mit der mehrdimensionalen FRET-Analyse wurde eine bisher mit keiner anderen Einzelmolekül-FRET-Technik erreichte räumliche Auflösung von kleiner 7 Å erhalten. Dabei konnten auch verschiedene Subpopulationen des Donorfluorophors detektiert werden. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Genauigkeit der aus den Einzelmolekül-experimenten bestimmten FRET-Effizienzen ausreichte, um die helikale Struktur der DNA nachzuweisen. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung einer Mischung von vier DNA-Konstrukten mit unterschiedlichen Abständen zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor erreicht werden. Aus dem Vergleich der Ergebnisse mit einem einfachen geometrischen Modell der DNA konnten die Positionen des Donor- und Akzeptorfluorophors relativ zur DNA bestimmt werden. Diese Kenntnis der genauen Donor- und

Akzeptorpositionen wird eine präzisere Interpretation von Abständen bei komplizierteren DNA-Strukturen erlauben.

Holliday-Junction. Die Holliday-Junction besteht aus einer Kreuzung von vier DNA-Helices. Diese besondere biologisch relevante DNA-Struktur liegt in der Regel in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen zwei Strukturisomeren in verschiedenen X-förmigen Konformationen (A/D und A/B) vor, bei denen jeweils zwei der vier Helices übereinander gestapelt sind.

Für die FRET-Untersuchungen wurde eine artifizielle Holliday-Junction verwendet und eine Helix mit dem Donorfluorophor (Alexa 488) und eine andere mit dem Akzeptorfluorophor (Cyanin 5) markiert. Im Rahmen der Messungen konnte gezeigt werden, daß die untersuchte Junction zu 63 % in der A/B-Konformation und zu 37 % als A/D-Konformer vorliegt. Aus in Einzelmolekül-FRET-Messungen bestimmten Abständen konnte ein interhelikaler Winkel von $67^\circ \pm 7^\circ$ bestimmt werden, der im Einklang mit entsprechenden Literaturwerten steht.

Besonderes Augenmerk galt bei dieser Studie der Dynamik des konformationellen Gleichgewichts, dessen Geschwindigkeitskonstanten stark von der Konzentration divalenter Ionen, insbesondere Mg^{2+} beeinflusst werden. Unterhalb einer Mg^{2+} -Konzentration von 2 mM wurde eine Verbreiterung der Abstandsverteilungen beobachtet, so daß beide Konformere nicht mehr getrennt voneinander nachgewiesen werden konnten. Eine Zeitfensteranalyse konnte zeigen, daß die Verbreiterung der Abstandsverteilung bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM auf einer konformationellen Dynamik im Submillisekunden-Zeitbereich beruht. Mit der selektiven Korrelationsanalyse wurde eine Relaxationszeit von 0.3 ms für das Gleichgewicht zwischen den Konformeren bestimmt.

Strukturelle Dynamik von Syntaxin-1. Syntaxin-1 ist ein Protein, das zusammen mit seinen Partnern aus der Familie der SNARE-Proteine, SNAP-25 und Synaptobrevin essentiell für die Membranfusion der mit Neurotransmitter beladenen Vesikel mit der Plasmamembran in den Nervenendigungen ist. Die Bildung des ternären SNARE-Komplexes gewährleistet u.a. die Reizübertragung von Nervenzelle zu Nervenzelle. Auf molekularer Ebene wird hierbei ein

Konformationswechsel des Syntaxin als ein entscheidender Schritt für die Komplexbildung diskutiert. Daher wurde zunächst die Struktur des ungebunden Syntaxins untersucht, über die vorher nur wenig bekannt war. Für die entsprechenden Einzelmolekül-FRET-Messungen wurde eine Serie von 16 Syntaxin-1-Mutanten mit zwei Cysteinen generiert, die anschließend mit dem Donor- und Akzeptorfluorophor (Alexa 488 und Alexa 594) markiert wurden. Hierbei stellte die extreme Heterogenität der Proben aufgrund der besonderen Markierungsprozedur eine große Herausforderung dar.

Im Gegensatz zur bestehenden Vorstellung konnte gezeigt werden, daß Syntaxin in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einer inaktiven geschlossenen und einer aktiven offenen Konformation vorliegt. Dabei wird die geschlossene Form zu 15 - 30% bevölkert. Diese Erkenntnis gibt wichtige Einblicke in die Kontrollmechanismen zur Steuerung der Reaktivität des Syntaxins. So kann beispielsweise die regulative Funktion von Proteinen verstanden werden, die Syntaxin in der geschlossenen Form arretieren, deren Funktion zuvor völlig unklar war. Bei der Untersuchung der Dynamik des intramolekularen Gleichgewichts wurde eine Relaxationszeit von 0.8 ms für den Wechsel zwischen offener und geschlossener Konformation bestimmt. Schließlich wurden die ermittelten Abstände im Rahmen einer Molecular-Modelling-Studie dazu verwendet, einen Strukturvorschlag für den geschlossenen und den offenen Zustand des Syntaxins zu erarbeiten.

Fazit. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es durch den Einsatz der MFD-Technik gelungen ist, die Präzision von Einzelmolekül-FRET-Messungen entscheidend zu verbessern. Es konnte gezeigt werden, daß diese Messungen sehr gut zur Untersuchung von intramolekularen Gleichgewichten zwischen verschiedenen Konformationen geeignet sind. Daher hat MFD das Potential, eine wertvolle Methode bei der Aufklärung von Struktur und Funktion von biologischen Makromolekülen unter physiologischen Bedingungen zu werden. Der nächste konsequente Schritt besteht in der Verwendung dieser Technik, um molekulare Vorgänge in lebenden Zellen zu untersuchen.

1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	
2.1 FLUORESZENZ, FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE UND FLUORESZENZLEBENSDAUER.....	5
2.1.1 <i>Fluoreszenzlebensdauer</i>	6
2.1.2 <i>Fluoreszenzanisotropie</i>	8
2.2 FLUORESZENZLÖSCHUNG	10
2.3 FLUORESZENZ RESONANZ ENERGIE TRANSFER (FRET).....	11
2.4 FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS)	16
3 EXPERIMENTELLER TEIL	
3.1 MATERIAL	20
3.2 BESTIMMUNG VON FLUORESZENZLEBENSDAUER, ANISOTROPIE UND FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE.....	24
3.2.1 <i>Fluoreszenzlebensdauer</i>	26
3.2.2 <i>Zeitaufgelöste und stationäre Anisotropie</i>	27
3.2.3 <i>Anpassung der Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie bei Einzelmolekülmessungen</i>	29
3.2.4 <i>Bestimmung der Akzeptorlebensdauer</i>	30
3.2.5 <i>Standardabweichungen für τ, ρ und r im Einzelmolekülexperiment</i>	30
3.2.6 <i>Fluoreszenzquantenausbeute</i>	31
3.3 MULTI-PARAMETER-FLUORESZENZ-DETEKTION (MFD).....	32
3.3.1 <i>Konfokales Mikroskop</i>	32
3.3.2 <i>Durchführung der Messungen</i>	34
3.3.3 <i>Datenaufbereitung und Analyse</i>	35
3.3.4 <i>Darstellung der Daten</i>	38
3.3.5 <i>Speziesslektive Auswertungen</i>	40
3.4 FRET-BERECHNUNG BEI EINZELMOLEKÜLEXPERIMENTEN	41
3.4.1 <i>Bestimmung des Intensitätsverhältnisses F_D/F_A</i>	41
3.4.2 <i>Die simultane Verwendung von F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ zur Bestimmung von E_T</i>	44
3.4.3 <i>Ein neuer Weg zur direkten Berechnung von R_{DA}</i>	47
3.4.4 <i>Die Bestimmung der Fluorophorbeweglichkeit</i>	49

3.4.5 Die Bedeutung des Shot-noise für die Einzelmolekülspektroskopie.....	51
3.5 ANALYSE VON DYNAMISCHEN GLEICHGEWICHTSREAKTIONEN AUF EINZELMOLEKÜLEBENE	
3.5.1 Zeitauflösung im Einzelmolekülexperiment	52
3.5.2 Zeitfensteranalyse (Intra-Burst-Analyse)	54
3.5.3 Die Korrelationsanalyse	56
3.6 DIE KORREKTUR DER FLUORESCENZLEBENSDAUERN	59
3.6.1 Erstes Modell: irreversible dynamische Löschung	60
3.6.2 Zweites Modell: Reversible Löschung: Exciplex-Gleichgewicht	62
3.7 DIE UNTERSUCHTEN BIOMOLEKÜLE.....	68
3.7.1 DNA-Synthese und Sequenzen für die DNA-Strukturuntersuchung.....	68
3.7.2 Die Holliday-Junctions: Synthese der Sequenzen, Hybridisierung und Meßbedingungen.....	70
3.7.3 SNARE.....	72
4 DNA-STRUKTURANALYSE	
4.1 ZIELSETZUNG DER STUDIE.....	75
4.2 DAS KONZEPT	75
4.3 DIE ERGEBNISSE.....	78
4.3.1 Die Eigenschaften des Donorfluorophors Alexa 488.....	78
4.3.2 Die Eigenschaften des Akzeptorfluorophors Cy5.....	82
4.3.3.....	85
4.3.4 Die Heterogenität der Proben.....	85
4.3.5 Bestimmung des Försterradius R_0	87
4.3.6 Die Bestimmung der FRET-Effizienz	89
4.3.7 Bestimmung der Fluorophorposition	93
4.4 MACHBARKEITSSTUDIE: ANALYSE EINER HETEROGENEN FRET-PROBE	97
4.5 FAZIT DER EINZELMOLEKÜL FRET EXPERIMENTE MIT DNA DOPPELSTRÄNGEN.....	99
5 UNTERSUCHUNG DER KONFORMERVERTEILUNG BEI EINER HOLLIDAY- JUNCTION	
5.1 ALLGEMEINES ZUR HOLLIDAY-JUNCTION.....	100
5.2 ZIELSETZUNG DIESER STUDIE	103
5.3 DIE VERWENDETE HOLLIDAY-JUNCTION	104
5.4 EIGENSCHAFTEN DER FLUOROPHORE	106

5.5 ABSTÄNDE IN DER HOLLIDAY-JUNCTION UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN	107
5.5.1 Die relativen Anteile der A/D- und A/B-Konformere	108
5.5.2 Bestimmung des interhelikalen Winkels	109
5.6 MESSUNG DER HOLLIDAY JUNCTION BEI VERSCHIEDENEN Mg^{2+} -KONZENTRATIONEN..	112
5.7 KINETISCHE BETRACHTUNG DES KONFORMEREN-GLEICHGEWICHTS BEI DER HOLLIDAY- JUNCTION	116
5.7.1 Die Zeitfensteranalyse	116
5.7.2 Die Korrelationsanalyse	118
5.7.3 Die Bestimmung der Relaxationszeit der FRET-Dynamik	119
5.7.4 Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} für die Umfaltung der Holliday-Junction	121
5.8 FAZIT DER UNTERSUCHUNGEN AN DER HOLLIDAY JUNCTION.....	122
6 STRUKTUR- UND DYNAMIK EINES SNARE-PROTEINS	
6.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN.....	122
6.2 ZIEL DER STUDIE	125
6.3 DIE VERSCHIEDENEN MUTANTEN DES SYNTAXINS	126
6.4 DIE EIGENSCHAFTEN DES DONORFLUOROPHORS	128
6.4.1 Fluoreszenzlebensdauer	128
6.4.2 Fluorophorbeweglichkeit	129
6.5 DIE BESTIMMUNG DER ABSTÄNDE IM SYNTAXIN	131
6.5.1 Das freie Syntaxin	132
6.5.2 Syntaxin im Komplex.....	134
6.6 ANALYSE DER KINETIK ZWISCHEN ZWEI KONFORMEREN DES SYNTAXINS.....	137
6.6.1 Schrittweise Zeitfensteranalyse	137
6.6.2 Gleitende Zeitfensteranalyse	139
6.6.3 Die Fluoreszenz-Korrelations-Analyse	140
6.7 DAS STRUKTURMODELL	143
6.8 FAZIT.....	146
7 Literatur.....	147
Anhang.....	153

1 Einleitung

Die meisten Modellvorstellungen in den Naturwissenschaften beschreiben die Wechselwirkungen zwischen Molekülen auf atomarer Ebene. Das Wissen über die chemische Struktur und Dynamik von Molekülen stammt hingegen primär aus Untersuchungen von Molekülensembles. Bei einer Ensemblemessung eines heterogenen Systems geht jedoch die Information über Zustände einzelner Moleküle durch die Mittelung verloren. Daher ist es sinnvoll Techniken zu entwickeln, mit denen die Beobachtung einzelner Moleküle möglich ist, um auf diese Weise direkte Informationen über Heterogenitäten und Verteilungen zu erhalten. Solche Verfahren sind besonders bei der Untersuchung sehr komplexer Vorgänge, wie sie häufig in biologischen Systemen auftreten, von großem Vorteil.

Nach den Pionierarbeiten zur Detektion von einzelnen Molekülen mit Hilfe optischer Methoden (Hirschfeld, 1976; Moerner, 1989; Orrit, 1990) haben sich die Einzelmolekül-techniken in den letzten Jahren, durch die Verbesserung der optischen Spektroskopie und Mikroskopie sowie die Entwicklung empfindlicherer Detektionssysteme, rasant weiterentwickelt. Die Mehrzahl dieser Techniken beruht dabei auf der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion, die eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität gewährleistet (Goodwin, 1996; Moerner, 1999; Weiss, 1999) auch unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden kann. Dabei können mit den verbesserten Methoden, je nach experimentellem Aufbau, verschiedenste Eigenschaften der Fluoreszenz, wie z.B. Intensität, Fluoreszenzlebensdauer (Enderlein, 2001) und Fluoreszenzanisotropie (Ha, 1999a; Schaffer, 1999), bestimmt werden, so daß die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie mittlerweile weit über den bloßen Nachweis einzelner Moleküle hinausgeht. Daneben wurde eine der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie verwandte Technik, die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), entwickelt, die Intensitätsschwankungen von wenigen Moleküle herrührend analysiert, und so Aussagen über dynamische Prozesse zuläßt.

Voraussetzung für die Detektion von Fluoreszenz ist zunächst die Gegenwart eines geeigneten Fluorophors. Da die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie besonders hohe Ansprüche bezüglich der Fluoreszenzquantenausbeute und Photostabilität hat, werden in der Regel Rhodamin- oder Cyaninfarbstoffe als Fluoreszenzsonden (extrinsische Fluorophore) kovalent an den entsprechenden Analyten, z.B. ein Biomolekül, gebunden.

In einigen Einzelmolekül-Fluoreszenzuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Moleküle sehr stark von deren unmittelbaren Umgebung abhängen (Gaiko, 2002; Moerner, 1994; Xie, 1998). Ist ein Fluorophor an ein Biomolekül gebunden, können Veränderungen der Mikroumgebung durch Dynamiken des Biomoleküls ausgelöst werden. In einem solchen Fall können sowohl die einzelnen Zustände als auch die Dynamik in einem Einzelmolekülexperiment direkt anhand der gemessenen Fluoreszenzparameter verfolgt werden (Ha, 1996b), während die Information bei einer herkömmlichen Ensemblemessung infolge der Mittelung verborgen bleibt.

Eine besonders interessante Variante der Fluoreszenzspektroskopie ist die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) mit Hilfe von zwei Fluoreszenzsonden: Einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor. Bei FRET handelt es sich um einen photophysikalischen Effekt, dessen theoretische Beschreibung auf T. Förster (Förster, 1948) zurückgeht. Dabei wird die Energie des angeregten Donorfluorophors strahlungslos über eine Dipol- Dipol-Wechselwirkung auf den Akzeptor übertragen. Phänomenologisch äußert sich FRET durch die Löschung der Donorfluoreszenz und einer Sensibilisierung (Zunahme) der Akzeptorfluoreszenz. Da die Effizienz des Energietransfers (FRET-Effizienz) in einem Bereich von 10 bis 100 Å stark vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor abhängt, kann dieser Effekt als „Lineal“ auf molekularem Niveau eingesetzt werden (Clegg, 1992; Förster, 1948; Lakowicz, 1999; van der Meer, 1994). Dabei eignet sich der Abstandsbereich, für den FRET sensitiv ist, ideal zur Untersuchung biologischer Systeme, während er anderen Techniken wie NMR oder EPR meist verschlossen bleibt.

Auf Ensemblesniveau ist die Messung von Abständen mit FRET bereits eine etablierte Technik und wurde zur Charakterisierung einer Vielzahl von biologischen Strukturen eingesetzt (Förster, 1948; Selvin, 1995; Stryer, 1967). Die Kombination der Stärken von Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie und FRET-Messungen eröffnet völlig neue Perspektiven: Im Gegensatz zu FRET-Ensemblemessungen können intra- sowie intermolekulare Wechselwirkungen von Systemen mit heterogener Abstandsverteilung untersucht werden und dabei der Anteil einzelner Konformationen bestimmt werden. Daneben können dynamische Konformationsänderungen von Biomolekülen direkt beobachtet werden, so daß die entsprechenden kinetischen Parameter aus diesen Messungen bestimmt werden können. Daher eignen sich Einzelmolekül-FRET-Messungen beispielsweise ideal zur Untersuchung von

Entfaltung/Faltung von Makromolekülen sowie zur Analyse von Konformationsänderungen von Enzymen während der Katalyse.

Im Rahmen einer Studie an einem DNA-FRET-Konstrukt, das auf einer trockenen Glasoberfläche fixiert war, konnten Ha et al. (Ha, 1996a; Ha, 1996b) erstmals FRET-Effizienzen auf dem Niveau einzelner Moleküle erfolgreich bestimmen. Inzwischen wurde die Technik der Einzelmolekül-FRET-Messung soweit verfeinert, daß Biomoleküle unter physiologischen Bedingungen untersucht werden können (Ha, 1999b; Rothwell, 2001).

Trotz dieser ersten Erfolge ist die Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie noch eine sehr junge Technik mit großem Entwicklungspotential, bei der längst noch nicht alle Probleme gelöst sind. So sind die bisherigen Einzelmolekül-FRET-Messungen auf die Detektion der Fluoreszenzintensität der Donor- und Akzeptorfluoreszenz beschränkt. Diese Parameter reichen jedoch für eine zuverlässige Bestimmung der FRET-Effizienz, bzw. des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor, nicht aus. Photophysikalische Effekte wie Fluktuationen in den Quantenausbeuten der eingesetzten Fluorophore sowie Orientierungseffekte, die den Energietransfer beeinflussen und leicht zu Fehlinterpretationen führen, können allein anhand von Intensitätsmessungen nicht erkannt werden. Darüber hinaus ist das Auflösungsvermögen der bisher für Einzelmolekül-FRET-Studien eingesetzten Methoden nicht sehr hoch, so daß nur Untersuchungen, bei denen große Differenzen in den FRET-Effizienzen auftreten, analysiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß die simultane Erfassung mehrerer charakteristischer Fluoreszenzparameter für die Donor- und Akzeptorfluoreszenz in einem Einzelmolekül-FRET-Experiment eine sicherere Interpretation der Meßdaten bei einer verbesserten Auflösung zuläßt. Für die Datenerfassung wurde dabei die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) eingesetzt, die eine Weiterentwicklung der BIFL-Technik (Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime) darstellt. Mit Hilfe dieser Technik können für einzelne, frei in Lösung diffundierende, fluoreszenzmarkierte Moleküle in zwei unterschiedlichen spektralen Bereichen simultan Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie, Intensität sowie die individuelle Dauer des Ereignisses registriert werden.

Um das Potential dieser Technik für die Bestimmung von FRET-Effizienzen auf Einzelmolekülebene aufzuzeigen, werden drei Studien vorgestellt. Die Erste, eine DNA-Strukturstudie, dient zur Evaluation der Technik. Die zweite Studie beschäftigt sich mit dem

Konformerengleichgewicht einer Holliday-Junction, dabei wird die Anwendung neu entwickelter Verfahren vorgestellt, die die Aufdeckung und Analyse von Kinetiken ermöglichen. Im Rahmen der dritten Studie wird ein Protein untersucht, das eine Schlüsselrolle bei der Fusion von Membranen spielt. Dabei kann gezeigt werden, daß die Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie mit MFD in der Lage ist, völlig neue Erkenntnisse über molekulare Vorgänge zu liefern, und gleichzeitig so präzise Abstandsmessungen erlaubt, daß, aufbauend auf den Ergebnissen der Studie, ein Strukturmodell berechnet werden kann.

2 Theoretischer Teil

2.1 Fluoreszenz, Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer

Wird ein Molekül durch Absorption eines Lichtquants in einen angeregten elektronischen (Singulett-) Zustand S_1 überführt, wird es versuchen, die überschüssige Energie wieder abzugeben und in den (Singulett-) Grundzustand S_0 zurückzukehren. Innerhalb des angeregten Zustandes wird binnen Pikosekunden ein Teil der Energie durch Stöße mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen abgegeben und das Molekül relaxiert in das unterste Schwingungsniveau des angeregten Zustandes. Die Rückkehr in ein Schwingungsniveau des Grundzustandes kann dann innerhalb von Nanosekunden unter Emission elektromagnetischer Strahlung erfolgen. Dieser spezielle Prozeß wird als Fluoreszenz bezeichnet und das entsprechende Molekül als Fluorophor. Die Frequenz der abgegebenen Strahlung ist dabei im Vergleich zur absorbierten Strahlung rotverschoben, da nicht die gesamte aufgenommene Energie als Fluoreszenzlicht emittiert wird. Die Fluoreszenz (F) steht in Konkurrenz zu verschiedenen strahlungslosen Relaxationsprozessen: Innere Umwandlung der Energie („internal conversion“, IC), Übertragung der Energie auf ein Löschmolekül („Quencher“, Q) oder Übergang in den Triplettzustand T_1 („inter system crossing“, ISC). Alle Deaktivierungsmechanismen können in einem Energietermschema, dem sog. Jablonski-Diagramm (Abb. 2.1), dargestellt werden:

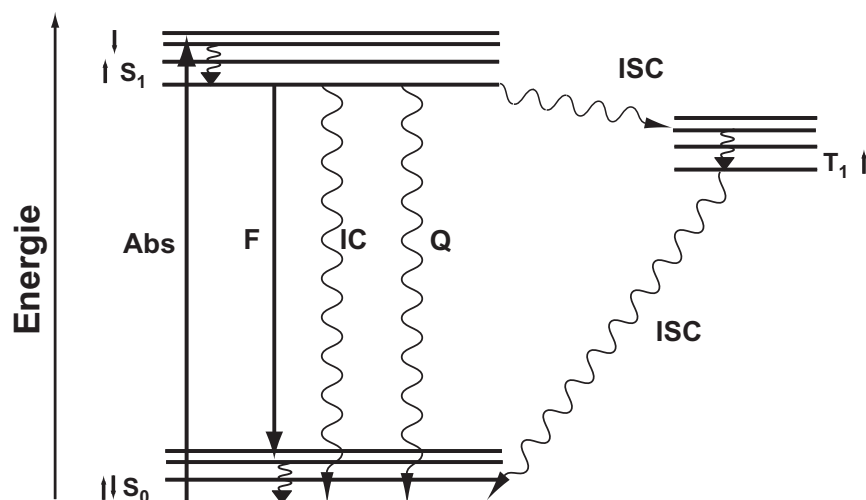


Abb. 2.1 Jablonski-Diagramm. Mögliche Relaxationsprozesse aus dem angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 eines durch Lichtabsorption (Abs) angeregten Fluorophors in einem Energieniveauschema: Fluoreszenz (F) innere Umwandlung (IC) Löschung durch ein Löschmolekül (Q) und Übergang in den Triplettzustand T_1 (ISC). Höher angeregte Zustände sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Der Anteil der Fluoreszenz am Gesamtzerfallsprozeß aus dem angeregten Zustand S_1 ist durch die Fluoreszenzquantenausbeute, Φ_F , gegeben. Sie läßt sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, k_F , zur Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller Zerfallsprozesse ($k_F + \sum k_i$ mit $\sum k_i = k_{IC} + k_{ISC} + [Q]k_Q$) berechnen.

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} \leq 1 \quad \text{Gl. 2.1}$$

Einige Methoden zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten werden in Kap. 3.26 vorgestellt.

2.1.1 Fluoreszenzlebensdauer

Ein weiterer wichtiger Parameter, der zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren dient, ist die mittlere Lebensdauer des S_1 -Zustandes, die üblicherweise als Fluoreszenzlebensdauer, τ , bezeichnet wird:

$$\tau = \frac{1}{k_F + \sum_i k_i} \quad \text{Gl. 2.2}$$

Die in Gl 2.2 gegebene Fluoreszenzlebensdauer sollte nicht mit der sogenannten strahlenden Fluoreszenzlebensdauer, $\tau_F = 1/k_F$ verwechselt werden. Sowohl Φ_F als auch τ können detaillierte Informationen über die Mikroumgebung des Fluorophors liefern, da die Geschwindigkeitskonstanten aller zur Fluoreszenz konkurrierender Deaktivierungsmechanismen, wesentlich vom umgebenden Medium beeinflusst werden. Nach Gl. 2.1 und Gl 2.2 besteht zwischen τ und Φ_F folgender Zusammenhang:

$$\Phi_F = k_F \tau \quad \text{Gl. 2.3}$$

Zur Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauer werden im wesentlichen zwei Techniken eingesetzt: Die Puls- bzw. Zeitdomänentechnik und die Phasenmodulations- bzw. Frequenzdomänen-Technik. An dieser Stelle soll nur auf erstere eingegangen werden, das Prinzip der Phasenmodulations-Technik kann beispielsweise bei J.R. Lakowicz nachgelesen werden (Lakowicz, 1991). Die Zeitdomänen-Technik wird in der Regel mit Hilfe der „Time Correlated Single Photon Counting“ (TCSPC) Meßmethode durchgeführt. Dabei werden die Fluorophore mit einem kurzen Anregungspuls zum Zeitpunkt $t = 0$ angeregt werden und das

Abklingen der Fluoreszenzintensität, F , beobachtet. Abb. 2.2 zeigt eine typische Abklingkurve:

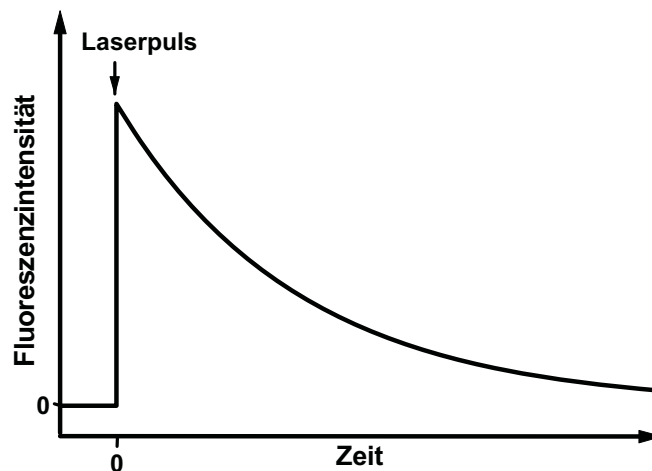


Abb. 2.2. Schematische Darstellung der Abnahme der Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit nach Anregung der Probe durch einen Laserpuls zum Zeitpunkt $t = 0$.

Im Fall eines Ensembles aus identischen Molekülen wird das Abklingverhalten durch einen monoexponentiellen Zerfall beschrieben:

$$\frac{dF(t)}{dt} = - (1/\tau) F(t) \Rightarrow F(t) = F(t=0) \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Gl. 2.4}$$

Hier entspricht $F(t=0)$ der Fluoreszenzintensität direkt nach dem anregenden Laserpuls. Die Fluoreszenzlebensdauer entspricht der Zeit, nach dem die Fluoreszenzintensität auf $1/e$ des Anfangswertes abgeklungen ist. Sie lässt sich bei halblogarithmischer Auftragung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit aus der Steigung berechnen.

Multiexponentielle Zerfälle. Besitzt ein Fluorophor Zustände mit unterschiedlicher Fluoreszenzlebensdauer, verursacht durch eine wechselnde Mikroumgebung, oder befinden sich mehrere Fluorophore mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern in der Probe ist das Abklingverhalten nicht mehr monoexponentiell. Ein solcher Zerfall kann als Summe der individuellen monoexponentiellen Zerfälle beschrieben werden:

$$F(t) = \sum_i F_i(t=0) \cdot e^{-t/\tau_i} \quad \text{Gl. 2.5}$$

In diesem Ausdruck sind τ_i die Fluoreszenzlebensdauern und $F_i(t=0)$ die entsprechende Intensität der Komponenten zum Zeitpunkt $t = 0$.

2.1.2 Fluoreszenzanisotropie

Fluoreszenzpolarisations Messungen werden in der Biochemie seit langer Zeit dazu verwendet, Informationen über die Beweglichkeit, Größe und Form von Makromolekülen zu gewinnen. Dabei macht man sich das Phänomen zunutze, daß bei Anregung eines Ensembles von Fluorophoren durch linear polarisiertes Licht, die emittierte Fluoreszenz im Vergleich zum Anregungslicht zu einem gewissen Grad depolarisiert ist. Als quantitatives Maß für diese Depolarisation wird im allgemeinen die (stationäre) Anisotropie, r , verwendet, die folgendermaßen definiert ist:

$$r = \frac{F_p - F_s}{F_p + 2F_s} \quad \text{Gl. 2.6}$$

Hier sind F_p und F_s die Intensitätsanteile der Fluoreszenz mit paralleler und senkrechter Polarisation bezogen auf die Polarisationsrichtung des Anregungslichts. Verschiedene Effekte führen zur Depolarisation der Fluoreszenzstrahlung und damit zu einer Verringerung der Anisotropie. Zunächst absorbieren nicht nur die Fluorophore, deren Ausrichtung des Absorptionsdipolmoments exakt der Polarisation des Anregungslichts entspricht. Es reicht aus, wenn das Absorptionsdipolmoment eine Komponente in Polarisationsrichtung des Anregungslichts besitzt (Photoselektion). Zeigen die Übergangsdipolmomente der Absorption und der Fluoreszenz in unterschiedliche Richtungen, führt dies zu einer weiteren Verringerung der Anisotropie. Für völlig unbewegliche Fluorophore geben die beiden genannten Effekte die Anisotropie vor, die üblicherweise als r_0 bezeichnet wird und Werte zwischen -0.2 und 0.4 annehmen kann.

Verschiedene Effekte führen nun dazu, daß die gemessenen Anisotropiewerte geringer sind als der theoretische Maximalwert, r_0 . Im Hinblick auf Anisotropiemessungen an biologisch relevanten Systemen ist die Bewegung der Fluorophore während deren Fluoreszenzlebensdauer, der wichtigste Effekt, der zu einer Verringerung der Anisotropie führt.

Freie Fluorophore rotieren üblicherweise viele Male während ihrer Fluoreszenzlebensdauer und zeigen daher eine Anisotropie nahe Null. Ist ein solcher Fluorophor jedoch an ein Protein gebunden, das sehr viel langsamer rotiert, wird die Anisotropie von Null verschieden sein und mit der Größe des Proteins zunehmen. Anisotropiemessungen sind also sehr sensitiv für jeden Effekt, der die Beweglichkeit der Fluorophore beeinflusst, und die Anisotropie liefert nützliche

Informationen über die Bewegungsfreiheit von Fluorophoren in Fluorophor/Biomolekül Konstrukten.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die Verringerung der Anisotropie durch die Bewegung des Fluorophors wesentlich durch dessen Fluoreszenzlebensdauer beeinflusst wird. Ein durch eine kurze Fluoreszenzlebensdauer gekennzeichnete Fluorophor hat wenig Zeit sich zu bewegen, während er im angeregten Zustand ist. Ein Fluorophor mit der gleichen Mobilität aber längerer Fluoreszenzlebensdauer zeigt deshalb eine niedrigere Anisotropie. Im Gegensatz zur Anisotropie stellt die Rotationskorrelationszeit, ρ , ein quantitatives Maß für die Mobilität der Fluorophore dar und ist unabhängig von der Fluoreszenzlebensdauer. Der Zusammenhang zwischen ρ und r geht aus der Perrin-Gleichung hervor:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \quad \text{Gl. 2.7}$$

Die Anisotropie kann prinzipiell sowohl aus „steady-state“ als auch aus zeitaufgelösten Messungen ermittelt werden. Aus zeitaufgelösten Messungen ist ρ auf direktem Wege bestimmbar. Dazu wird, analog zu den Fluoreszenzlebensdauer-messungen, das Abklingen der Fluoreszenzintensität nach einem kurzen Anregungspuls gemessen und zwar parallel und senkrecht zur Polarisation des Anregungslichts. Aus den beiden Intensitätsabklingkurven läßt sich zu jedem Zeitpunkt die entsprechende Anisotropie errechnen. Entsprechend der zeitabhängigen Form der Perrin-Gleichung können, bei halblogarithmischer Auftragung der (zeitabhängigen) Anisotropie, $r(t)$ gegen die Zeit, die Rotationskorrelationszeit sowie r_0 bestimmt werden:

$$r(t) = r_0 \cdot e^{-t/\rho} \quad \text{Gl. 2.8}$$

Bei einem Fluorophor der kovalent an ein Makromolekül gebunden ist, setzt sich die Gesamtbewegung im allgemeinen aus mehreren Komponenten zusammen, in diesem Fall ist $r(t)$ multiexponentiell:

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \cdot e^{-t/\rho_j} \quad \text{Gl. 2.9}$$

Dabei gilt, daß die Summe der r_{0i} wieder r_0 ergibt. Im Rahmen dieser Arbeit wird für die Bestimmung von r aus zeitaufgelösten Messungen ein modifiziertes Verfahren angewendet, welches im Detail in Kap. 3.2.2 beschrieben wird.

Insbesondere bei Experimenten bei denen Energie zwischen Fluorophoren übertragen wird, ist bei der Interpretation der Anisotropie zu beachten, daß der Prozeß des Energietransfers ebenfalls zu einer Depolarisation der Fluoreszenzstrahlung führen kann.

2.2 Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzquantenausbeute bzw. Fluoreszenzlebensdauer kann durch in der Lösung diffundierende Fremdmoleküle stark herabgesetzt werden. Solche Prozesse werden als Fluoreszenzlöschung oder häufig auch als Quenching bezeichnet und sind auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen. Bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung (Kollisionslöschung) stößt der Fluorophor, während er sich im angeregten Zustand befindet, mit einem Löschmolekül, Q, (Quencher) zusammen und kehrt dadurch ohne Fluoreszenzlicht auszusenden in den Grundzustand zurück. Die Kollisionslöschung verringert folglich die Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute des Fluorophors, durch Öffnung eines zusätzlichen Zerfallskanals des S_1 -Zustands. Die Löschrates k_Q^* ergibt sich aus der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante, k_Q , und der Löschmolekülkonzentration, $[Q]$, damit gilt für die Fluoreszenzlebensdauer unter Berücksichtigung der Kollisionslöschung:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_Q [Q] + \sum_i k_i} \quad \text{Gl. 2.10}$$

und für die Fluoreszenzquantenausbeute:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_Q [Q] + \sum_i k_i} \quad \text{Gl. 2.11}$$

Der zweite wichtige Löschmechanismus ist die statische Löschung. Dabei bildet der Fluorophor im Grundzustand mit dem Löscher einen Komplex. Dieser kann zwar angeregt werden, er relaxiert jedoch strahlunglos oder fluoresziert schwächer als der freie Fluorophor. Diese Art der Löschung hat häufig keinen Einfluß auf τ , während die aus Intensitätsmessungen experimentell bestimmte Quantenausbeute verringert sein kann.

Neben der Bildung eines Komplexes im Grundzustand, wie bei der statischen Löschung kann der angeregte Zustand einen Charge-Transfer-Komplex (Exciplex) mit einem Löschmolekül bilden. Eine nähere Erläuterung dieses besonderen Löschprozesses ist in Kap. 3.62 gegeben.

2.3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Beim Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) wird Energie von einem angeregten Donorfluorophor, D, strahlungslos auf einen Akzeptor (A) über einen Abstand bis zu 100 Å übertragen. Bedingung ist, daß Donorfluoreszenz- und Akzeptorabsorptionsspektrum spektral überlappen. Der Energietransfer beruht auf einer weitreichenden Dipol - Dipol Interaktion zwischen Donor und Akzeptor und erfolgt in der Regel zwischen Singulett-Zuständen und wird deshalb auch als Singulett-Singulett Transfer bezeichnet. Das Jablonski-Diagramm in Abb. 2.3 zeigt diesen Vorgang schematisch.

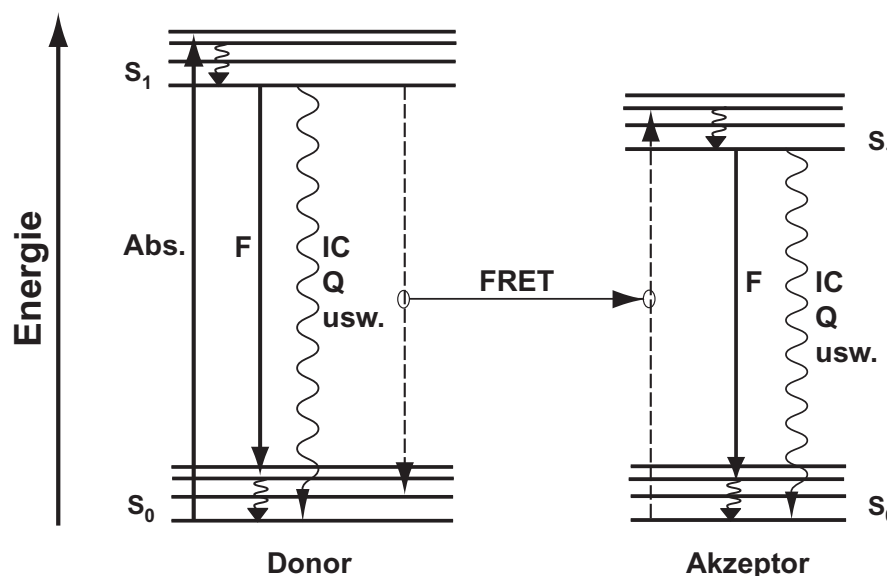


Abb. 2.3 Jablonski-Diagramm für den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Tripletzustände der beiden Fluorophore hier nicht dargestellt.

Der stark von Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängige Energietransfer resultiert in einer Verringerung der Fluoreszenzintensität des Donorfluorophors sowie der Verkürzung dessen Fluoreszenzlebensdauer, τ . Handelt es sich, wie in Abb. 2.3, bei dem Akzeptor ebenfalls um einen Fluorophor hat der Energietransfer das Auftreten von Akzeptorfluoreszenz zur Folge.

Daß die Quantifizierung dieses Phänomens wertvolle Informationen über den Abstand und Orientierung zwischen Donor und Akzeptor liefert, konnte zuerst vom Stryer und Haugland

gezeigt werden (Stryer, 1967). Die zur quantitativen Beschreibung des Energietransfers notwendige Theorie wurde bereits 1948 von Förster (Förster, 1948) entwickelt. Demnach läßt sich die FRET-Transferrate, k_{FRET} , als Funktion des Abstands, R_{DA} , zwischen Donor und Akzeptor beschreiben:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad \text{Gl. 2.12}$$

τ_D ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustands des Donorfluorophors in Abwesenheit des Akzeptors und R_0 ist der sogenannte Försterradius. Die gebräuchlichste Größe, um FRET quantitativ zu beschreiben, ist die Transfereffizienz, E_T . Sie gibt den Anteil der auf den Akzeptor übertragenen Energie bezogen auf die vom Donor absorbierte Energie an und entspricht der Quantenausbeute des Energietransfers.

$$E_T = \frac{k_{FRET}}{k_F + k_{FRET} + \sum_i k_i} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6} \quad \text{Gl. 2.13}$$

Gl. 2.13 zeigt das R_0 dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor entspricht, bei dem die Hälfte der absorbierten Energie auf den Akzeptor übertragen wird.

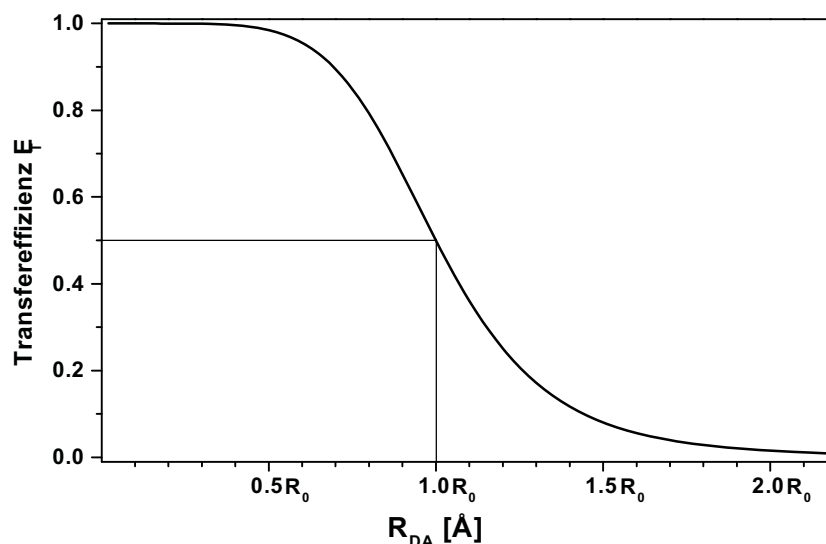


Abb. 2.4 Die Transfereffizienz, E_T , als Funktion des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor, R_{DA} , in Einheiten von R_0 .

Aus Abb. 2.4 ist ersichtlich, daß Distanzmessungen auf FRET-Basis im Abstandsbereich um R_0 am empfindlichsten sind, da kleine Änderungen in R_{DA} einen großen Effekt auf E_T haben und daß der Arbeitsbereich von konventionellen FRET-Messungen auf Abstände von ca. $0.5 R_0$ bis $1.5 R_0$ beschränkt ist.

R_0 ist für jedes Donor-Akzeptor-Paar charakteristisch und liegt in der Regel zwischen 40 bis 60 Å. Folglich stimmt der Arbeitsbereich von FRET mit den Maßen vieler Biomoleküle überein, während andere Techniken mit denen Abstände im molekularen Maßstab gemessen werden, wie NMR und EPR, dieser Abstandsbereich nicht zugänglich ist. Dabei ist die Genauigkeit der FRET-Messungen in bezug auf Distanzbestimmungen mit einer Auflösung im Angströmbereich vergleichsweise gering, so daß diese Technik eine ideale Ergänzung zu NMR-, EPR- und Röntgenstrukturmessungen ist. Ferner bieten FRET Messungen im Gegensatz zu den meisten anderen Techniken die Möglichkeit, die Moleküle unter physiologischen Bedingungen zu studieren. Aufgrund dieser Vorteile findet die FRET-Technik breite Anwendung bei der Strukturanalyse von Biomolekülen, in der Bio- und Polymerchemie.

Die Bestimmung von R_0

Die korrekte Bestimmung von R_0 ist das größte Hindernis für exakte Abstandsmessungen mit Hilfe von FRET. R_0 ist im wesentlichen von den jeweiligen Donor und Akzeptoreigenschaften abhängig:

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 (J \kappa^2 \Phi_{FD} n_D^{-4})^{1/6} \quad [\text{Å}], J \text{ in } [\text{M}^{-1} \text{cm}^3] \quad \text{Gl. 2.14}$$

Φ_{FD} ist die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, κ^2 der sogenannte Orientierungsfaktor, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor und J ist das Überlappungsintegral.

Das Überlappungsintegral, J , ist ein Maß für die spektrale Überlappung zwischen Donorfluoreszenz- und Akzeptorabsorptionsspektrum und errechnet sich aus:

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad \text{Gl 2.15}$$

hier ist $\epsilon_A(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors und $f_D(\lambda)$ die flächennormierte Fluoreszenz des Donors bei der Wellenlänge, λ .

Der Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor, n , ist relativ schwierig exakt zu bestimmen. Es wird meist angenommen, daß sich im wesentlichen Wasser zwischen Donor und Akzeptor befindet und somit der Brechungsindex mit 1,33 angenähert werden kann. Selbst wenn diese Annahme nicht in jedem Fall korrekt ist, ist der induzierte Fehler auf Grund der $n^{-2/3}$ Abhängigkeit von R_0 gering.

Bei der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, Φ_{FD} , muß berücksichtigt werden, daß die Φ_F eines Fluorophors von der jeweiligen Umgebung beeinflusst wird. Also kann hier nicht die Φ_F des freien Fluorophors eingesetzt werden.

Der Orientierungsfaktor κ^2

Der Orientierungsfaktor, κ^2 , beschreibt die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donorfluoreszenz, μ_D , und Akzeptorabsorption, μ_A und kann nach Gl. 2.16 berechnet werden:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3 \cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad \text{Gl. 2.16}$$

Abb. 2.5 verdeutlicht die Bedeutung der Winkel θ_T , θ_A und θ_D .

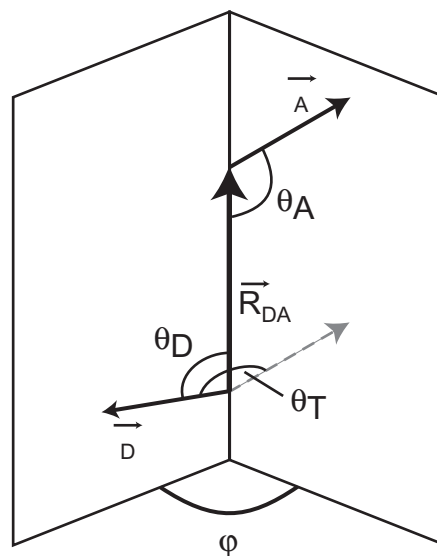


Abb. 2.5. Darstellung der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten μ_D , μ_A und dem Abstandsvektor, R .

Ohne jegliche Vorkenntnisse über diese Winkel kann κ^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen und stellt daher auf den ersten Blick eine große Unsicherheit bei der Bestimmung von R_0 dar. Im Allgemeinen wird angenommen, daß Donor und Akzeptor schnell rotieren, verglichen zur Lebensdauer des angeregten Zustands, so daß die Dipolmomente μ_A und μ_B während der Lebensdauer alle möglichen Orientierungen einnehmen. Unter dieser Voraussetzung ergibt sich für κ^2 ein gemittelter Wert von $2/3$. Die Gültigkeit dieser Annahme kann mit Hilfe von Anisotropiemessung für Donor und Akzeptor überprüft werden. Sind die Positionen des Donors und Akzeptors völlig fixiert während der Lebensdauer, jedoch statistisch verteilt beträgt κ^2 0.47 (Steinberg, 1971). Nach Gl. 2.14 beträgt demnach der Unterschied zwischen $R_{0(\kappa^2=2/3)}$ und $R_{0(\kappa^2=0.47)}$ lediglich 6 %.

Sehr viel Komplexer wird die Berechnung von κ^2 , wenn die Geschwindigkeit der Rotation, ausgedrückt durch die Rotationskorrelationszeit, der Fluorophore im Bereich der Fluoreszenzlebensdauer liegt. In diesem Fall ist κ^2 und damit R_0 abhängig von E_T , so daß eine exakte Abstandsbestimmung beinahe unmöglich wird (Dale, 1974). Bedenkt man jedoch, das Fluorophore die an Makromoleküle gebunden sind, schon allein durch die interne Bewegung des Makromoleküls nicht völlig fixiert sind, ist der durch κ^2 induzierte Fehler bei der Abstandsberechnung letztlich kleiner als 10% (Haas, 1978). Eine weitergehende Diskussion des κ^2 -Problems, sowie Lösungsansätze zur Berechnung von κ^2 für den Fall, daß die Bedingung der schnellen, freien Rotation nicht gegeben ist, finden sich in der Literatur wird (Dale, 1974).

2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die Anfänge der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie gehen auf die frühen 70er Jahre zurück, aber erst die Entwicklung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, die kleine Anregungs- und Detektionsvolumen sowie ein hohes Signal zu Hintergrundverhältnis ermöglicht, verhalf dieser Methode in den 90ern zum Durchbruch. Die FCS mißt zeitliche Intensitätsschwankungen der Fluoreszenz um einen zeitlichen Mittelwert, die von relativ wenigen Molekülen herrühren, welche z.B. in ein sehr kleines offenes Volumenelement hinein und hinaus diffundieren. Zur Untersuchung der Intensitätsschwankungen wird das gemessene Fluoreszenzsignal einer Korrelationsanalyse unterworfen, die dazu notwendige mathematische Funktion lautet:

$$G(t_c) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + t_c) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}. \quad \text{Gl. 2.17}$$

Die eckigen Klammern stehen für die zeitliche Mittelung der Funktion $I(t)$. Am Anschaulichsten läßt sich die normierte Autokorrelationsfunktion, $G(t_c)$, als Wahrscheinlichkeitsfunktion zur Detektion eines Photons von einem Fluorophor nach der Zeit $t+t_c$, wenn von diesem Fluorophor zur Zeit t ein Photon detektiert wurde. Abb. 2.5 zeigt eine typische FCS-Kurve für einen mobilen Fluorophor in Lösung.

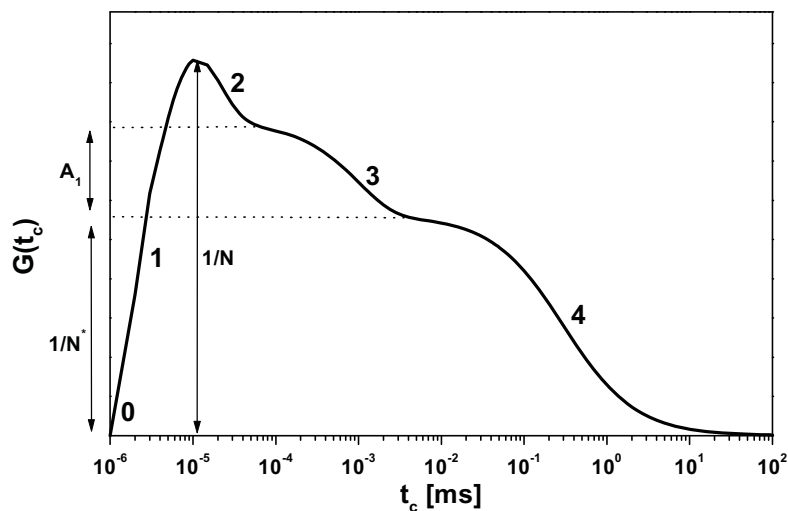


Abb. 2.6 Theoretische FCS-Kurve für Fluorophore einer Spezies mit Diffusion (4), Triplettkinetik (3), Rotationsfluktuation (2) und Antibunching (1). (0) kennzeichnet den Zeitpunkt der letzten Photonenemission. (Lit. Diss. Schaffer) zeigt eine typische FCS-Kurve. N^* entspricht der Anzahl der Fluorophore im Fokus und A_1 die Amplitude des Tripletterms. N ist die Anzahl der Fluorophore die sich in einem der Singlettzustände (S_1 oder S_0) befinden.

Zum Zeitpunkt $t_c = 0$ emittiert der Fluorophor ein Photon. Um erneut ein Photon aussenden zu können, muß der Fluorophor zunächst wieder angeregt werden, die Wahrscheinlichkeit dafür steigt für kurze Korrelationszeiten im Nanosekundenbereich rasch an. Dieser Abschnitt wird als Antibunching bezeichnet.

Danach erreicht die Korrelationsfunktion ihr Maximum, welches im wesentlichen von der Fluorophordichte abhängt. Jeder Prozeß, der zur Folge hat, daß der Fluorophor kein Photon aussendet, wie Übergang in den Tripletzustand (ISC) oder Quenchingprozesse, hat ein

Abklingen von $G(t)$ zur Folge (Bunching), das durch einen Kinetikterm (Bunchingterm) mit einer entsprechenden Zeitkonstante beschrieben werden kann.

Damit läßt die FCS Aussagen sowohl über die Kinetik als auch über Gleichgewichtskonstanten von molekularen Prozessen zu, die die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren beeinflussen. Letztlich diffundiert der Fluorophor aus dem Beobachtungsvolumen hinaus und die Wahrscheinlichkeit ein zweites Photon von diesem Fluorophor zu detektieren wird Null. Somit determiniert die translative Diffusion die obere Grenze des Zeitbereich in dem Kinetiken untersucht werden und der typischer Weise vom Nanosekunden bis in den Sekundenbereich reicht.

Für die Interpretation einer FCS Kurve wird nun versucht eine Modellfunktion zu finden, die die gemessene Kurve beschreiben kann. Gl 2.18 gibt die Funktion wieder, die die FCS-Kurve in Abb. 2.5 beschreibt. Sie beinhaltet Diffusion (4), Triplettkinetik (3), Rotationsfluktuation (2) und den „Antibunching“-Term (1), basierend auf einem gleichförmigen Strahlquerschnitt des anregenden Lasers („rechteckiges Strahlprofil“) [Eggeling 96]:

$$G(t_c) = \frac{1}{N} \left(\underbrace{\frac{1}{1+t_c/t_d}}_{(4)} + \underbrace{\frac{4}{5} e^{-t_c/\rho}}_{(2)} - \underbrace{\frac{9}{5} e^{-t_c/\tau}}_{(1)} \right) \left(\underbrace{1 - T_{eq} + T_{eq} e^{-t_c/t_T}}_{(3)} \right) \quad \text{Gl. 2.18}$$

Hier ist t_D die Diffusionszeit, ρ die Rotationskorrelationszeit, τ die Fluoreszenzlebensdauer und t_T die charakteristische Tripletterfallszeit und T_{eq} die relative Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettszustands. Gl. 2.18 zeigt, daß die Amplitude von $G(t_c)$ umgekehrt proportional zur Anzahl der Moleküle im Beobachtungsvolumen, N , ist. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei einer großen Anzahl an Fluorophoren im Laserfokus, die Intensitätsschwankungen bezogen auf das Gesamtsignal klein sind. Aus der Anzahl der Moleküle im Fokus und der Signalstärke, läßt sich die Zählrate pro Molekül („counts per molecule“, cpm) errechnen, die zur Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten sowie zur Beurteilung der Justage herangezogen werden kann.

In der Regel ist es bei der Anpassung der Modellfunktion an die gemessene FCS-Kurve notwendig, die unterschiedlichen Abmessungen des Beobachtungsvolumen in axialer und radialer Richtung zu berücksichtigen. Für einen solchen Fall lautet die Modellfunktion, die Diffusion und Triplettkinetik beschreibt:

$$G(t_c) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0) \cdot t_d}\right)}} \cdot \left(1 - T_{eq} + T_{eq} \cdot e^{-\frac{t_c}{t_T}}\right) \quad \text{Gl. 2.19}$$

Hier sind z_0 und ω_0 die $1/e$ - Radien in axialer und radialer Richtung. Eine interessante Weiterentwicklung der FCS stellt die sogenannte Kreuzkorrelationsanalyse [Schwille 97] dar. Bei dieser Form der FCS wird, im Gegensatz zur oben beschriebenen Autokorrelationsmethode, das Signal von zwei Detektoren (A + B) miteinander korreliert. Die dazu notwendige Kreuzkorrelationsfunktion ist folgendermaßen definiert:

$$G_{AB}(t_c) = \frac{\langle N_F^A(t) N_F^B(t + t_c) \rangle}{\langle N_F^A(t) \rangle \langle N_F^B(t) \rangle} = 1 + \frac{\langle \delta N_F^A(t) \delta N_F^B(t + t_c) \rangle}{\langle N_F^A(t) \rangle \langle N_F^B(t) \rangle} \quad 2.20$$

Durch die Kreuzkorrelation kann nicht nur das Problem der Totzeit der üblichen Detektoren umgangen werden, daß die Zeitauflösung der Autokorrelation begrenzt, sondern es ergeben sich zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten. Zwei Detektoren bieten beispielsweise die Möglichkeit, das Fluoreszenzlicht von zwei unterschiedlichen spektralen Bereichen miteinander zu korrelieren. Speziell diese Eigenschaft ist bei der Untersuchung von Kinetiken mit Hilfe von FRET besonders hilfreich, wenn ein Detektor die Donor und der Andere die Akzeptorfluoreszenz aufzeichnet. Fluktuationen in der FRET-Effizienz zeichnen sich dann durch eine Antikorrelation aus, d.h. wenn das Donorsignal zunimmt, nimmt das Akzeptorsignal ab und umgekehrt. Eine Antikorrelation hat einen Anstieg der Kreuzkorrelationsfunktion, $G_{AB}(t_c)$, zur Folge, die daraus ermittelte Zeitkonstante gibt die Geschwindigkeit der Fluktuationen wieder und die entsprechende Amplitude ist ein Maß für die Differenz in der FRET-Effizienz.

3 Experimenteller Teil

3.1 Material

Allgemeine Chemikalien

Aktivkohle (Merck, Darmstadt); L-Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Seelze); k-Casein aus Kuhmilch (Sigma-Aldrich); Zitronensäure (Merck); Dinatriumhydrogenphosphat (Merck); Kaliumchlorid (Fluka, Seelze); Magnesiumchlorid Hexahydrat (Sigma-Aldrich); Natriumcitrat (Merck); Natriumchlorid (Calbiochem, Bad Soden); Natriumdihydrogenphosphat (Merck); Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (TRIS) (Sigma-Aldrich).

Alle eingesetzten Chemikalien wurden in den jeweils höchsten Qualitäts- und Reinheitsstufen erworben.

Puffer

Natriumphosphat-Puffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 180 mM, pH 7.5

Hybridisierungs-Puffer: NaCl 360 mM, Natriumcitrat 24 mM, MgCl_2 50 μM , pH 7.0

TRIS-Puffer: TRIS 20 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0.2 mM,
 MgCl_2 0.1 - 10 mM, pH 7.5

PBS-Puffer: Na_2HPO_4 10.4 mM, KH_2PO_4 3.2 mM, NaCl 123 mM, pH 7.5

Zum Ansetzen der Puffer wurde bidestilliertes Wasser verwendet, das mit einer Quarz-Bidestille (Heraeus, Hanau) gewonnen wurde. Für Einzelmolekülexperimente wurden die Puffer ca. 12h über Aktivkohle gereinigt, um fluoreszierende Verunreinigungen zu entfernen.

Verwendete Spektrometer

Absorptionsspektren wurden mit einem Cary-5E UV-VIS-NIR-Spektrometer (Varian, Mulgrave, Australien) aufgenommen. Für stationäre Fluoreszenzspektren diente ein Spektrometer Spex Fluorolog III (Instruments SA, Edison, USA) mit zwei

Doppelmonochromatoren, Polarisatoren und Einzelphotonenzählung. Aus den Spektren wurde die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sowie die stationäre Anisotropie r ermittelt.

Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe für die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie müssen einige besondere photophysikalische und chemische Anforderungen, wie z. B. hohe Photostabilität und Fluoreszenzquantenausbeute, erfüllen, um lange Beobachtungszeiten und ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu ermöglichen. Außerdem sollten die verwendeten Farbstoffe mit einem der zur Verfügung stehenden Laser anregbar sein. Bei der Verwendung von extrinsischen Fluorophoren für Einzelmolekül-FRET-Experimente spielen neben diesen Kriterien noch weitere Gesichtspunkte bei der Auswahl der geeigneten Fluoreszenzfarbstoffe eine Rolle:

Beispielsweise sollten Fluorophor und Biomolekül die gleiche Nettoladung besitzen. In Kombination mit einem Linker geeigneter Länge zwischen Fluorophor und Biomolekül werden aufgrund der Coulomb-Abstoßung unerwünschte Interaktionen weitgehend vermieden.

Bei der Wahl geeigneter Fluorophore für Donor-Akzeptor-Paare von FRET-Experimenten ist darauf zu achten, daß der Försterradius R_0 möglichst groß ist. Daneben sollte sowohl die Absorption als auch die Fluoreszenz von Donor- und Akzeptorfluorophor ausreichend spektral separiert sein, um die Auswertung der FRET-Messungen zu erleichtern. Häufig spielen neben den spektralen Eigenschaften noch andere Gesichtspunkte, wie die Reaktivität der aktivierten Ester der Fluorophore zur Kopplung an das Biomolekül, bei der Auswahl des Donor-Akzeptor-Paares eine Rolle.

In der Praxis muß je nach Anforderung und Fragestellung eine individuelle Lösung bezüglich der Wahl des Fluorophors bzw. Donor-Akzeptor-Paares gefunden werden. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die folgenden Fluorophore und Donor-Akzeptor-Paare ausgewählt:

Alexa 488 als NHS-ester oder Maleinimid (Molecular Probes Inc., Eugene (OR) USA)

Alexa 594 als NHS-ester oder Maleinimid (Molecular Probes, Inc.)

Rhodamin 110 (Radiant Dyes, Wermelskirchen)

Cyanin 5 (Cy5) als NHS-ester (Amersham Pharmacia Biotech, U.K.)

Tetramethylrhodamin (TMR) (Molecular Probes, Inc.)

Rhodamin 101 (Molecular Probes, Inc.)

Im Folgenden sind die normierten Absorptions- und Emissionsspektren, die wichtigsten spektroskopischen Parameter sowie die Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Fluorophore gegeben:

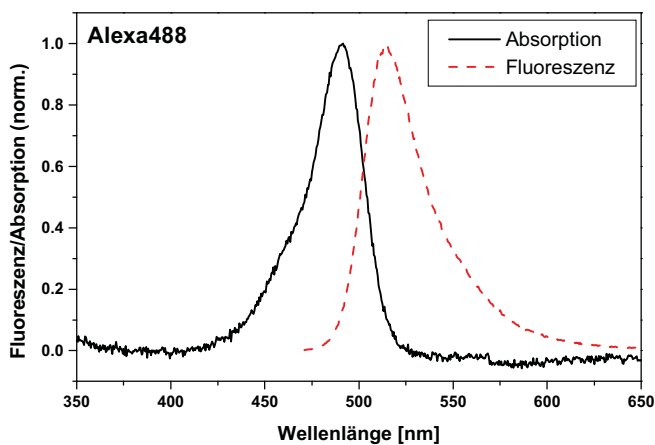
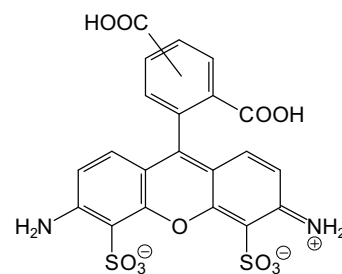


Abb. 3.1 A



Alexa 488:

Absorptionsmaximum: 495 nm

ϵ_{495} : 71 000 M⁻¹cm⁻¹

Fluoreszenzmaximum: 519 nm

Φ_F : 0.90

Lösungsmittel: Natriumphosphat-Puffer

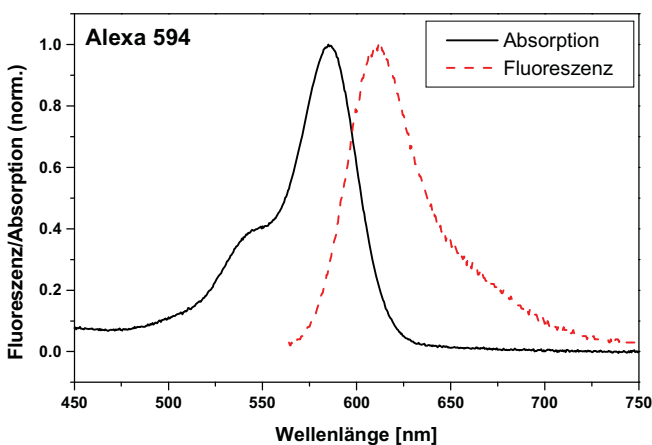
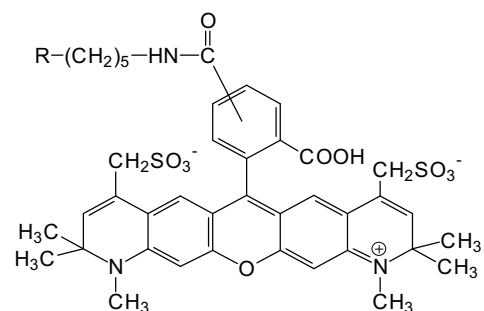


Abb. 3.1 B



Alexa 594:

Absorptionsmaximum: 585 nm

ϵ_{585} : 73 000 M⁻¹cm⁻¹

Fluoreszenzmaximum: 610 nm

Φ_F : 0.86

Lösungsmittel: Natriumphosphat-Puffer

Donor-Akzeptor-Paare

Tabelle 3.1: Donor-Akzeptor-Paare

Donor	Akzeptor
Alexa 488	Cy5
Alexa 488	Alexa 594

Die photophysikalischen Parameter (J , R_{0r}) dieser Paare sind in Tabelle 3.3 zu finden.

3.2 Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauer, Anisotropie und Fluoreszenzquantenausbeute

Die prinzipielle Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer τ und der Anisotropie r wurde bereits in Kap. 2.1.1 besprochen. Die experimentelle Aufzeichnung der Daten in Histogrammkanälen und die geringe Photonenstatistik der Einzelmolekülexperimente erfordern eine spezielle Auswertung der Fluoreszenzzerfälle. Ferner müssen Polarisierungseffekte, die durch optische Bauteile (Polarisationsmischung durch das Objektiv, endliches Verdrängungsverhältnis des Polarisationsstrahlteilers, usw.) verursacht werden, bei der Analyse Berücksichtigung finden. Aus diesem Grund sollen an dieser Stelle die Besonderheiten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Anpassungsalgorithmen herausgearbeitet werden.

In der Praxis erfolgt die Aufzeichnung des zeitlichen Abklingens der Fluoreszenzintensität nach Anregung durch einen Laserpuls nicht auf einer kontinuierlichen Zeitachse. Für die Datenaufnahme wird die Zeitachse in i Kanäle endlicher Breite aufgeteilt und ist daher diskret. Aus den auf diese Weise registrierten Meßdaten wird ein sogenanntes Fluoreszenzzerfallshistogramm aufgebaut. Bei gleichzeitiger Aufzeichnung der parallelen ($S_p(i)$) und senkrechten ($S_s(i)$) Komponente der Fluoreszenz (relativ zur Polarisation des Anregungslichts) lassen sich dann sowohl τ als auch r ermitteln. Ein Beispiel für ein typisches Zerfallshistogramm für die parallele und senkrechte Komponente der Fluoreszenz, welches im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurde, ist in Abb. 3.2 wiedergegeben. Es besteht aus 256 Kanälen K mit einer Kanalbreite von je 49 ps, was einem effektiven Meßfenster T_F von 12.5 ns entspricht. Aufgrund der Kennlinie des TAC ("Time to Amplitude Converter") können

die ersten und die letzten Kanäle nicht verwendet werden, so daß letztlich ca. 230 Kanäle zur Aufzeichnung des Fluoreszenzzerfalls zur Verfügung stehen.

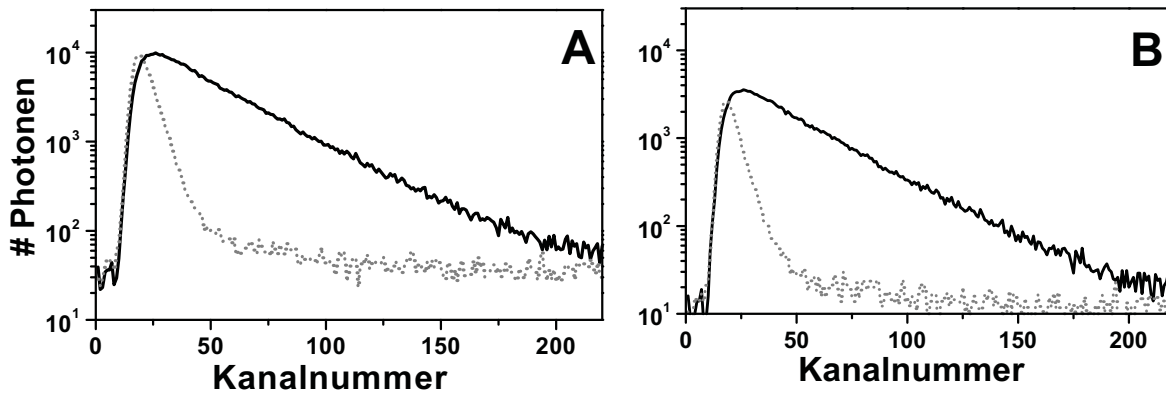


Abb. 3.2: Zerfallshistogramm für die parallele (A) und die senkrechte (B) Komponente der Fluoreszenz von Alexa 488 gebunden an ein Oligonukleotid. Die gestrichelten Linien entsprechen der jeweiligen Instrumentenantwortfunktion (IRF). Die Kanalbreite beträgt 49 ps.

Um aus diesen „Rohdaten“ τ und r ermitteln zu können, ist zunächst die Kenntnis der Instrumentenantwortfunktion (IRF) sowie die des G-Faktors notwendig. Der G-Faktor gleicht die unterschiedlichen Detektionseffizienzen für die parallele (S_p) und senkrechte (S_s) Komponente der Fluoreszenz aus und ist wie folgt definiert:

$$G = \frac{\sum_{i=1}^K S_s(i)}{\sum_{i=1}^K S_p(i)} \quad \text{für eine vollkommen isotrope Probe} \quad \text{Gl. 3.1}$$

K steht hierbei für die Anzahl der Kanäle.

Für die Bestimmung des G-Faktors wird in der Regel freier Farbstoff (z. B. Rhodamin 110 für den grünen Spektralbereich und Rhodamin 101 für den roten Spektralbereich) mit einer kurzen Rotationskorrelationszeit ($\rho \approx 200$ ps) verwendet, der einer vollständig isotropen Probe nahe kommt. Der G-Faktor wird dann nach der sogenannten „tail fitting“-Methode ermittelt, d.h. die Summation nach Gl. 3.1 erfolgt über die letzten 50 - 100 Histogrammkanäle. Durch dieses Verfahren wird eine Verfälschung des ermittelten G-Faktors durch eventuell noch vorhandene Anisotropie in den ersten Kanälen nach dem Anregungspuls ausgeschlossen.

Die Herleitung der Gl. 2.4 in Kap. 2.2.1 geht von einem delta-förmigen Anregungspuls aus. Bedingt durch die endliche Breite der Laserpulse und die Antwortfunktion der Detektoren, ist die IRF jedoch nicht unendlich schmal (Halbwertsbreite ≈ 300 ps) und muß deshalb bei der

Ermittlung von τ und r berücksichtigt werden. Die IRF läßt sich aus der Messung des reinen Laserstreulichts mit Hilfe einer Probe die keine Fluorophore enthält (Wasser oder Puffer) ermitteln.

3.2.1 Fluoreszenzlebensdauer

Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer τ muß aus den Komponenten $S_p(i)$ und $S_s(i)$ zunächst der von Polarisationseffekten bereinigte gesamte Fluoreszenzzerfall $S_{ges}(i)$ nach Gl. 3.2 (Schaffer, 1999) berechnet werden:

$$S_{ges}(i) = \frac{(1 - 3l_2) \cdot G \cdot S_p(i) + (2 - 3l_1) \cdot S_s(i)}{\sum_i^K (1 - 3l_2) \cdot G \cdot S_p(i) + (2 - 3l_1) \cdot S_s(i)}. \quad \text{Gl. 3.2}$$

Hier sind l_1 und l_2 Korrekturparameter, die die Polarisationsmischung durch das Objektiv korrigieren (Koshioka, 1995). Grundsätzlich werden für die statistische Analyse alle Daten normiert. Dementsprechend dient der Nenner in Gl. 3.2 der Normierung. Die IRF muß ebenfalls entsprechend aus den einzelnen Komponenten ermittelt werden. Folgende allgemeine Modellfunktion wird dann iterativ an $S_{ges}(i)$ angepaßt:

$$m_{ges,i} = (1 - \gamma) \frac{E_i^{rep}(\tau)}{\sum_i E_i^{rep}(\tau)} + \gamma \frac{St_{ges}}{\sum_i St_{ges}} \quad \text{Gl. 3.3}$$

Dabei entspricht $St(i)$ dem durch Streulicht verursachten Signal, γ ist der Streulichtanteil im Meßsignal. Der Ausdruck $E_i^{rep}(\tau)$ steht für folgende Exponentialfunktion:

$$E_i^{rep}(\tau) = \frac{1}{1 - e^{-T_F/\tau}} \left[\sum_{j=1}^{\min(i,l)} g_j \cdot e^{-(i-j)T_F/K\tau} + \sum_{j=i+1}^K g_j \cdot e^{-(i+K-j)T_F/K\tau} \right] \quad \text{Gl. 3.4}$$

T_F entspricht der Länge eines Zeitfensters und K der Anzahl der Kanäle. Die Funktion $E_i^{rep}(\tau)$ beinhaltet bereits die Faltung mit der Instrumentenantwortfunktion und berücksichtigt die repetitive Anregung sowie die Endlichkeit des Meßfensters. i und j sind Laufzahlen für die Kanalnummern. Eine detaillierte Herleitung der Gl. 3.2 - 3.4 ist in (Schaffer, 2000) zu finden.

Bei Messungen mit hoher Statistik von einigen tausend Photonen, wie man sie bei Ensemble Messungen oder bei Zerfallshistogrammen der „Spezies-Selektiven-Auswertung“ (Kap. 3.3.5)

erhält, erfolgt die Anpassung der Modellfunktion m nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Im Rahmen dieses Verfahrens wird versucht iterativ Werte von τ zu finden, für die der Güteparameter χ_r^2 möglichst klein wird. Dabei ist χ_r^2 folgendermaßen definiert (Bevington, 1969; Schaffer, 2000; Wahl, 1979):

$$\chi_r^2 = \frac{1}{\text{Freiheitsgrade}} \sum_{\text{alle Kanäle}} \frac{(\text{Modell}_i - \text{Daten}_i)^2}{(\text{erwartete Abweichung}_i)^2} \quad \text{Gl. 3.5}$$

Der Streulichtfaktor γ wird dann mittels linearer Regression bestimmt.

Lebensdauerbestimmung bei multiexponentiellen Zerfällen

Bei einer ausreichenden Photonenzahl der Messung lassen sich gegebenenfalls bis zu drei Fluoreszenzlebensdauern mit den entsprechenden Amplituden anpassen. Je nach Gewichtung spricht man von speziesgewichteten Amplituden X_i bzw. von fluoreszenz- oder photonengewichteten Amplituden A_i . Letztere geben den Anteil der Photonen der Zerfallskomponente i an, während X_i die relative Teilchenzahl der Komponente widerspiegelt.

$$X_i = \frac{A_i}{\tau_i} \quad \text{Gl. 3.6}$$

Mit Hilfe der Amplituden läßt sich bei einem Mehrkomponentenzerfall jeweils eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer berechnen:

$$\tau_{av}^A = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i} \quad \text{Gl. 3.7}$$

bzw.

$$\tau_{av}^X = \frac{\sum_i X_i \tau_i}{\sum_i X_i} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Da Spezies mit längerer Fluoreszenzlebensdauer meist auch eine höhere Quantenausbeute besitzen und daher mehr Photonen emittieren als Spezies mit einer kurzen

Fluoreszenzlebensdauer, gilt: $\tau_{av}^A \geq \tau_{av}^X$. Über τ_{av}^X läßt sich eine mittlere Quantenausbeute $\Phi_{F,av}$ definieren:

$$\Phi_{F,av} = k_F \tau_{av}^X \quad \text{Gl. 3.9}$$

Dies bedeutet, daß, beim Vergleich von stationären Intensitätsmessungen mit Fluoreszenzlebensdauermessungen sowie bei der Berechnung von FRET-Effizienzen, τ_{av}^X und nicht τ_{av}^A zu verwenden ist (Lakowicz, 1999). Werden multiexponentielle Zerfälle monoexponentiell ausgewertet, wird ein τ_{av}^{mono} erhalten, dabei gilt $\tau_{av}^A \approx \tau_{av}^{mono} \geq \tau_{av}^X$. Dieser Fall tritt häufig bei Einzelmolekülmessungen auf.

3.2.2 Zeitaufgelöste und stationäre Anisotropie

Die übliche Berechnung der stationären Anisotropie nach Gl. 2.6 muß aufgrund der optischen Eigenschaften einiger verwendeter Bauteile (z.B. Polarisationsmischung im Objektiv) im Fluoreszenzmikroskop ebenfalls modifiziert werden:

$$r = \frac{(GS_p - S_s) - \gamma(GS_p + 2S_s) \cdot (1 - 3\alpha/2)}{(1 - 3l_2) \cdot GS_p + (2 - 3l_1) \cdot S_s - \gamma(GS_p + 2S_s) \cdot [(1 - 3l_2) - 3\alpha/2 \cdot (l_1 - 2l_2)]} \quad \text{Gl. 3.10 A}$$

Zur Bestimmung der zeitaufgelösten Anisotropie $r(t)$ bzw. der Rotationskorrelationszeit ρ und der statischen Anisotropie r_0 wird eine globale Anpassung an $S_s(i)$ und $S_p(i)$ durchgeführt. Die beiden benötigten Modellfunktionen für den parallelen (m_p) und den senkrechten (m_s) Fluoreszenzzerfall lauten:

$$m_p(i) = (1 - \gamma) \frac{G^{-1} [E_i^{rep}(\tau) + (2 - 3l_1)r_0 E_i^{rep}(\tau, \rho)]}{\sum_i \left\{ G^{-1} [E_i^{rep}(\tau) + (2 - 3l_1)r_0 E_i^{rep}(\tau, \rho)] + [E_i^{rep}(\tau) - (1 - 3l_2)r_0 E_i^{rep}(\tau, \rho)] \right\}} + \gamma \frac{St_p(i)}{\sum_i [St_p(i) + St_s(i)]} \quad \text{Gl. 3.10 B}$$

$$m_s(i) = (1 - \gamma) \frac{E_i^{rep}(\tau) - (1 - 3l_2)r_0 E_i^{rep}(\tau, \rho)}{\sum_i \left\{ G^{-1} [E_i^{rep}(\tau) + (2 - 3l_1)r_0 E_i^{rep}(\tau, \rho)] + [E_i^{rep}(\tau) - (1 - 3l_2)r_0 E_i^{rep}(\tau, \rho)] \right\}} + \gamma \frac{St_s(i)}{\sum_i [St_p(i) + St_s(i)]} \quad \text{Gl. 3.10 C}$$

Die auftretende modifizierte Exponentialfunktion $E_i^{rep}(\tau, \rho)$ ergibt sich aus $E_i^{rep}(\tau)$ indem das Argument $1/\tau$ in Gl. 3.4 durch $1/\tau + 1/\rho$ ersetzt wird. Wie man anhand der Komplexität der

drei Gleichungen 3.10 A bis C bereits erahnen kann, sprengt die Herleitung der Modelle den Rahmen dieser Arbeit, der interessierte Leser findet sie bei (Schaffer, 2000). Bei den Gleichungen 3.10 B und C handelt es sich um normierte Modellfunktionen, die nur für monoexponentielle Zerfälle gelten. Prinzipiell können mit Hilfe dieser Modellfunktionen durch Summation mehrere τ und ρ gleichzeitig angepaßt werden:

$$M_p(i) = \sum_j A_j m_p^j \quad \text{und} \quad M_s(i) = \sum_j A_j m_s^j \quad \text{Gl. 3.11A, B}$$

Um die Anzahl der Freiheitsgrade zu begrenzen, wird in der Praxis in zwei Schritten vorgegangen: i) Zunächst werden nach den oben beschriebenen Verfahren die Fluoreszenzlebensdauern τ_j mit zugehörigen Amplituden X_j bzw. A_j sowie γ bestimmt. ii) Diese Parameter werden dann in den Modellen M_s und M_p festgehalten und die Rotationskorrelationszeiten ρ_j mit den dazugehörigen Amplituden r_{0j} angepasst. Auf diese Weise können bei ausreichender Photonenstatistik bis zu drei Lebensdauerspezies mit jeweils bis zu drei Rotationskorrelationszeiten bestimmt werden.

3.2.3 Anpassung der Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie bei Einzelmolekülmessungen

Bei Einzelmolekülmessungen umfaßt jedes Ereignis, je nach Anregungsintensität und Diffusionsweg durch das Detektionsvolumen, maximal einige hundert Photonen. Eine solch geringe Statistik läßt nur eine monoexponentielle Anpassung zu, d.h. pro Ereignis kann nur eine Fluoreszenzlebensdauer τ sowie ein Wert für ρ bzw. r_0 angepaßt werden, so daß eine Mittelung dieser Parameter über die Durchtrittszeit erfolgt. Für den Fall mehrerer Fluoreszenzlebensdauerzustände eines Fluorophors während des Durchtritts durch den Laserfokus wird eine mittlere Lebensdauer angepaßt, die τ_{av}^A entspricht. Ferner wird bei der Datenanpassung auf Einzelmolekülebene ein äquivalenter Güteparameter $2I^*$ anstelle von χ^2 verwendet, der auf einer Multinomialstatistik beruht. $2I^*$, das sich aus der Theorie des "Maximum-Likelihood"-Schätzers ableitet, gewichtet die Abweichungen des Modells von den Meßdaten bei geringer Signalstärke besser als χ^2 (Köllner, 1993; Schaffer, 2000).

3.2.4 Bestimmung der Akzeptorlebensdauer

Bei Einzelmolekül-FRET-Experimenten wird neben der Donorlebensdauer $\tau_{D(A)}$ in Anwesenheit des Akzeptors für jedes Einzelmolekülereignis die Akzeptorlebensdauer τ_A

bestimmt. Da der Akzeptor über den Donor angeregt wird, müßte der Fluoreszenzzerfall des Akzeptors mit dem des Donors gefaltet werden. Dazu wäre eine globale Analyse des Donor- bzw. Akzeptorzerfalls erforderlich. Eine solche Anpassungsprozedur war zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht einsetzbar. Aus diesem Grund wird vom Akzeptorfluoreszenzzerfall nur der Abklingteil ohne Streulicht berücksichtigt und dementsprechend ohne die sonst übliche Faltung mit der IRF angepaßt. Ferner wird bei der Anpassung nur ein Exponent zugelassen. Die Diskussion der Ergebnisse aus der Akzeptorlebensdauerbestimmung ist unter diesem Gesichtspunkt folglich auf qualitative Aussagen beschränkt. Die so bestimmte Akzeptorlebensdauer kann aber gerade bei hohen FRET-Effizienzen, aufgrund der relativ großen Anzahl an registrierten Photonen in den Akzeptorkanälen und der damit verbundenen guten Statistik im Vergleich zu den Donorkanälen, feine Unterschiede anzeigen. Da für die Bestimmung der stationären Anisotropie nur die Differenz zwischen dem parallelen und dem senkrechten Signal entscheidend ist, bleibt diese nach wie vor gültig.

3.2.5 Standardabweichungen für τ , ρ und r im Einzelmolekülexperiment

Für die Standardabweichung $\sigma(\tau)$ der Fluoreszenzlebensdauer τ gilt unter Vernachlässigung der Faltung mit der IRF (Brand, 1998; Schaffer, 2000):

$$\sigma(\tau) = \left[\frac{\tau^4 K^2}{N T_F^2} (1 - e^{-T_F/\tau}) \right]^{1/2} \left[\frac{e^{T_F/\tau K} (1 - e^{-T_F/\tau})}{(e^{T_F/\tau K} - 1)^2} - \frac{K^2}{e^{T_F/\tau} - 1} \right]^{-1/2} \quad \text{Gl. 3.12}$$

N ist hier die Photonenzahl. Bei Berücksichtigung der Faltung mit der IRF wird die Fehlerrechnung sehr viel komplexer (Schaffer, 2000) und man erhält Standardabweichungen die um 2-3% höher liegen als die nach Gl. 3.12 berechneten. Die Standardabweichung $\sigma(r)$ der Anisotropie r läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\sigma(r)^2 = \left(\frac{\partial r}{\partial S_p} \sigma_{S_p} \right)^2 + \left(\frac{\partial r}{\partial S_s} \sigma_{S_s} \right)^2 = \frac{9 S_p^2 S_s^2}{(S_p + 2 S_s)^4} \cdot \left(\frac{1}{S_p} + \frac{1}{S_s} \right) \quad \text{Gl. 3.13}$$

Diese Gl. gilt für die vereinfachenden Annahmen, daß $l_1 = l_2 = 0$ und $G = 1$ ist.

3.2.6 Fluoreszenzquantenausbeute

Die exakte Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten ist insbesondere bei der Berechnung von Abständen auf Grundlage von FRET von großer Bedeutung. Im Rahmen

dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten entweder aus Intensitäts- oder aus Fluoreszenzlebensdaueremessungen ermittelt.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist definiert als das Verhältnis von Emission zu Absorption. Bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute aus Intensitätsmessungen am Spektrometer wird zunächst die Absorption bzw. die optische Dichte (o.D.) der Probe und anschließend die Fluoreszenzintensität F bestimmt. Da die Fluoreszenz von der Anregungsintensität abhängt und diese am Spektrometer gewissen Schwankungen unterliegt, empfiehlt es sich, eine Referenzprobe bekannter Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{F,Ref}$ zu verwenden. Die Fluoreszenzquantenausbeute der Probe $\Phi_{F,Probe}$ kann dann nach Gl. 3.14 berechnet werden:

$$\Phi_{F,Probe} = \frac{o.D._{Ref} F_{Probe} n_{Probe}^2 \Phi_{F,Ref}}{o.D._{Probe} F_{Ref} n_{Ref}^2} \quad \text{Gl. 3.14}$$

Häufig werden sowohl Probe als auch Referenz in Wasser bzw. Puffer gemessen, dann ist die Berücksichtigung des Brechungsindex vom umgebenden Medium, n , in Gl. 3.14 nicht erforderlich. Bei dieser Art der Quantenausbeutebestimmung ist darauf zu achten, daß die o.D. einen Wert von 0.03 nicht übersteigt, um Artefakte durch Reabsorption zu vermeiden.

Eine Variante der Intensitätsmessung ist die Bestimmung der Zählrate pro Molekül (cpm) mit Hilfe der FCS oder aus Einzelmolekülexperimenten. Im Gegensatz zu den Ensemblesmessungen am Spektrometer ist die Kenntnis der Fluorophorkonzentration bei dieser Methode nicht erforderlich. Dafür müssen die Extinktionskoeffizienten ϵ der zu untersuchenden Fluorophore bei der Anregungswellenlänge λ_{Ex} bekannt sein:

$$\Phi_{F,Probe} = \frac{\epsilon_{\lambda,Ref} \text{cpm}_{Probe} \Phi_{F,Ref}}{\epsilon_{\lambda,Probe} \text{cpm}_{Ref}} \quad \text{Gl. 3.15}$$

Da bei der FCS im Vergleich zu Spektrometermessungen bei sehr hohen Anregungsleistungen gearbeitet wird, muß bei dieser Methode sichergestellt sein, daß die Anregungsleistung so gewählt ist, daß Sättigungseffekte ausgeschlossen werden können. Im Bereich der Sättigung ist die Fluoreszenzintensität nicht linear von der Anregungsintensität abhängig.

Alternativ zu Intensitätsmessungen kann die Fluoreszenzquantenausbeute aus Messungen der Fluoreszenzlebensdauer ermittelt werden. Bei der Bestimmung von $\Phi_{F,Probe}$ mit Hilfe von τ wird ebenfalls ein Referenzfarbstoff mit bekannter $\Phi_{F,Ref}$ benötigt und es gilt:

$$\Phi_{F,Probe} = \frac{\tau_{Probe}}{\tau_{Ref.}} \Phi_{F,Ref.} \quad \text{Gl. 3.16}$$

Gl. 3.16 gilt nur unter der Voraussetzung, daß die „strahlende Lebensdauer“ ($1/k_F$) für Referenz und Probe identisch ist. Diese Annahme ist dann gerechtfertigt, wenn Probe und Referenz der gleichen Farbstoffklasse angehören.

3.3 Multi-Parameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD)

Die Multi-Parameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) ist eine Technik, die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich zur Durchführung von FRET-Untersuchungen auf Einzelmolekülebene verwendet wurde, aber auch für Ensemblemessungen geeignet ist. Allgemein bieten Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen gegenüber Ensemblemessungen den Vorteil, daß statische und dynamische Verteilungen direkt ermittelt werden können und eine aufwendige biochemische Reinigung der Proben in der Regel nicht nötig ist. Durch gleichzeitige Analyse mehrerer FRET-relevanter Parameter bietet MFD zusätzlich die Möglichkeit zur quantitativen FRET-Analyse bei einer für Einzelmolekülexperimente hohen Auflösung und Genauigkeit. Im Folgenden soll zunächst der notwendige Aufbau und anschließend die Datenaufbereitung und Analyse für MFD vorgestellt werden.

3.3.1 Konfokales Mikroskop

Die Multi-Parameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) auf Einzelmolekülebene ist nur mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop zu verwirklichen. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie können sehr kleine Detektionsvolumina erreicht werden, die typischerweise im Bereich von wenigen Femtolitern liegen. Dadurch ist ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis gewährleistet, daß für die Einzelmolekülspektroskopie essentiell ist. Eine detaillierte Beschreibung des Prinzips der konfokalen Mikroskopie ist in der Literatur zu finden (Pawley, 1995). An dieser Stelle sollen nur die Besonderheiten des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aufbaus erläutert werden, der in Abb. 3.3 schematisch dargestellt ist.

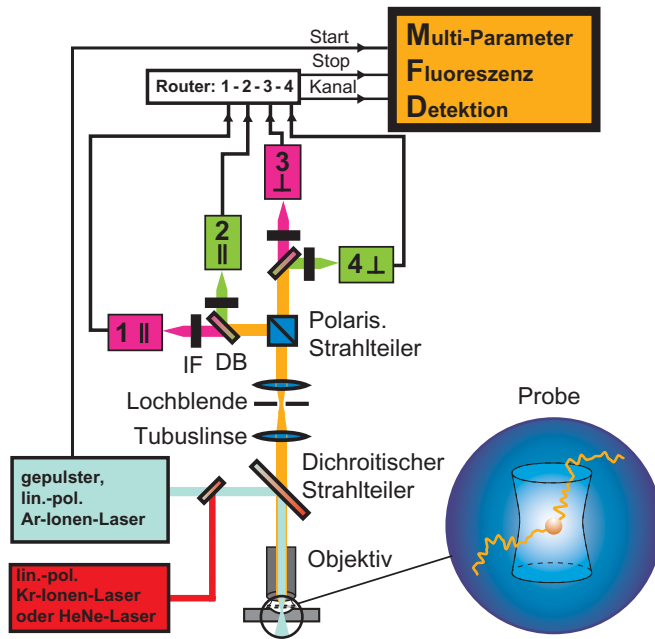


Abb. 3.3: Konfokales Mikroskop mit Vier-Kanal-Detektionseinheit. Die Probe wird durch den/die Laser, der/die über einen dichroitischen Strahlteiler in das Objektiv eingekoppelt wird/werden, angeregt. Die Fluoreszenz der Probe passiert den dichroitischen Strahlteiler und wird auf eine Lochblende fokussiert. Anschließend wird die Fluoreszenz durch einen polarisierenden Strahlteiler und zwei Langpaßfilter (DB) in vier verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Bevor die Fluoreszenz schließlich auf die vier Detektoren (1 - 4) gelangt, wird für jede Fraktion verbliebenes Streulicht durch geeignete Interferenz-Filter (IF) diskriminiert.

Im Fall von FRET-Experimenten können zusätzlich Donor- und Akzeptorfluorophore getrennt voneinander mit zwei verschiedenen Lasern angeregt werden. Zur Anregung des Donors mit linear polarisiertem, gepulstem Laserlicht steht ein Argon-Ionen-Laser (Sabre, Coherent, Palo Alto) mit einer Repetitionsrate von 73 MHz zur Verfügung, der im Rahmen dieser Arbeit bei den Wellenlängen 496.5 nm und 476.5 nm betrieben wurde. Optional können die Akzeptorfluorophore mit einem Helium/Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 594 nm (für Alexa 594) oder alternativ mit einem Krypton-Ionen-Laser (Sabre, Coherent, Palo Alto) bei einer Wellenlänge von 647 nm (für Cy5) angeregt werden. Der Argon-Ionen-Laser und der jeweilige Laser zur Anregung des Akzeptorfarbstoffs werden mittels eines dichroitischen Spiegels (AHF, Analysentechnik, Tübingen) zusammengeführt. Über einen dichroitischen Strahlteiler (diverse Langpaßfilter nutzbar, AHF, Analysentechnik, Tübingen) werden sie in das Mikroskopobjektiv (UPLAPO 60x 1.2 W, Olympus) eingekoppelt und in die Probe fokussiert. Um frei in Lösung diffundierende Moleküle zu beobachten und um Lichtstreuung an der Oberfläche des Deckglases zu vermeiden, befindet sich der Fokus ca. 150 μm oberhalb in der Probenlösung. Die Probe selbst befindet sich dabei als Tropfen mit einem Volumen von ca. 60 μl auf einem Deckglas (Menzelgläser #1.5, entspricht einer Dicke von 170 μm) das in einer Probenkammer eingespannt ist.

Die laserinduzierte Fluoreszenz aus der Probe wird durch das Objektiv gesammelt, passiert den dichroitischen Strahlteiler und wird über eine Linse auf eine Lochblende (100 μm)

fokussiert, die dafür sorgt, daß das Detektionsvolumen in Strahlrichtung begrenzt wird. Eine zweite Linse, hinter der Lochblende, bündelt das Fluoreszenzlicht wieder zu einem parallelen Strahl. Ein Polarisationsstrahlteiler separiert das Fluoreszenzlicht in eine parallele und eine senkrechte Komponente, bezogen auf die Polarisation des Anregungslichts. Anschließend wird jede Komponente durch einen Langpaßfilter in einen langwelligen (roten, Akzeptor) Anteil und kurzwelligen (grünen, Donor) Anteil aufgeteilt, so daß letztlich vier Avalanche-Photodioden (SPCM AQR 14CD, EG&G, Kanada) zur Detektion benötigt werden. Vor den Detektoren befinden sich Interferenzfilter, die das Licht der Anregungswellenlänge sowie der Ramanstreuung durch das Lösungsmittel blocken, während das gewünschte Fluoreszenzlicht passieren kann. Diese Filter werden auf die jeweiligen Anregungswellenlängen sowie auf die verwendeten Fluorophore abgestimmt. In Tabelle 3.2 sind die verwendeten Filterkombinationen und dichroitischen Spiegel für die unterschiedlichen Donor-Akzeptor-Paare angegeben.

Tabelle 3.2: Die verwendeten Filter und Strahlteiler für die unterschiedlichen Anwendungen

Donor/Akzeptor	Dichroitischer Strahlteiler	Langpaßfilter (DB)	Interferenzfilter Donor (IF _D)	Interferenzfilter Akzeptor (IF _A)	g _R /g _G ³⁾
Alexa488/Cy5 ¹⁾	502/636 PC	620 DCRX	HQ 535/50	HQ 730/140	2.2
Alexa488/Cy5 ²⁾	488/636 PC	595 DCLP	HQ 535/50	HQ 730/140	1.6
Alexa488/Alexa594	488/594 PC	595 DCLP	HQ 535/50	HQ 650/75	1.25

1) Für DNA-Strukturuntersuchung

2) Für die Untersuchung der Holliday-Junction

3) Verhältnis der Detektionseffizienzen im roten- und grünen Spektralbereich.

Alle verwendeten Filter wurden von der Firma AHF, Analysentechnik, Tübingen bezogen.

3.3.2 Durchführung der Messungen

Zunächst muß in einem Experiment die Anregungsleistung des Lasers optimiert werden, um ein ideales Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erreichen und um eine vorzeitige Zerstörung des Donor- bzw. Akzeptorfluorophors zu vermeiden. Dazu wird in einer Meßreihe die Laserleistung variiert, bis die Anregungsleistung gefunden ist, bei der die Zählrate pro Molekül für die jeweilige Probe am größten und gleichzeitig die Diffusionszeit noch nicht verkürzt ist. Diese Prozedur muß für jedes Donor-Akzeptor-Paar und für jedes Biomolekül/Fluorophor-Konstrukt separat durchgeführt werden, sofern keine Erfahrungswerte von ähnlichen Molekülen vorliegen.

Im Rahmen der eigentlichen Messung müssen, nach sorgfältiger Justage der Apparatur, zunächst einige für die Auswertung relevante Parameter bestimmt werden. Dazu sind eine Reihe von Standardmessungen notwendig:

1) Puffer:

Ermittlung des Schwellenkriteriums zum Selektieren der

Einzelmolekülereignisse

Bestimmung der Untergrundzählraten B_G und B_R

Bestimmung der Instrumentenantwortfunktion (IRF)

2) Rhodamin 110 (Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9}$ mol/l)

Bestimmung der G-Faktors für den grünen Spektralbereich

3) Rhodamin 110 (Einzelmolekülmessung, $c \approx 10^{-11}$ mol/l)

Kontrollmessung für die Beurteilung der Güte der Justage

4) Rhodamin 101 (Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9}$ mol/l)

Bestimmung der G-Faktors für den roten Spektralbereich

5) Mit dem jeweiligen Donorfluorophor markierte Probe (Ensemblemessung $c \approx 10^{-9}$ mol/l)

Berechnung des spektralen Crosstalks α

3.3.3 Datenaufbereitung und Analyse

Eine detaillierte Beschreibung der Datenaufbereitung und Analyse im Rahmen der MFD ist in (Eggeling, 2001) zu finden. An dieser Stelle sollen nur die wichtigsten Aspekte behandelt werden, die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendig sind. Die Datenanalyse der MFD-Methode baut auf der Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime (BIFL)-Technik (Eggeling, 1998) auf. Das Prinzip der BIFL-Datenaufnahme, das auf zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung beruht, ist in Abb. 3.4 dargestellt. Bei dieser Technik werden jedem detektierten Photon vier Parameter zugeordnet: (1) Die Ereignisnummer $Er\#$, die die zeitliche Detektionsreihenfolge wiedergibt; (2) Die Interphotonenzeit Δt (\sim ms), aus der die makroskopische Zeitachse generiert wird, sie entspricht dem Zeitabstand zum jeweils vorhergehenden Photon; (3) Die Ankunftszeit $\Delta \tau$ (\sim ns) des Photons relativ zum

vorhergehenden Laserpuls; (4) die Detektornummer det\# (1 bis 4), die angibt, von welchem der vier Detektoren das Photon registriert wurde.

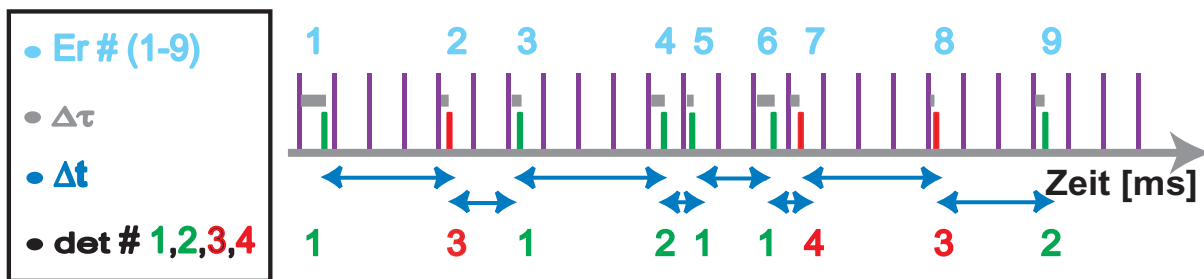


Abb. 3.4: Prinzip der BIFL-Datenaufnahme. Für jedes detektierte Photon werden vier Parameter gespeichert: Die Ereignisnummer Er\# , die Interphotonenzeit Δt , die Ankunftszeit $\Delta\tau$ (schwarze waagerechte Balken) relativ zum vorausgegangenen Laserpuls (graue senkrechte Balken) und die Kanalnummer det\# .

Bei der Durchführung eines Einzelmolekülexperiments muß die Konzentration der Probe so niedrig sein (~ 10 pM), daß die Wahrscheinlichkeit, zwei Moleküle gleichzeitig zu detektieren, so gering ist, daß solche Ereignisse vernachlässigt werden können. Das bedeutet, daß sich zum überwiegenden Teil der Meßzeit gar kein fluoreszierendes Molekül im Detektionsvolumen befindet, also nur Photonen registriert werden, die vom Untergrund herrühren. Der erste Schritt bei der Datenanalyse besteht deshalb in der Identifizierung der Photonen, die von Einzelmoleküldurchtritten (engl.: "Bursts") verursacht werden, dazu wird Δt über ev\# aufgetragen. Solange sich kein Fluorophor im Detektionsvolumen befindet, ist der Abstand zwischen den Photonen, die im wesentlichen von nicht vollständig geblockter Raman- und Rayleighstreuung sowie dem „Shot-noise“ verursacht werden, groß. Diffundiert ein Fluorophor durch das Detektionsvolumen, nimmt infolge der laserinduzierten Fluoreszenz der zeitliche Abstand zwischen den Photonen stark ab. Einzelmoleküldurchtritte zeichnen sich deshalb durch einen Einbruch in der Δt - Spur aus (Abb. 3.5 A). Da die Δt -Spur üblicherweise relativ verrauscht ist, wird eine mathematische Prozedur (Lee-Filter) (Enderlein, 1997) angewandt, die signifikante Änderungen in Δt gegenüber dem statistischen Rauschen des Untergrundes hervortreten läßt. Einzelmoleküleereignisse können dann anhand eines Schwellenkriteriums selektiert werden.

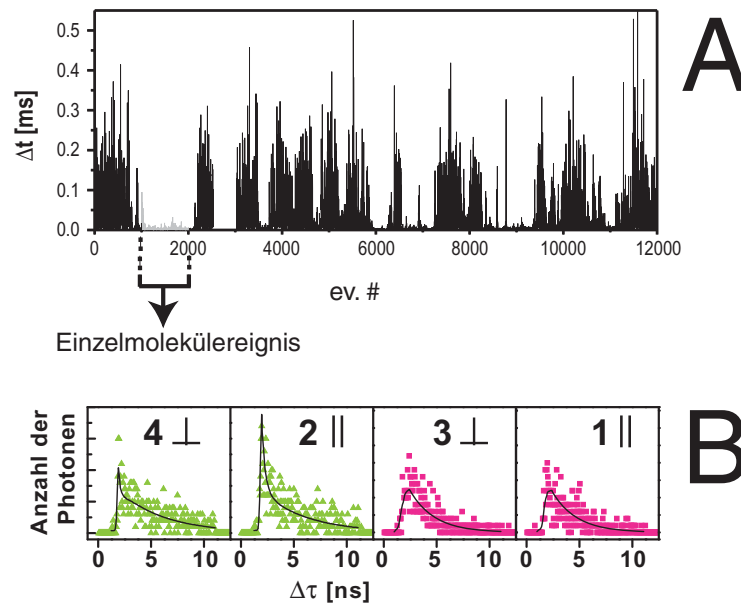


Abb. 3.5: A) Δt -Spur eines Einzelmolekülexperiments nach Lee-Filterung. Einzelmolekülereignisse können anhand kleiner Δt -Werte identifiziert und selektiert werden. B) Aus den $\Delta \tau$ -Werten des selektierten Einzelmolekülereignisses können die einzelnen Zerfallshistogramme für die vier Detektionskanäle erstellt werden (Detektoren 4 + 2 für den grünen Spektralbereich und Detektoren 3 + 1 für den roten Spektralbereich (vgl. Abb. 3.3)).

Damit nur Ereignisse ausgewählt werden, die genügend Photonen enthalten, um eine ausreichende Statistik für die folgende Auswertung zu gewährleisten, werden einzig Einzelmoleküldurchtritte berücksichtigt, die eine Mindestphotonenzahl (meist 100 - 160 Photonen) enthalten. Ist ein Moleküldurchtritt identifiziert, können für dieses Ereignis die Fluoreszenzintensität S , die Fluoreszenzlebensdauer τ , die Anisotropie r sowie einige andere Parameter jeweils für den grünen und den roten Spektralbereich separat bestimmt werden:

1) Signalintensität, S : Die Fluoreszenzintensität in kHz läßt sich aus der Anzahl der detektierten Photonen in jedem Spektralbereich und der Dauer des Ereignisses bestimmen. Für den grünen Spektralbereich (Donorfluoreszenz) erhält man S_G und für den roten Spektralbereich (Akzeptorfluoreszenz) S_R .

2) Fluoreszenzlebensdauer τ und Anisotropie r : Aus den Ankunftszeiten $\Delta \tau$ der Photonen lassen sich Fluoreszenzerfallshistogramme erstellen (Abb. 3.5 B), aus denen dann mit Hilfe der entsprechenden Fitroutinen (Kap. 3.2) sowohl τ als auch r für beide Spektralbereiche ermittelt werden können. Dabei läßt die relativ geringe Anzahl der detektierten Photonen während eines Einzelmoleküldurchtritts jeweils nur eine monoexponentielle Anpassung zu. Dies hat zur Folge, daß im Fall von zwei Lebensdauer- oder Anisotropiezuständen während

eines Durchtritts jeweils das fluoreszenzgewichtete Mittel aus beiden Zuständen gemessen wird (vgl. Kap. 3.2).

3) *Burst-Größen-Verteilung (BSD)*: Aus der Anzahl der Photonen pro Einzelmolekülereignis läßt sich für eine Messung die Burst-Größen-Verteilung erstellen, die Rückschlüsse auf Detektionseffizienzen erlaubt (vgl. Kap. 5.5.1).

4) *Photonengewichteter zeitlicher Schwerpunkt, T* : Dieser Parameter wird bestimmt, indem der Mittelwert der makroskopischen Zeiten aller Photonen des jeweiligen spektralen Bereichs gebildet wird. Für den grünen (Donor) Spektralbereich erhält man T_G und für den roten (Akzeptor) entsprechend T_R . Diese Parameter sind besonders bei der Auswertung von FRET-Einzelmolekülexperimenten von Bedeutung, da die Differenz $T_G - T_R$ geeignet ist Einzelmolekülereignisse auszuwählen, die eine „falsche“ FRET-Effizienz widerspiegeln. Bei Molekülen, die während der gesamten Zeit ein gleichmäßiges FRET-Signal zeigen, ist $T_G - T_R$ null, da der zeitliche Schwerpunkt des Donor- und Akzeptorsignals identisch ist. Ein Effekt, der zur Berechnung einer falschen (zu niedrigen) FRET-Effizienz führt, ist beispielsweise das Ausbleichen des Akzeptorfarbstoffs während des Durchtritts des FRET-aktiven Moleküls durch den Laserfokus. In diesem Fall ist T_R kleiner als T_G und daher $T_G - T_R$ größer null. Für die Analyse von FRET Experimenten ist es daher sinnvoll nur solche Ereignisse zu berücksichtigen, bei denen $T_G - T_R$ einen Wert um null annimmt. In der Praxis hat sich ein Kriterium von $-0.55 < T_G - T_R < 0.55$ als sinnvoll erwiesen, und es wurden nur Moleküle zur Auswertung herangezogen, die dieses Kriterium erfüllten.

3.3.4 Darstellung der Daten

Üblicherweise werden während einer Einzelmolekülmessung viele tausend Einzelmolekülereignisse registriert. Für jedes Ereignis erhält man die Fluoreszenzparameter Intensität, Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie jeweils für den grünen (S_G , τ_G , r_G) und roten (S_R , τ_R , r_R) Spektralbereich. Die Ergebnisse lassen sich am besten in Häufigkeitshistogrammen darstellen. Die geringe Zahl an registrierten Photonen für ein einzelnes Molekülereignis führt zu breiten, teilweise überlappenden Verteilungen der Parameter. Um eine höhere Auflösung zu erreichen, ist es daher hilfreich bestimmte Parameterpaare wie S_G und S_R oder r_G und τ_G in zweidimensionalen Häufigkeitshistogrammen darzustellen, wobei die Häufigkeit durch einen Farbcode repräsentiert wird. Am Beispiel einer Mischung der Farbstoffe Rhodamin 110 und TMR soll der Vorteil dieser Darstellungsform

veranschaulicht werden. Abb. 3.9 zeigt das Ergebnis einer Messung des Farbstoffgemischs bei Anregung durch den Argon-Ionen-Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 496.5 \text{ nm}$).

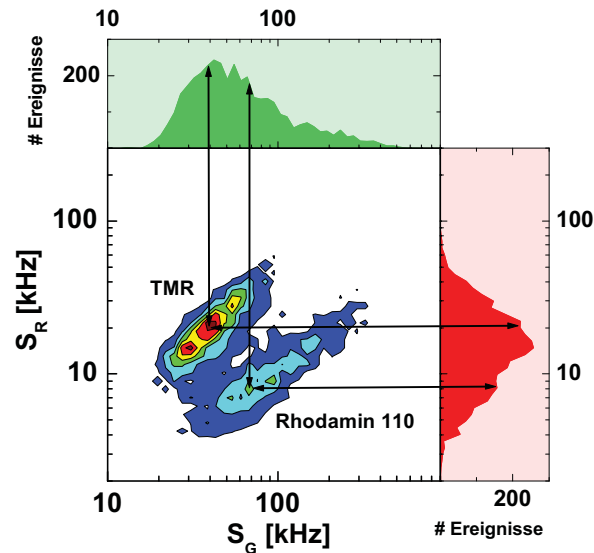


Abb. 3.6: Zweidimensionales Häufigkeitshistogramm des Parameterpaares S_G und S_R . Die eindimensionalen Häufigkeitsverteilungen sind jeweils als Projektionen dargestellt. Bei der Probe handelt es sich um eine Mischung aus den beiden Farbstoffen Rhodamin 110 und TMR (Anregung bei 496.5 nm).

Als Parameterpaar sind die Intensitäten S_G im grünen und S_R im roten Spektralbereich aufgetragen. Während in den eindimensionalen Häufigkeitshistogrammen, die als Projektionen gezeigt sind, jeweils nur eine breite Verteilung zu beobachten ist, können im zweidimensionalen Histogramm die beiden Farbstoffe unterschieden werden.

Sollen aus einem solchen Histogramm die relativen Anteile unterschiedlicher Populationen bestimmt werden (beispielsweise die Anteile von TMR und Rhodamin 110 in der Messung, die in Abb. 3.6 dargestellt ist), ist zu beachten, daß die Schwellenkriterien bei der Selektion der Einzelmolekülereignisse die Verteilungen beeinflussen. Für die korrekte Bestimmung der Anteile ist daher eine Extrapolation der BSD nötig, um das Verhältnis der selektierten zu den nicht selektierten Ereignissen für jede Population bestimmen zu können (Fries, 1998) (vgl. Kap. 5.5.1).

3.3.5 Speziesslektive Auswertungen

Es wurde bereits erwähnt, daß Parameter wie τ oder r , zu deren Bestimmung eine Fitroutine benötigt wird, aufgrund der geringen Statistik eines Einzelmolekülereignisses jeweils nur

monoexponentiell angepaßt werden können und mit einer entsprechenden Ungenauigkeit behaftet sind. Um die Statistik wesentlich zu erhöhen bietet MFD die Möglichkeit einer speziesselktiven Analyse. Dazu werden Ereignisse mit identischen Eigenschaften selektiert. Beispielsweise können in Abb 3.6 alle dem TMR zugeschriebenen Ereignisse aus der zuvor beschriebenen Einzelmolekülmessung ausgewählt werden. Alle Photonen dieser Ereignisse können dann dazu verwendet werden, ein gemeinsames Fluoreszenzzerfallshistogramm aufzubauen. Die Addition über die Photonen vieler Einzelmolekülereignisse ermöglicht eine erheblich verbesserte Statistik, die mit Hilfe entsprechender Fitroutinen für τ und r (vgl. Kap. 3.2) eine Anpassung von zwei bis drei Exponenten erlaubt. Folglich lassen sich mit der speziesselktiven Analyse Heterogenitäten innerhalb einer Spezies aufdecken, die ansonsten jenseits der statistischen Auflösung der Einzelmolekülexperimente liegen.

Speziesselktive FCS

Zusätzlich kann aus den selektierten Einzelmolekülereignissen, bzw. deren Photonen, eine gemeinsame Korrelationsfunktion erzeugt werden (Eggeling, 1999), die eine speziesselktive Korrelationsanalyse zuläßt. Dieses Verfahren bietet durch das Aufsummieren über viele Einzelmolekülereignisse die hohe Zeitauflösung der herkömmlichen FCS, ohne daß die Selektivität der Einzelmolekülmessung verloren geht. Aus diesem Grund ist speziesselktive FCS besonders für die Korrelationsauswertungen von FRET-Experimenten geeignet. Bei solchen Proben ist aufgrund der häufig vorhandenen FRET-inaktiven Moleküle (einfach-markierte Moleküle oder freier Fluorophor) eine klassische FCS-Analyse nicht möglich.

Bei der Interpretation einer auf diese Weise kreierten Funktion ist jedoch zu beachten, daß der Diffusionsterm verfälscht ist: Durch die Schwellenkriterien bei der Einzelmolekülanalyse werden die Einzelmolekülereignisse mit einer kurzen Diffusionszeit diskriminiert, so daß das Abklingen der Korrelationsfunktion später beginnt als bei einer entsprechenden Korrelation der „unbehandelten“ Daten. Auf der anderen Seite werden alle Einzelmolekülereignisse durch die Schwelle bei der Einzelmolekülauswertung an den Rändern abgeschnitten. Dadurch wird die Diffusionszeit der selektierten Ereignisse verkürzt. In Summe führen beide Effekte zu einer insgesamt verlängerten Diffusionszeit bei einem steileren Abklingen der Korrelationsfunktion im Vergleich zur einer Korrelationsfunktion, die aus einer „ungeschnittenen“ Datenspur errechnet wird.

3.4 FRET-Berechnung bei Einzelmolekülexperimenten

Um Abstände mit Hilfe von FRET bestimmen zu können, muß zunächst die FRET-Effizienz E_T experimentell ermittelt werden. Dazu können verschiedenste Parameter und Methoden herangezogen werden, die im Einzelnen in der Literatur beschrieben sind (Clegg, 1992; Dale, 1975; Epe, 1983; Jares-Erijman, 1996). Im Rahmen der MFD-Messungen kann E_T nach den Gleichungen 3.17 A und B über das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)}$ des Donorfluorophors in Anwesenheit und τ_D in Abwesenheit des Akzeptors bzw. über das Verhältnis der Donorfluoreszenzintensität F_D zur Akzeptorfluoreszenzintensität F_A bestimmt werden:

$$E_T = 1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D} \quad \text{und} \quad E_T = \left[1 + \frac{F_D}{F_A} \frac{\Phi_{FA}}{\Phi_{FD}} \right]^{-1} \quad \text{Gl. 3.17 A, B}$$

Die FRET-abhängigen Parameter in den Gleichungen 3.17 A und B sind $\tau_{D(A)}$ bzw. F_D/F_A , τ_D sowie die Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_{FD} des Donorfluorophors und Φ_{FA} des Akzeptorfluorophors besitzen den Charakter von Normalisierungsfaktoren.

3.4.1 Bestimmung des Intensitätsverhältnisses F_D/F_A

Um aus den im Experiment gemessenen Intensitäten S_G und S_R die „Netto“-Fluoreszenzintensitäten F_D für den Donorfluorophor und F_A für den Akzeptorfluorophor zu ermitteln, müssen S_G und S_R um den Untergrund korrigiert werden. Außerdem müssen die unterschiedlichen Detektionseffizienzen für die Donor- und Akzeptorfluoreszenz g_G und g_R sowie der spektrale Crosstalk α (Gl. 3.20) berücksichtigt werden:

$$F_D = \frac{S_G - B_G}{g_G} = \frac{F_G}{g_G} \quad \text{mit } F_G = (S_G - B_G) \quad \text{Gl. 3.18}$$

$$F_A = \frac{(S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)}{g_R} = \frac{F_R - \alpha F_G}{g_R} \quad \text{mit } F_R = (S_R - B_R) \quad \text{Gl. 3.19}$$

Die Untergrundzählraten B_G und B_R werden durch nicht vollständig geblockte Raman- und Rayleighstreuung sowie durch die Dunkelzählrate der Detektoren verursacht. Die Werte für B_G und B_R werden aus einer Messung des verwendeten Puffers bestimmt. F_G und F_R entsprechen jeweils dem um den Untergrund korrigierten Signal im grünen und roten Spektralbereich.

Da die langwellige Flanke der Fluoreszenzspektren in aller Regel stark verbreitert ist, trägt ein Teil der Donorfluoreszenz zum Signal S_R der Detektoren für den roten (Akzeptor) Spektralbereich bei. Um die Fluoreszenzintensität F_A des Akzeptors aus dem Signal S_R zu extrahieren, muß daher neben B_R auch der Anteil des durch den Donor verursachten Signals berücksichtigt werden. Dazu wird der spektrale Crosstalk α ermittelt, der dem Quotienten aus der im roten und grünen Spektralbereich detektierten Fluoreszenz des Donorfluorophors entspricht (Vgl. Kap. 3.3.2, Punkt 5):

$$\alpha = \frac{S_{R(Donor)} - B_R}{S_{G(Donor)} - B_G} \quad \text{Gl. 3.20}$$

Die Detektionseffizienzen g_G und g_R hängen von den verwendeten optischen Elementen im Detektionsstrahlengang, den spezifischen Detektionseffizienzen der Detektoren und der Sammeleffizienz des verwendeten Objektivs ab. Die Bestimmung des letzteren ist relativ aufwendig, so daß die absoluten Werte von g_G und g_R schwierig zu ermitteln sind. Zur Berechnung der FRET-Effizienz reicht jedoch die Kenntnis des Quotienten g_R/g_G aus. Unter der Annahme, daß die Sammeleffizienz des Objektivs über den für die Untersuchungen relevanten Wellenlängenbereich konstant ist, kann g_R/g_G aus den Transmissionsspektren der verwendeten Filter und Strahlteiler sowie der Detektionseffizienzen der Detektoren bestimmt werden. Die entsprechenden Werte für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Filter- und Strahlteilerkombinationen sind in Tabelle 3.2 zu finden.

Unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.18 und 3.19, erhält man schließlich für das Verhältnis F_D/F_A :

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{g_R F_G}{g_G F_R} = \frac{g_R}{g_G} \frac{S_G - B_G}{(S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)} \quad \text{Gl. 3.21}$$

Die Standardabweichung σ bei der Bestimmung von F_D/F_A errechnet sich unter Annahme einer Poisson-Verteilung der Meßwerte folgendermaßen:

$$\sigma\left(\frac{F_D}{F_A}\right) = \frac{g_R F_G}{g_G F_R} \left[\left(\frac{1}{F_G} + \frac{\alpha}{F_R} \right)^2 (S_G + B_G) + \left(\frac{1}{F_R} \right)^2 (S_R + B_R) \right]^{1/2} \quad \text{Gl. 3.22}$$

Berücksichtigung der direkten Anregung des Akzeptorfluorophors

Generell wird bei der Auswahl eines Donor-Akzeptor-Paars ein Akzeptor gewählt, beim dem der Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ_D , die zur Anregung des Donors eingesetzt wird, möglichst gering ist. Dennoch ist die direkte Anregung des Akzeptors, die zum Signal S_R beiträgt, nicht in jedem Fall zu vernachlässigen. Bei einer signifikanten direkten Anregung erhält man nach Gl. 3.19 systematisch zu große Werte für F_A , so daß die daraus berechneten FRET-Effizienzen überschätzt werden. Um diesen Fehler zu korrigieren, muß die direkte Anregung DE des Akzeptors experimentell bestimmt werden. Dazu wird der Akzeptorfluorophor mit der Wellenlänge λ_D angeregt und im Rahmen einer FCS-Messung die Zählrate pro Molekül (cpm) im roten Spektralbereich bestimmt, die der direkten Anregung DE entspricht. Für die Berechnung des Fluoreszenzsignals F_A des Akzeptors wird dann Gl. 3.19 folgendermaßen modifiziert:

$$F_A = \frac{(S_R - (B_R + DE)) - \alpha(S_G - B_G)}{g_R} = \frac{F_R - DE - \alpha F_G}{g_R} \quad \text{Gl. 3.23}$$

Auf die Berechnung der Standardabweichung $\sigma(F_D/F_A)$ hat die direkte Anregung keinen Einfluß. Im Rahmen dieser Arbeit mußte die direkte Anregung des Akzeptors beim Donor-Akzeptor-Paar Alexa 488-Alexa 594 berücksichtigt werden. Bei dem ebenfalls verwendeten Donor-Akzeptor-Paar Alexa 488-Cy5 ist die direkte Anregung des Cy5 hingegen zu vernachlässigen ($< 2\%$).

3.4.2 Die simultane Verwendung von F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ zur Bestimmung von E_T

Bisherige FRET-Untersuchungen auf Einzelmolekülebene beschränkten sich im wesentlichen auf die Anwendung des Intensitätsverhältnisses F_D/F_A zur Berechnung von E_T (Ha, 1999), oder es wurde das zur Transfereffizienz äquivalente und ebenfalls auf Intensitätsmessungen beruhende „Proximity Ratio“ (Ying, 2001) verwendet. Die MFD-Technik bietet die Möglichkeit, neben F_D/F_A auch $\tau_{D(A)}$ zur Bestimmung von E_T heranzuziehen. Dabei haben beide Parameter ihre Vor- und Nachteile.

Intensitäten lassen sich einfach messen, und im Gegensatz zur Lebensdaueranalyse, die die Anwendung einer Fitroutine erfordert, ist keine weitere Analyse notwendig. Aus diesem Grund ist die Standardabweichung des Intensitätsverhältnisses F_D/F_A , die nach Gl. 3.22 berechnet werden kann, im Vergleich zur Standardabweichung der Fluoreszenzlebensdauern (Gl. 3.12) gering. Andererseits werden bei der Berechnung der FRET-Effizienz über F_D/F_A verschiedenste „Kalibrationsfaktoren“ (g_G , g_R , Φ_{FA} und Φ_{FD}) benötigt, deren genaue Bestimmung z. T. Schwierigkeiten bereitet. Dies kann leicht zu systematischen Fehlern führen. Im Vergleich dazu ist bei der Verwendung des Fluoreszenzlebensdauerhältnisses die statistische Ungenauigkeit ($\sigma(\tau)$) zwar groß, da für die Lebensdaueranpassung bei Einzelmolekülereignissen nur eine begrenzte Zahl an detektierten Photonen zur Verfügung steht. Die Gefahr von systematischen Fehlern ist hingegen gering, weil keine zusätzlichen Kalibrationsfaktoren benötigt werden.

Da im MFD-Experiment für jedes Einzelmolekülereignis sowohl F_D/F_A als auch $\tau_{D(A)}$ ermittelt wird, liegt es nahe, beide FRET-abhängigen Parameter in einem zweidimensionalen Häufigkeitshistogramm zu verwenden, um dadurch die Stärken beider zu verbinden. Die Eigenschaften eines solchen Histogramms sollen anhand der Abbildungen 3.7 A und 3.7 B diskutiert werden.

Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse zweier Einzelmolekül-FRET-Messungen von markierten DNA-Duplexen mit unterschiedlichen Abständen zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor (Alexa 488 und Alexa 594). Die Ergebnisse, die in Abb. 3.7 A dargestellt sind, resultieren aus einer Messung eines Duplexes mit 15 Basenpaaren Abstand zwischen Donor und Akzeptor ($\Delta_{bp} = 15$), während Abb. 3.7 B die Ergebnisse für einen Duplex mit neun Basenpaaren Abstand ($\Delta_{bp} = 9$) zeigt. Die Häufigkeit in den zweidimensionalen Histogrammen ist farbkodiert und nimmt von blau nach rot zu.

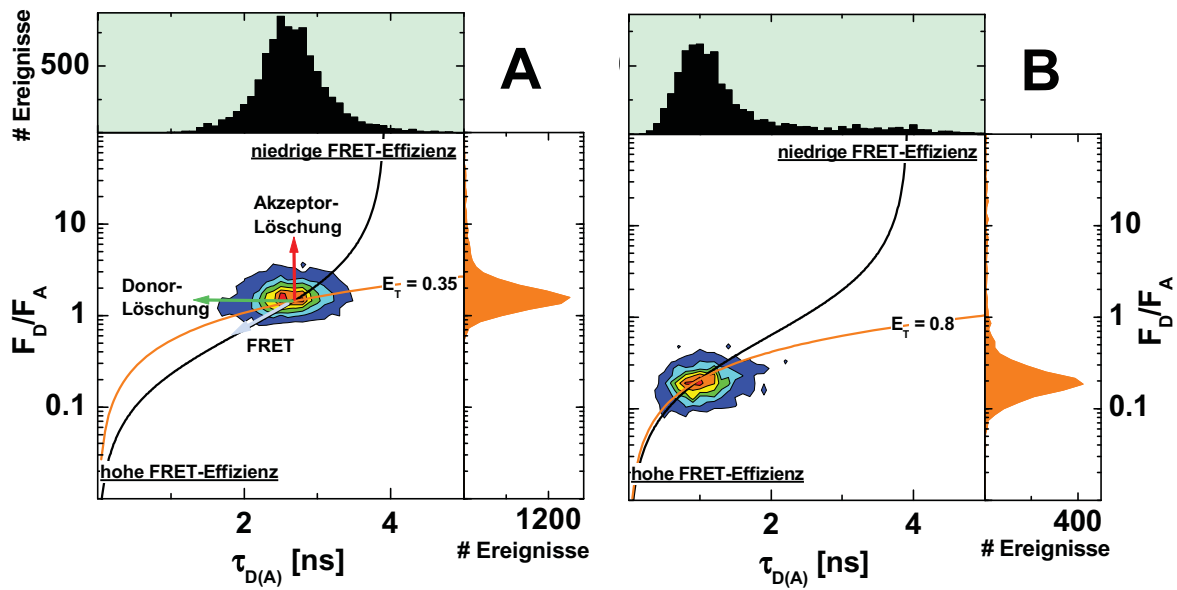


Abb. 3.7: Zweidimensionale Häufigkeitsdiagramme der Parameter F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$. Für ein DNA-Duplex mit einem Abstand zwischen Donor und Akzeptor von A) 15 Basenpaaren und B) von 9 Basenpaaren. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die schwarze sigmoide Kurve spiegelt den theoretischen Zusammenhang zwischen $\tau_{D(A)}$ und F_D/F_A wider, der sich aus den Gleichungen 3.17 A und B ergibt und wie folgt lautet:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{\Phi_{FD}}{\Phi_{FA}} \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D - \tau_{D(A)}} \quad \text{Gl. 3.24}$$

Die orangen Linien sind Linien mit konstanter Effizienz (Iso-Effizienz-Linien), die sich folgendermaßen berechnen lassen:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{\tau_{D(A)}}{E_T} \frac{k_F}{\Phi_{FA}} \quad \text{Gl. 3.25}$$

Die FRET-Effizienz E_T einer Spezies ergibt sich aus dem Schnittpunkt der entsprechenden Iso-Effizienz-Linie mit der sigmoiden Linie. Demnach beträgt die FRET-Effizienz für den Duplex mit 15 Basenpaaren Abstand zwischen Donor und Akzeptor $E_T = 0.35$ und für den Duplex mit neun Basenpaaren Abstand $E_T = 0.8$. Durch FRET verringert sich das Intensitätsverhältnis F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ wird kürzer. Bei zunehmender FRET-Effizienz E_T , also abnehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, verschieben sich die Populationen im zweidimensionalen Histogramm daher entlang der sigmoiden schwarzen Linie von rechts

oben nach links unten. Systematische Abweichungen von dieser Kurve deuten darauf hin, daß einer der Kalibrationsfaktoren nicht richtig bestimmt wurde. Dagegen zeigen Abweichungen von der sigmoiden Kurve in Form einer Verbreiterung der Verteilung in vertikaler oder horizontaler Richtung Schwankungen in den Quantenausbeuten der Farbstoffe an.

Gl 3.27 zeigt, daß das Verhältnis F_D/F_A von Φ_{FA} aber nicht von Φ_{FD} abhängt. Bei Änderungen der Donorquantenausbeute ändert sich der Wert von F_D/F_A daher nicht. Dagegen ist $\tau_{D(A)}$ unabhängig von Φ_{FA} , (vgl. Gl. 2.3) und wird von den Fluoreszenzeigenschaften des Akzeptors nicht beeinflusst, so daß hier Änderungen der Akzeptorquantenausbeute keinen Effekt haben. Insgesamt führen daher Fluktuationen in Φ_{FA} zu einer Verbreiterung der Verteilungen im $(\tau_{D(A)}, F_D/F_A)$ -Histogramm in vertikaler Richtung, während sich Schwankungen in Φ_{FD} in einer horizontalen Verbreiterung äußern.

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{R_{DA}^6 \Phi_{FD}}{R_0^6 \Phi_{FA}} \quad \text{mit } R_0^6 = J \kappa^2 \Phi_{FD} n^{-4} \quad \text{Gl. 3.26}$$

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{R_{DA}^6}{J \kappa^2 n^{-4} \Phi_{FA}} \quad \text{Gl. 3.27}$$

Fluktuationen des Abstandes R_{DA} bzw. der FRET-Effizienz E_T wirken sich dagegen sowohl auf $\tau_{D(A)}$ als auch auf F_D/F_A aus und führen folglich zu einer Verbreiterung der Verteilungen entlang der sigmoiden Linie. Somit können anhand der zweidimensionalen $(\tau_{D(A)}, F_D/F_A)$ -Histogramme Effekte, die durch die Eigenschaften der Fluorophore hervorgerufen werden, eindeutig von FRET-Effekten unterschieden werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die simultane Verwendung der FRET-abhängigen Parameter $\tau_{D(A)}$ und F_D/F_A die Gefahr von systematischen Fehlern verringert. Weiterhin können Fluorophoreffekte, wie Schwankungen in den Quantenausbeuten der Farbstoffe, die leicht zu Fehldeutungen von FRET-Messungen führen, eindeutig von FRET- bzw. Abstandsfluktuationen unterschieden werden.

3.4.3 Ein neuer Weg zur direkten Berechnung von R_{DA}

Bei der klassischen Ermittlung von R_{DA} aus FRET-Messungen wird zunächst aus den experimentell bestimmten Parametern die FRET-Effizienz E_T berechnet und anschließend mit Hilfe der Gleichung 2.13 der Abstand R_{DA} ermittelt. Gleichung 3.26 bzw. 3.27 eröffnet einen direkten Weg zur Berechnung von R_{DA} , ohne den Umweg über E_T . Dazu werden die Konstanten in Gl. 3.27 zum „reduzierten“ Försterradius R_{0r} zusammengefaßt:

$$R_{0r} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\Phi_{FD}}} = 9780(J(\lambda)\kappa^2 n_D^{-4})^{1/6} \quad \text{Gl. 3.28}$$

so daß man für R_{DA} folgende Gleichung erhält:

$$R_{DA} = R_{0r} \left[\frac{F_D}{F_A} \Phi_{FA} \right]^{1/6} \quad \text{Gl. 3.29}$$

Im Gegensatz zur klassischen Methode kann mit Hilfe von Gl. 3.29 der Abstand R_{DA} ohne die Kenntnis der Donorquantenausbeute Φ_{FD} , die eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt, berechnet werden. In Tabelle 3.3 sind die reduzierten Försterradien der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Donor-Akzeptor-Paare sowie die zur Berechnung verwendeten Parameter angegeben.

Tabelle 3.3: Reduzierte Försterradien der verwendeten Donor-Akzeptor-Paare

Donor/Akzeptor	$J [10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3]$	κ^2	n	$R_{0r} [\text{Å}]$
Alexa 488/Cy5	1.29	2/3	1.33	53
Alexa 488/Alexa 594	2.29	2/3	1.33	59

Um die Ergebnisse aus den Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen anschaulicher darzustellen, wird im Folgenden der Parameter F_D/F_A in den entsprechenden Häufigkeitshistogrammen meist durch den nach Gl. 3.29 bestimmten Abstand R_{DA} ersetzt. Dabei bleiben alle diskutierten Eigenschaften des $(\tau_{D(A)}, F_D/F_A)$ -Häufigkeitshistogramms erhalten. Durch den Austausch des Parameters F_D/F_A gegen R_{DA} in den Abbildungen 3.7 A und B ergeben sich die folgenden $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme:

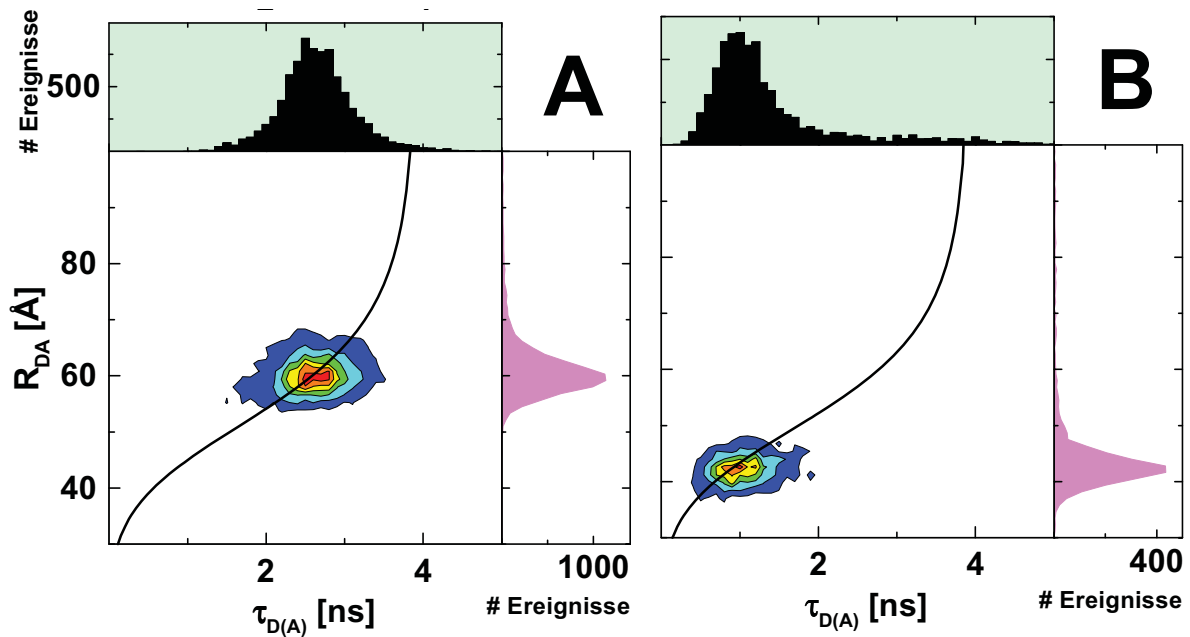


Abb. 3.8: Die Abbildungen A und B entsprechen im wesentlichen den Abbildungen 3.7 A und B, lediglich die Achse F_D/F_A wurde nach Gl. 3.29 in den Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor (R_{DA}) umgerechnet. Für R_{0r} ergibt sich für die hier verwendeten Fluorophore ein Wert von 59 \AA (mit $\kappa^2 = 2/3$). Die Berechnung von R_{DA} gilt für ein konstantes Φ_{FA} von 0.7.

Bei der Umrechnung von F_D/F_A in R_{DA} nach Gl. 3.29 wird vorausgesetzt, daß die Quantenausbeute Φ_{FA} des Akzeptorfluorophors konstant ist. Der theoretische Zusammenhang zwischen R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ berechnet sich nach:

$$R_{DA} = R_{0r} \left(\frac{k_F \tau_{D(A)}}{1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D}} \right)^{1/6} \quad \text{Gl. 3.30}$$

Diese Beziehung ist in den $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogrammen analog zu den entsprechenden $(\tau_{D(A)}, F_D/F_A)$ -Histogrammen dargestellt und äußert sich in Form einer sigmoiden Linie.

Nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung läßt sich aus der Standardabweichung von F_D/F_A (Gl. 3.22) die entsprechende Standardabweichung für R_{DA} berechnen:

$$\sigma(R_{DA}) = \frac{1}{6} R_{DA} \left[\left(\frac{1}{F_G} + \frac{\alpha}{F_R} \right)^2 (S_G + B_G) + \left(\frac{1}{F_R} \right)^2 (S_R + B_R) \right]^{1/2} \quad \text{Gl. 3.31}$$

(Bei der Herleitung der Gl. 3.31 (Schaffer, 2000) wurde bei einem Schritt die vereinfachende Näherung ($F_A = F_R/g_R$) angewendet. Diese Näherung führt bei besonders kleinen FRET-Effizienzen zu Fehlern bei der Berechnung von $\sigma(R_{DA})$)

3.4.4 Die Bestimmung der Fluorophorbeweglichkeit

Für die Bestimmung von R_0 bzw. $R_{0,r}$ ist die Kenntnis des Orientierungsfaktors κ^2 von entscheidender Bedeutung (vgl. Kap. 2.3). Der Orientierungsfaktor ist direkt mit der Beweglichkeit der Fluorophore verknüpft, die sich wiederum aus der Anisotropie ableiten läßt. Im Rahmen der MFD-Analyse wird die Anisotropie für jedes Einzelmolekülereignis bestimmt, so daß selbst eventuelle Subpopulationen auf Orientierungseffekte hin untersucht werden können. Damit ist die MFD-Technik zur Zeit die einzige Methode, mit der gleichzeitig FRET und die Anisotropie der Fluorophore auf Einzelmolekülniveau erfaßt werden. Damit gewährleistet die Einzelmolekül-MFD-Technik eine verlässlichere Abstandsbestimmung aus den Meßdaten als andere Methoden.

Die Anisotropie hängt neben der Beweglichkeit der Fluorophore noch von τ ab, während die Rotationskorrelationszeit ρ ein direktes Maß für die Beweglichkeit darstellt. r und ρ sind über die Perrin-Gleichung (Gl. 2.7) miteinander verknüpft. In einem zweidimensionalen (τ ; r)-Häufigkeitshistogramm läßt sich ρ und damit die Beweglichkeit des Fluorophors anhand von Kurven, die auf der Grundlage der Perringleichung berechnet werden, abschätzen:

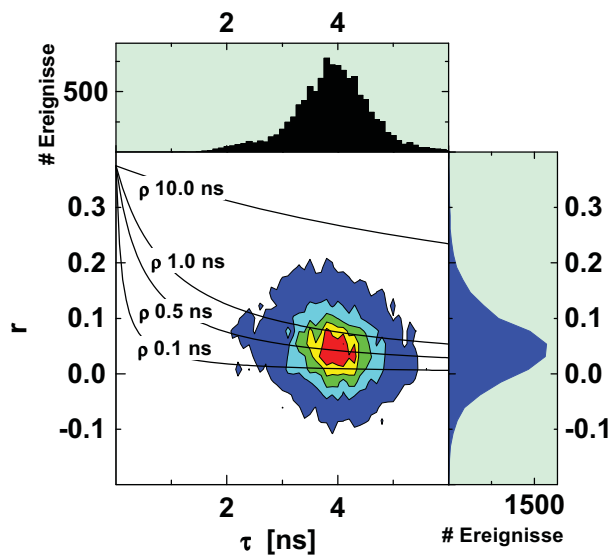


Abb. 3.9: Zweidimensionales Häufigkeits-histogramm r gegen τ mit ρ - Kurven, die auf Grundlage der Perrin-Gleichung berechnet werden ($r_0 = 0.375$). Anhand der Kurven läßt sich für das vorliegende Molekül (DNA markiert mit Alexa 488) eine Rotationskorrelationszeit von 0.5 ns abschätzen.

Dabei ist zu beachten, daß nach dem oben beschriebenen Verfahren ein mittleres r bzw. ρ ermittelt wird. Für einen Farbstoff, der kovalent an ein Biomolekül gebunden ist, setzt sich der Anisotropiezerfall jedoch im allgemeinen aus mehreren Bewegungsmoden zusammen: i) lokale Bewegung des Fluorophors und ii) globale Bewegung des Biomoleküls, die ihrerseits aus verschiedenen Bewegungsmoden zusammengesetzt sein können. In Bezug auf κ^2 ist nur die lokale Beweglichkeit von Bedeutung, da sich bei der globalen Bewegung des Biomoleküls die Position des Donorfluorophors relativ zum Akzeptorfluorophor nicht ändert (vgl. Kap. 4, DNA-Strukturanalyse). Für eine präzise Aussage über die lokale Beweglichkeit ist eine speziesspezifische Auswertung mit einer mehr-exponentiellen Anisotropieanpassung erforderlich.

3.4.5 Die Bedeutung des Shot-noise für die Einzelmolekülspektroskopie

Die Standardabweichungen, die nach den Gleichungen 3.22 und 3.31 für F_D/F_A bzw. R_{DA} berechnet werden, bedeuten für die Einzelmolekülspektroskopie mehr als nur eine Abschätzung des Meßfehlers, sie sind entscheidend für die Interpretation der Einzelmolekülmessungen. Mit Hilfe der Standardabweichung läßt sich eine Gaußverteilung berechnen die als Shot-noise Sh_{F_D/F_A} bezeichnet wird. Für das Intensitätsverhältnis berechnet sich der Shot-noise Sh_{F_D/F_A} nach:

$$Sh_{F_D/F_A} = \frac{N}{\sigma\left(\frac{F_D}{F_A}\right)\sqrt{2\pi}} e^{-0.5\left(\frac{F_D}{F_A} - \overline{\frac{F_D}{F_A}}\right)^2 / \sigma\left(\frac{F_D}{F_A}\right)^2} \quad \text{Gl. 3.32}$$

und der Shot-noise für den Abstand $Sh_{R_{DA}}$:

$$Sh_{R_{DA}} = \frac{N}{\sigma(R_{DA})\sqrt{2\pi}} e^{-0.5\frac{(R_{DA} - \overline{R_{DA}})^2}{\sigma(R_{DA})^2}} \quad \text{Gl. 3.33}$$

N entspricht hier einem Normierungsfaktor, der das Maximum von Sh dem Maximum der Meßwerte angleicht. $\overline{\frac{F_D}{F_A}}$ und $\overline{R_{DA}}$ sind die jeweiligen Mittelwerte der Gaußverteilungen.

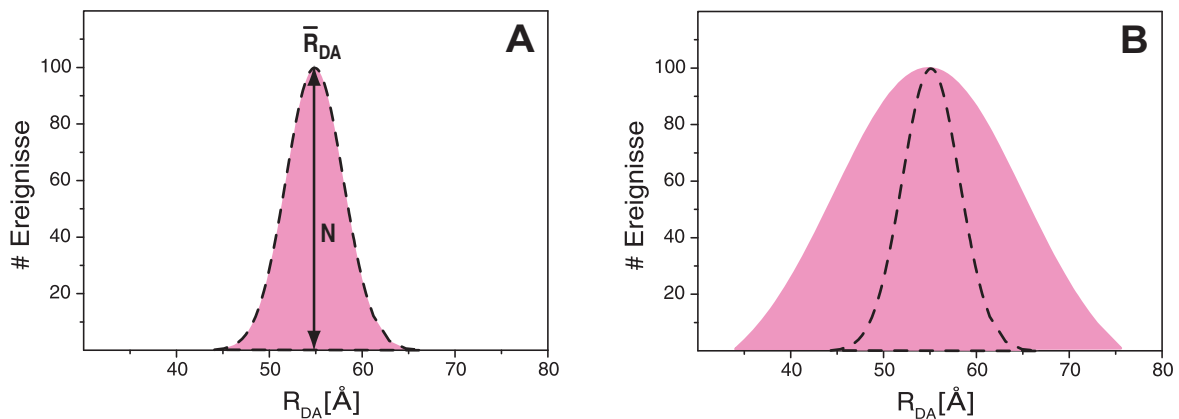


Abb. 3.10: Erklärung des Shot-noise. Hypothetische Messung einer Probe mit A) konstantem Abstand zwischen Donor und Akzeptor und B) heterogener Abstandsverteilung. Der nach Gl. 3.33 berechnete Shot-noise ist in den Abbildungen als gestrichelte Linie dargestellt. N repräsentiert den Normierungsfaktor in Gl. 3.33.

Der Shot-noise entspricht der Meßwertverteilung, die für einen konstanten Abstand zwischen Donor und Akzeptor erwartet wird.

Jede gemessene Verteilung, die breiter ist als der berechnete Shot-noise, deutet auf eine heterogene Abstandsverteilung hin, so daß dynamische Abstandsfluktuationen, deren Kinetik schneller ist als die Diffusionszeit der Moleküle durch das Detektionsvolumen, erkannt werden können (vgl. Abb. 3.10). Um die Interpretation der gemessenen Verteilungen zu erleichtern, wird der Shot-noise im Rahmen dieser Arbeit üblicherweise in die entsprechenden eindimensionalen Histogramme eingezeichnet.

3.5 Analyse von dynamischen Gleichgewichtsreaktionen auf Einzelmolekülebene

In den vorhergehenden Kapiteln wurde erläutert, wie sich molekulare Kinetiken, die zu Abstandsfluktuationen zwischen Donor und Akzeptor führen, im Einzelmolekülexperiment erkennen lassen. Im Folgenden zwei Techniken für die Analyse von dynamischen Gleichgewichten auf Einzelmolekülebene vorgestellt. Dabei werden zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze verfolgt: Bei der Zeitfensteranalyse wird jedes Einzelmolekülereignis in kleinere Intervalle aufgeteilt und diese analysiert. Mit Hilfe dieser Technik können verschiedene Zustände innerhalb eines Einzelmolekülereignisses direkt sichtbar gemacht werden, jedoch ist die zeitliche Auflösung auf den nahen Submillisekunden Bereich beschränkt. Bei der sehr viel abstrakteren speziesspezifischen FCS werden die Photonen von vielen Ereignissen gemeinsam analysiert, so daß eine hohe zeitliche Auflösung erreicht wird und die Möglichkeit zur quantitativen Analyse von molekularen Dynamiken gegeben ist.

3.5.1 Zeitauflösung im Einzelmolekülexperiment

Bei dem bisher vorgestellten Analyseverfahren werden alle Photonen eines Einzelmolekülereignisses gemeinsam zur Bestimmung der verschiedenen Parameter herangezogen, so daß die Parameter über die Durchtrittsdauer gemittelt werden. Dieses Verfahren der „burstweisen“ Auswertung hat zur Folge, daß die Zeitauflösung von der Diffusionszeit der Moleküle durch das Detektionsvolumen vorgegeben wird.

Um die Auswirkung dieser Mittelung zu verdeutlichen, soll folgendes Szenario betrachtet werden: Man mißt eine Probe, bei der ein Molekül zwischen zwei Zuständen A und B hin- und herpendelt, welche sich im Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor unterscheiden:

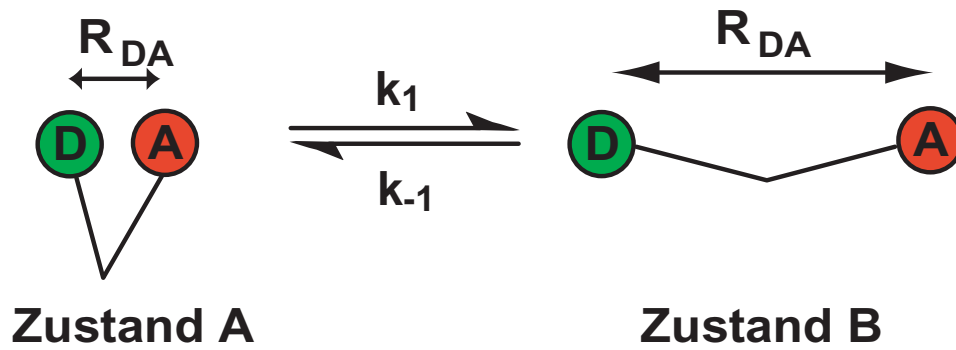


Abb. 3.11: Hypothetisches Modell eines Moleküls, das zwischen den Zuständen A und B hin- und herpendelt. Die beiden Zustände unterscheiden sich im Abstand zwischen Donor (D) und Akzeptor (A).

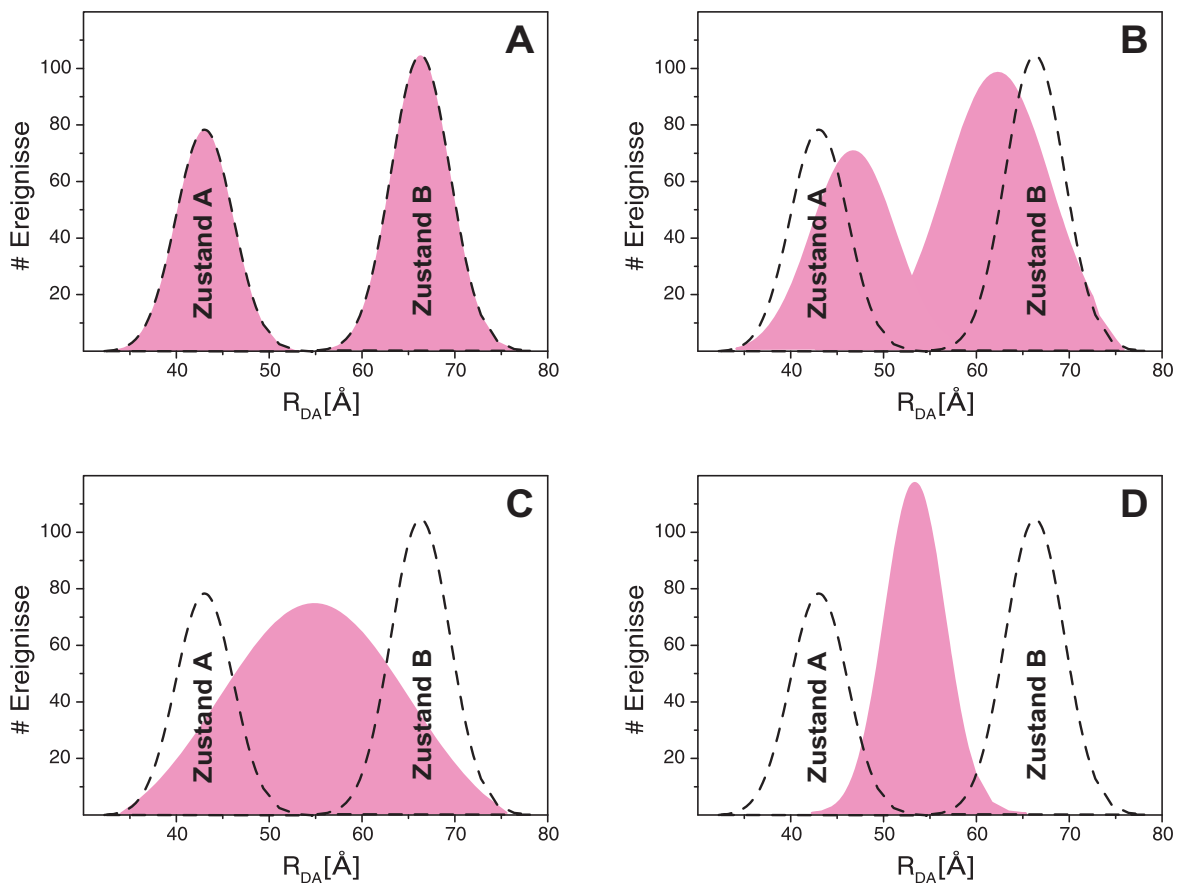


Abb. 3.12: Hypothetische Meßergebnisse für das Molekül in Abb. 3.11 mit von A nach D zunehmenden Umwandlungsgeschwindigkeiten. Die gestrichelten Linien zeigen die realen Abstandsverteilungen für den Zustand A und B an, während die graue Fläche die entsprechende gemessene Verteilung nach der "burstweisen" Analyse anzeigt. A) Die Umwandlungsgeschwindigkeit ist sehr viel langsamer als die Diffusionszeit durch den Fokus. B) und C) die Umwandlungsgeschwindigkeit liegt im Bereich der Diffusionszeit (für B > C). D) zeigt den Fall einer im Vergleich zur Diffusionszeit sehr viel schnelleren Umwandlungsgeschwindigkeit zwischen den Zuständen A und B.

Ist die Kinetik viel langsamer als die Diffusionszeit durch das Detektionsvolumen, werden die Moleküle während des Durchtritts ihren Zustand in aller Regel beibehalten. Als Ergebnis einer solchen Messung wird man zwei diskrete Verteilungen erhalten (Abb. 3.12 A).

Liegt die Kinetik hingegen im Bereich der Diffusionszeit, wird das Molekül bei manchen Durchtritten von Zustand A nach Zustand B wechseln, so daß ein Mittelwert zwischen beiden Zuständen gemessen wird. Für die Messung hat dies zur Folge, daß beide Verteilungen breiter werden und die Schwerpunkte der Verteilungen sich aufeinander zu bewegen. Je nachdem, wie schnell die Kinetik im Vergleich zur Diffusionszeit ist, lassen sich beide Zustände noch unterscheiden oder man erhält eine breite Verteilung (Abb. 3.12 B+C).

Bei einer Kinetik, die sehr viel schneller ist als die Diffusionszeit, so daß der Wechsel zwischen Zustand A und Zustand B viele Male während des Durchtritts stattfindet, wird ein relativ scharf definierter Mittelwert gemessen. Man erhält folglich eine schmale Verteilung der Meßwerte um den mittleren Abstand (Abb. 3.12 D).

3.5.2 Zeitfensteranalyse (Intra-Burst-Analyse)

Um die Zeitauflösung zu verbessern und unabhängig von der Diffusionszeit zu gestalten, wurde in unserer Gruppe eine Analysetechnik entwickelt, bei der die Einzelmoleküldurchtritte in kleinere Intervalle unterteilt werden. Dabei wurden zunächst Intervalle mit konstanter Photonenzahl (Photonenfenster) verwendet (Schaffer, 2000). Diese Methode der Intervallbildung hat jedoch den Nachteil, daß die zeitliche Länge der Intervalle von der Fluoreszenzintensität abhängt. Bei großen Intensitäten sind die Intervalle zeitlich kürzer als bei niedrigen Intensitäten, so daß Subzustände zwar identifiziert, aber Kinetiken aufgrund der fehlenden Zeitinformation nicht aufgeklärt werden können.

Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, die Einzelmoleküldurchtritte in zeitgleiche Intervalle zu unterteilen. Abb. 3.13 verdeutlicht das Vorgehen: Gezeigt ist der Durchtritt eines Moleküls, das während der Diffusion durch das Detektionsvolumen von Zustand B (vgl. Abb. 3.11) in den Zustand A übergeht. Eine Standardanalyse ("burstweise" Analyse), bei der alle Photonen des Ereignisses gemeinsam zur Auswertung herangezogen werden, liefert in diesem Fall den Mittelwert aus beiden Zuständen. Wird das Ereignis jedoch in Zeitfenster von 1 ms unterteilt, können die beiden Zustände in vier der fünf Fenster eindeutig identifiziert werden.

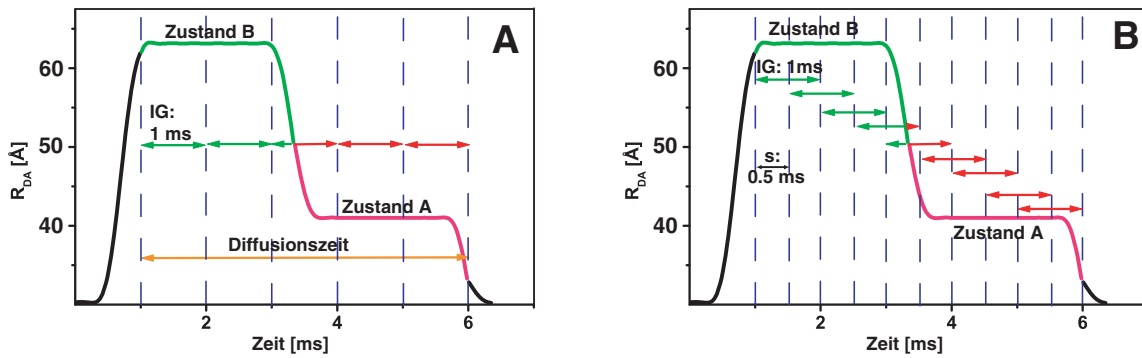


Abb. 3.13: Erläuterung der Zeitfensteranalyse. Gezeigt ist die Änderung des Abstands zwischen Donor und Akzeptor während eines Einzelmoleküldurchtritts durch das Detektionsvolumen in Abhängigkeit von der Zeit. Das Molekül wechselt seinen Zustand während des Durchtritts von B nach A, so daß bei der "burstweisen" Analyse der Mittelwert zwischen beiden Zuständen ermittelt wird. A) zeigt eine schrittweise Zeitfensteranalyse mit einer Intervallgröße $IG = 1 \text{ ms}$. Daraus resultieren je zwei Zeitfenster für die Zustände A und B sowie ein Zeitfenster, daß beide Zustände beinhaltet. B) zeigt eine gleitende Zeitfensteranalyse mit $IG = 1 \text{ ms}$ und einer Schrittweite s von 0.5 ms .

Wird eine solche Analyse schließlich für mehrere Intervallgrößen IG durchgeführt und die resultierenden Verteilungen analysiert, können Aussagen über die Umwandlungsgeschwindigkeit zwischen beiden Zuständen gewonnen werden (vgl. Kap.5.8.1).

Die Zeitauflösung, die nach dieser Methode erreicht werden kann, ist von der Anzahl der detektierten Photonen pro Zeit abhängig, welche wiederum von der Anregungsintensität der Quantenausbeuten der Farbstoffe sowie den Detektionseffizienzen beeinflusst wird. Im allgemeinen liegt die kleinstmögliche Zeitfenstergröße bei $IG = 0.25\text{-}0.5 \text{ ms}$ für Intensitätsauswertungen. Da für die Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropieauswertungen aus statistischen Gründen eine Mindestphotonenzahl von 20 erforderlich ist, bleibt die Zeitfensteranalyse zumeist auf die Intensitätsauswertung beschränkt.

Gleitende Zeitfensteranalyse

Eine Variante der Zeitfensteranalyse ist die gleitende Analyse. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Methode überlappen die Zeitfenster hier. Das heißt, man unterscheidet hier zwischen Fenstergröße und Schrittweite. Das Beispiel einer gleitenden Analyse ist in Abb. 3.13 B illustriert. Die Fenstergröße beträgt für dieses Beispiel $IG = 1 \text{ ms}$ und die Schrittweite $s = 0.5 \text{ ms}$.

Die gleitende Analyse erhöht die Statistik um das Inverse der Schrittweite im Vergleich zur oben beschriebenen schrittweisen Zeitfensteranalyse. Besonders geeignet ist die gleitende Analyse bei der Visualisierung von Parameterspuren während eines Durchtritts (vgl. Abb 6.11). Dabei ist jedoch zu beachten, daß der diskrete Wechsel von einem Zustand in den anderen durch die gleitende Analyse, je nach Schrittweite und Zeitfenstergröße, in scheinbar kontinuierliche Übergänge umgewandelt wird.

3.5.3 Die Korrelationsanalyse

Die Zeitfensteranalyse läßt in der Regel nur eine qualitative Aussage über die Zeitkonstanten der Kinetiken zu. Um quantitative Aussagen über die dynamischen Prozesse zu gewinnen, ist eine Korrelationsanalyse der Daten notwendig. In den FRET-Proben sind häufig neben den FRET-aktiven auch viele FRET-inaktive Moleküle vorhanden, die Korrelationsauswertungen stark beeinträchtigen. Aus diesem Grund werden zunächst die Photonen der FRET-aktiven Moleküle selektiert und daraus die Korrelationsfunktionen erzeugt (vgl. Kap. 3.3.5). Für die Analyse von FRET-Fluktuationen werden dazu drei verschiedene Korrelationsfunktionen berechnet:

Autokorrelationsfunktion des Donorsignals ($G(t_C)_{DD}$)

Autokorrelationsfunktion des Akzeptorsignals ($G(t_C)_{AA}$)

Kreuzkorrelationsfunktion zwischen Donor- und Akzeptorsignal ($G(t_C)_{KK}$)

Bei den Korrelationsfunktionen $G(t_C)_{DD}$ und $G(t_C)_{AA}$ handelt es sich nicht um Autokorrelationsfunktionen im eigentlichen Sinne. Um die Totzeit der Detektoren zu umgehen, werden die Signale S_P und S_S im grünen (Donor) bzw. roten (Akzeptor) Spektralbereich miteinander korreliert, so daß $G(t_C)_{DD}$ und $G(t_C)_{AA}$ im Grunde genommen auch Kreuzkorrelationsfunktionen sind. Die Kreuzkorrelationsfunktion des Donor- und Akzeptorsignals $G(t_C)_{KK}$ ist das arithmetische Mittel aus den Korrelationsfunktionen $G(t_C)_{AD}$ und $G(t_C)_{DA}$.

Eine FRET-Dynamik hat unterschiedliche Auswirkungen auf die drei Korrelationsfunktionen:

Für das Donorsignal haben konformationsbedingte dynamische Änderungen des Abstands zwischen Donor und Akzeptor Schwankungen in der Signalintensität zur Folge. Diese Fluktuationen sind korreliert und machen sich in der Autokorrelationsfunktion des Donors

durch das Auftreten eines zusätzlichen "Bunchingterms" bemerkbar. Entsprechendes gilt für die Autokorrelationsfunktion des Akzeptorsignals.

Bei der Kreuzkorrelation zwischen Donor- und Akzeptorsignal wird das Verhalten des Donorsignals in Beziehung zum Akzeptorsignal und umgekehrt betrachtet. Allgemein führt eine Zunahme der FRET-Effizienz zu einer Verringerung des Donorsignals bei gleichzeitigem Anstieg des Akzeptorsignals. Daher ist das Verhalten bei einer zeitlichen Änderung des FRET-Signals antikorreliert. Eine Antikorrelation macht sich durch einen Anstieg der Korrelationsfunktion bemerkbar. Die Diffusion ist dagegen wie bei den Autokorrelationen auch im Fall der Kreuzkorrelation korreliert, da in diesem Fall Donor- und Akzeptorsignal gleichermaßen ab- bzw. zunehmen, und führt daher zu einem Abklingen der Korrelationsfunktion.

Die Dynamiken, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, bewegten sich zumeist im Zeitbereich der Diffusionszeit der Moleküle durch das Detektionsvolumen. Für diesen speziellen Fall macht sich die FRET-Dynamik durch folgende phänomenologische Effekte bemerkbar: Die Autokorrelationsfunktionen zeigen durch den zusätzlichen "Bunchingterm" der FRET-Dynamik eine scheinbar verkürzte Diffusionszeit, während die Antikorrelation bei der Kreuzkorrelationsfunktion eine scheinbar verlängerte Diffusionszeit zur Folge hat. Daher zeigt sich beim Vergleich der Korrelationsfunktionen für die Auto- und Kreuzkorrelation ein signifikanter Unterschied im Bereich der Diffusionszeit. Eine Probe ohne jegliche Veränderungen in der FRET-Effizienz zeigt für alle drei Korrelationsfunktionen ($G(t_c)_{DD}$, $G(t_c)_{AA}$ und $G(t_c)_{KK}$) im Diffusionsbereich ein identisches Abklingverhalten.

Chromatischer Effekt bei der Kreuzkorrelation

An dieser Stelle soll ein Artefakt angesprochen werden, das zu einer scheinbaren Antikorrelation führt, und durch die wellenlängenabhängigen Abbildungseigenschaften des verwendeten Objektivs ausgelöst wird (chromatischer Effekt): Wird der Verlauf der Detektionseffizienz als Funktion des Ortes im Fokus des Objektivs betrachtet, ergibt sich im Idealfall ein Gaußprofil. Die Form dieses Profils hängt von der Wellenlänge ab. Je kurzwelliger das detektierte Licht ist, desto schmaler ist das Gaußprofil. Bezogen auf die hier besprochenen FRET-Messungen hat das eine schmale Gaußverteilung für die Donorfluoreszenz und eine breitere für die Akzeptorfluoreszenz zur Folge:

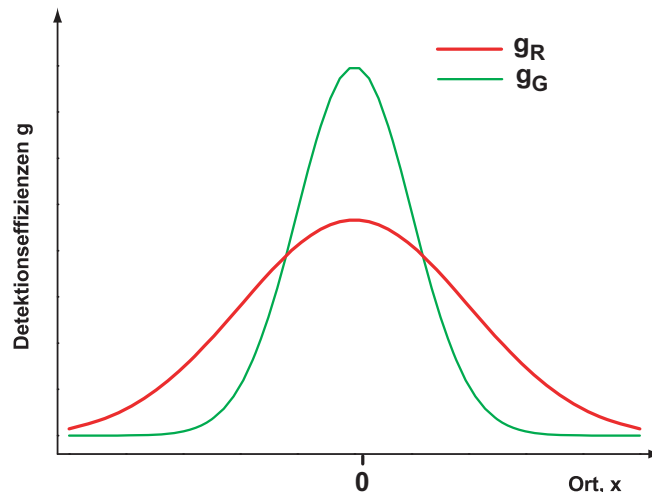


Abb. 3.14: Detektionseffizienz für die Donor- und die Akzeptorfluoreszenz (g_G und g_R) als Funktion des Ortes im Fokus zur Erklärung des chromatischen Effekts bei der Kreuzkorrelation. 0 ist der Mittelpunkt des Detektionsvolumens. Bei einer realen Messung ist zu beachten, daß die dargestellten Detektionsprofile für alle drei Raumrichtungen gelten.

Diffundiert ein Molekül von links nach rechts durch das Detektionsvolumen, ohne daß sich die FRET-Effizienz ändert, nimmt das Verhältnis F_D/F_A zunächst bis zum Mittelpunkt des Detektionsvolumens zu und anschließend wieder ab. Dieses Verhalten führt bei der oben beschriebenen Kreuzkorrelation ebenfalls zu einer Antikorrelation, deren Relaxationszeit im wesentlichen von der Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle abhängt.

Die Bestimmung der Relaxationszeit der Konformationsdynamik

Mit Hilfe einer Anpassung eines entsprechenden Modells an die Korrelationsfunktionen kann die Relaxationszeit von FRET-Fluktuationen t_{FRET} , hervorgerufen durch eine entsprechende Konformationsdynamik, bestimmt werden. t_{FRET} ist mit den Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion k_1 und k_{-1} (s. Modell in Abb. 3.11) in der folgenden Weise verknüpft:

$$t_{FRET} = (k_1 + k_{-1})^{-1} \quad \text{Gl. 3.34}$$

Liegt die FRET-Dynamik im Bereich der Diffusionszeit, kann t_{FRET} nur mit Hilfe einer globalen Anpassung aller drei Korrelationsfunktionen ($G(t_C)_{DD}$, $G(t_C)_{AA}$ und $G(t_C)_{KK}$) aus einer Messung bestimmt werden. Alternativ kann die Diffusionszeit t_D separat aus einem zweiten Experiment bestimmt wird. Dazu wird eine Messung durchgeführt, bei der keine FRET-Fluktuationen auftreten. Dazu stehen verschiedene Wege zur Verfügung; am besten

geeignet ist eine Referenzprobe, bei der die Markierungspositionen für Donor und Akzeptor am entsprechenden Molekül so gewählt werden, daß konformationelle Veränderungen keine Auswirkungen auf den Abstand zwischen den Fluorophoren haben. Bei diesem Verfahren wird gleichzeitig der chromatische Effekt, der auch bei der Referenzprobe auftritt, mit berücksichtigt. Für die Anpassung an die Kreuzkorrelationsfunktionen wird die folgende Modellfunktion (J. Widengren, persönliche Mitteilung) verwendet:

$$G(t_c) = \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1+t_c/t_d} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0) \cdot t_d}\right)}} \right) \left(1 - T_{eq} + T_{eq} e^{-t_c/t_T} \right) \left(1 - A_{FRET} + A_{FRET} e^{-t_c/t_{FRET}} \right)$$

Gl. 3.35

Hier ist t_D die Diffusionszeit, t_T die charakteristische Tripletzerfallszeit und T_{eq} die relative Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustands. A_{FRET} ist die Amplitude für die FRET-Dynamik und z_0 und ω_0 sind die 1/e - Radien in axialer und radialer Richtung.

3.6 Die Korrektur der Fluoreszenzlebensdauern

In Kap. 2.1 wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Fluoreszenzlebensdauer τ sehr stark von dem Milieu abhängt in dem sich der Fluorophor befindet. Erfährt der Fluorophor in einem Experiment zwei unterschiedliche Umgebungen, kann dies zu zwei unterschiedlichen Lebensdauerspezies und damit zu einem biexponentiellen Abklingverhalten führen. Wechselt der Fluorophor in einem Einzelmolekülexperiment die Umgebung während er durch das Detektionsvolumen diffundiert, kann nur eine mittlere fluoreszenzgewichtete Lebensdauer τ_{av}^{mono} bestimmt werden, die weitestgehend τ_{av}^A entspricht (Vgl. 3.2.3). In einem Einzelmolekül-FRET-Experiment führt dies dazu, daß die nach Gl. 3.17 A ermittelten FRET-Effizienzen fehlerhaft sind, da für die Berechnung der FRET-Effizienz die mittlere speziesgewichtete Lebensdauer τ_{av}^X benötigt wird. Auch der Zusammenhang zwischen F_D/F_A und τ_{DA} nach Gl 3.24 sowie Gl 3.25 zur Berechnung der Iso-Effizienz-Linien ist so nicht mehr gültig.

Für die korrekte Berechnung der FRET-Effizienz müssen die im Einzelmolekülexperiment gemessenen, fluoreszenzgewichteten Lebensdauern $\tau_{D(A),av}^A$ bzw. $\tau_{D,av}^A$ in die entsprechenden

speziesgewichteten Lebensdauern $\tau_{D(A),av}^X$ bzw. $\tau_{D,av}^A$ umgerechnet werden (Vgl. Kap. 3.2.1).

Im Folgenden werden zwei Modelle vorgestellt, mit deren Hilfe jeweils ein Verfahren erarbeitet wird, um die zur Umrechnung benötigten Parameter zu bestimmen.

3.6.1 Erstes Modell: irreversible dynamische Löschung

Es wird angenommen, daß der Donorfluorophor schnell (Zustandslebensdauer $< 0,5$ ms) zwischen einem gelöschten Zustand 1 und einem ungelöschten Zustand 2 wechselt (im Folgenden mit den Indizes 1 für Zustand 1 bzw. 2 für Zustand 2 bezeichnet). Unter diesen Voraussetzungen können in einem Einzelmolekülexperiment die beiden Zustände nicht isoliert analysiert werden. Um die individuellen Fluoreszenzlebensdauern der beiden Zustände des Donorfluorophors in Abwesenheit des Akzeptors (τ_{D1} und τ_{D2}) sowie die dazugehörigen Amplituden (X_{D1} und X_{D2}) zu erhalten, muß eine biexponentielle Anpassung der Fluoreszenzabklingkurve des Zustandsgemisches erfolgen. Dazu wird entweder eine Ensemblemessung oder, wenn zusätzliche Spezies in der Mischung vorliegen, eine speziesselektive Lebensdaueranalyse durchgeführt. Aus diesen Daten werden dann für jede FRET-Effizienz mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{FRET} die resultierenden Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$ berechnet.

$$\tau_{D(A)1} = \frac{1}{k_{FRET} + \frac{1}{\tau_{D1}}} \quad \text{und} \quad \tau_{D(A)2} = \frac{1}{k_{FRET} + \frac{1}{\tau_{D2}}} \quad \text{Gl. 3.36 A,B}$$

Unter der Annahme, daß die relativen Anteile der Fluoreszenzlebensdauerzustände nicht von der FRET-Effizienz abhängen, sind die speziesgewichteten Amplituden X unabhängig von k_{FRET} ($X_{D(A)1} \equiv X_{D1}$ und $X_{D(A)2} \equiv X_{D2}$). Dagegen müssen die fluoreszenzgewichteten Amplituden, $A_{D(A)1}$ und $A_{D(A)2}$ für jede FRET-Effizienz berechnet werden:

$$A_{D(A)1} = \frac{X_{D1} \tau_{D(A)1}}{X_{D1} \tau_{D(A)1} + X_{D2} \tau_{D(A)2}} \quad \text{Gl. 3.37 A}$$

$$\text{und } A_{D(A)2} = \frac{X_{D2} \tau_{D(A)2}}{X_{D1} \tau_{D(A)1} + X_{D2} \tau_{D(A)2}} = 1 - A_{D(A)1} \quad \text{Gl. 3.37 B}$$

Aus den Lebensdauern $\tau_{D(A)1}$, $\tau_{D(A)2}$ und den Amplituden $A_{D(A)1}$, $A_{D(A)2}$ bzw. X_{D1} , X_{D2} lassen sich dann für jedes k_{FRET} die entsprechenden gemittelten Lebensdauern $\tau_{D(A),av}^A$ bzw.

$\tau_{D(A),av}^X$ berechnen:

$$\tau_{D(A),av}^A = A_{D(A)1} \tau_{D(A)1} + A_{D(A)2} \tau_{D(A)2} \quad \text{Gl. 3.38}$$

($\tau_{D(A),av}^A$ entspricht in etwa der im Einzelmolekülexperiment gemessenen Fluoreszenzlebensdauer τ_{av}^{mono})

$$\tau_{D(A),av}^X = X_{D1} \tau_{D(A)1} + X_{D2} \tau_{D(A)2} \quad \text{Gl. 3.39}$$

Basierend auf der Kenntnis von τ_{D1} , τ_{D2} und X_{D1} , X_{D2} können auf diese Weise alle $\tau_{D(A),av}^X$ und $\tau_{D(A),av}^A$ für beliebige k_{FRET} simuliert und anschließend gegeneinander aufgetragen werden:

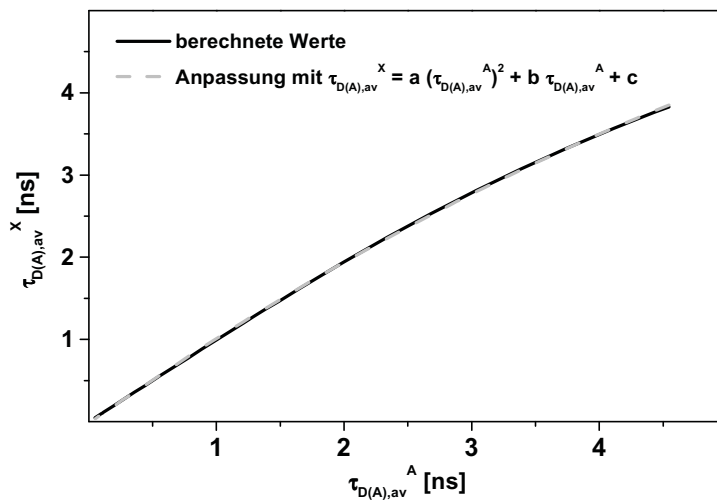


Abb. 3.15: $\tau_{D(A),av}^X$ gegen $\tau_{D(A),av}^A$.
Weitere Erläuterungen siehe Text.

Man erhält eine Kurve an deren Verlauf ein Polynom zweiter Ordnung, $ax^2 + bx + c$, angepaßt werden kann:

$$\tau_{D(A),av}^X = a \left(\tau_{D(A),av}^A \right)^2 + b \tau_{D(A),av}^A + c \quad \text{Gl. 3.40}$$

Dieses Polynom bzw. die ermittelten Koeffizienten a , b und c können dann schließlich zur Umrechnung der $\tau_{D(A)}$ – Achse in den entsprechenden Histogrammen verwendet werden. Um

das Vorgehen zu verdeutlichen ist die Prozedur im Anhang für ein konkretes Beispiel dargestellt.

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Varianten verwendet, um den Effekt der irreversiblen statischen Löschung bei der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern im Einzelmolekülexperiment zu berücksichtigen:

1) Beim Vorliegen einer homogenen Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung, wie bei der Studie, die in Kap. 5 vorgestellt wird, kann die Fluoreszenzlebensdauerachse der entsprechenden Histogramme direkt nach Gl. 3.40 reskaliert werden.

2) Bei einem heterogenen Speziesgemisch, wie es in Kap. 4 auftritt, sind die Korrekturfaktoren a , b und c unter Umständen speziespezifisch, so daß die Korrektur der Fluoreszenzlebensdauerachse für mehrere Spezies gleichzeitig nicht möglich ist. In einem solchen Fall werden statt der Lebensdauerachse die Gl. 3.24 für den Zusammenhang zwischen F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ sowie die Gl. 3.25 für die Berechnung der Iso-Effizienz-Linien so modifiziert, daß sie für die unkorrigierte Lebensdauerachse gelten. Für den theoretischen Zusammenhang zwischen F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ ergibt sich somit:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{\Phi_{FD}}{\Phi_{FA} \tau_{D,av}^X} \frac{a (\tau_{D(A),av}^A)^2 + b \tau_{D(A),av}^A + c}{a (\tau_{D(A),av}^A)^2 + b \tau_{D(A),av}^A + c} \quad \text{Gl. 3.41}$$

und für die Iso-Effizienz-Linien gilt:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{(a (\tau_{D(A),av}^A)^2 + b \tau_{D(A),av}^A + c) k_F}{E_T \Phi_{FA}} \quad \text{Gl. 3.42}$$

3.6.2 Zweites Modell: Reversible Löschung: Exciplex-Gleichgewicht

Wird angenommen, daß das biexponentielle Abklingverhalten durch eine reversible Löschung mit Bildung eines Exciplexes verursacht wird, muß die Korrektur der Fluoreszenzlebensdauern einer Einzelmolekülmessung nach einem anderen Verfahren erfolgen. Zum Verständnis der späteren Ableitungen soll zunächst der Mechanismus dieser Löschung beschrieben werden.

Ein Exciplex ist ein Komplex aus angeregtem Fluorophor (D^*) und Löschmolekül Q . Dieser Komplex ist nur im angeregten Zustand thermisch stabil und unterscheidet sich in diesem Punkt von einem angeregten Grundzustandskomplex, der im Rahmen der statischen Löschung auftreten kann (Vgl. Kap. 2.2). Der Prozeß der Exciplex-Bildung entspricht im engeren Sinn einer Reaktion aus dem angeregten Zustand des Fluorophors. Doch da der Exciplex häufig nicht fluoresziert und die Reaktion in der Regel reversibel ist, zeigt die Exciplexbildung die Charakteristika einer Löschung. Das Reaktionsschema der Exciplexbildung unter Annahme eines reversiblen Gleichgewichts im angeregten Zustand (Birks-Mechanismus) (Birks, 1975) ist in Abb. 3.16 gegeben.

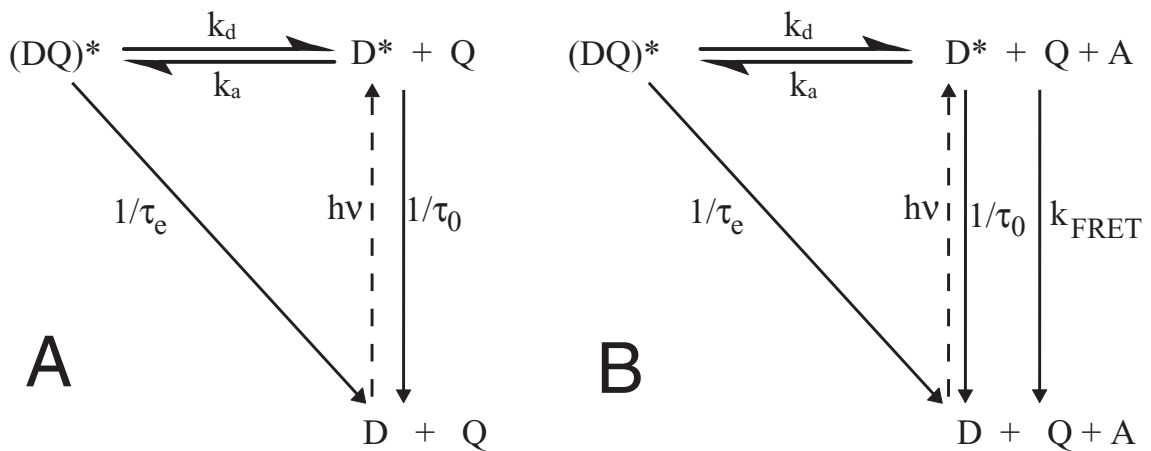


Abb. 3.16: A) Reaktionsschema Exciplex unter Vernachlässigung von Grundzustandskomplexen. Der Fluorophor D wird durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung ($h\nu$) in den angeregten Zustand D^* überführt. Anschließend kann der Fluorophor entweder über die üblichen Deaktivierungskanäle (Fluoreszenz, IC, ISC usw.) mit der Geschwindigkeitskonstanten k_0 ($\equiv 1/\tau_0 = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \dots$) relaxieren oder einen Komplex mit einem Löschmolekül Q bilden kann. Dieser Komplex $(DQ)^*$ wird als Exciplex bezeichnet und kann seinerseits über einen eigenen Deaktivierungskanal mit der Geschwindigkeitskonstanten k_e ($\equiv 1/\tau_e$) in den Grundzustand zurückkehren oder wieder in die Edukte (D^* und Q) zerfallen. Dabei sind k_a und k_d die Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung des Exciplexes. B) zeigt das Reaktionsschema unter zusätzlicher Berücksichtigung von FRET. Dabei steht A für den Akzeptorfluorophor.

Die Bildung des Exciplexes kann unter der Annahme einer großen Quencherkonzentration oder für den Fall, daß Quencher Q und Fluorophor D gemeinsam Teil eines größeren Molekülsystems sind als Reaktion pseudo-erster Ordnung bzw. erster Ordnung k_{am} betrachtet werden. Die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion ist dann:

$$k_{am} = k_a [Q] \quad (\text{für } [Q] \gg [D]; \text{ intermolekular}) \quad \text{bzw.} \quad \text{Gl. 3.43}$$

$$k_{am} = k_a \quad (\text{wenn Q und D Teil eines Molekül sind, intramolekular}), \quad \text{Gl. 3.44}$$

wobei [Q] die Konzentration des Quenchers ist. Die Geschwindigkeitskonstanten aus Abb. 3.16 A lassen sich aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bestimmen.

Die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz von freiem Farbstoff und Exciplex kann in dem in Abb. 3.16 A dargestellten System durch die Zeitabhängigkeit der Konzentrationen der angeregten Zustände des freien Fluorophors D und des Exciplexes (DQ)* beschrieben werden.

$$\frac{d[D^*]}{dt} = -(k_{am} + 1/\tau_0)[D^*] + k_d[(DQ)^*] \quad \text{Gl. 3.45 A}$$

$$\frac{d[(DQ)^*]}{dt} = k_{am}[D^*] - (k_d + 1/\tau_e)[(DQ)^*] \quad \text{Gl. 3.45 B}$$

Die allgemeine Lösung dieses linearen homogenen Differentialgleichungssystems lautet:

$$[D^*] = X_{D1}e^{-k_{D1}t} + X_{D2}e^{-k_{D2}t} \quad \text{Gl. 3.46 A}$$

$$[(DQ)^*] = X_{DQ1}e^{-k_{D1}t} + X_{DQ2}e^{-k_{D2}t} \quad \text{Gl. 3.46 B}$$

Phänomenologisch macht sich folglich der Exciplex-Löschmechanismus durch ein biexponentielles Abklingverhalten mit den Lebensdauerkomponenten τ_1 ($\equiv 1/k_1$) und τ_2 ($\equiv 1/k_2$) bemerkbar. Um die weitere Diskussion zu vereinfachen gehen wir davon aus, daß der Exciplex strahlungslos relaxiert (Dennoch sind die folgenden Ableitungen nicht auf diesen speziellen Fall beschränkt.). Unter dieser Voraussetzungen erhält man aus einer biexponentiellen Anpassung der entsprechenden Fluoreszenzabklingkurve die Amplituden X_{D1} und X_{D2} sowie die Lebensdauern τ_{D1} und τ_{D2} . Die auf diese Weise experimentell bestimmten Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern hängen mit den Geschwindigkeitskonstanten bzw. Lebensdauern in Abb. 3.16 folgendermaßen zusammen:

$$k_{D1} = \frac{1}{\tau_{D1}} = k_d + (1/\tau_e) + k_{am} + (1/\tau_0) + \sqrt{\left((k_d + (1/\tau_e) - k_{am} - (1/\tau_0))^2 + 4k_d k_{am}\right)}$$

Gl. 3.47 A

$$k_{D2} = \frac{1}{\tau_{D2}} = k_d + (1/\tau_e) + k_{am} + (1/\tau_0) - \sqrt{\left((k_d + (1/\tau_e) - k_{am} - (1/\tau_0))^2 + 4k_d k_{am}\right)}$$

Gl. 3.47 B

$$X_{D2} = \frac{k_{am} + \frac{1}{\tau_0} - \frac{1}{\tau_{D1}}}{\frac{1}{\tau_{D2}} - \frac{1}{\tau_{D1}}} \quad \text{und} \quad X_{D1} = 1 - X_{D2} \quad \text{Gl. 3.48 A,B}$$

Durch Umformen der Gleichungen 3.47 und 3.48 ergeben sich schließlich die Geschwindigkeitskonstanten k_{am} und k_d sowie die Fluoreszenzlebensdauer des Exciplexes, τ_e :

$$k_{am} = X_{D2} (k_{D2} - k_0) - X_{D1} (k_0 - k_{D1}) \quad \text{Gl. 3.49}$$

$$k_d = \frac{(k_{D2} - k_{D1})^2 - (2k_{am} + 2k_0 - k_{D1} - k_{D2})^2}{4k_{am}} \quad \text{Gl. 3.50}$$

$$\tau_e = \frac{1}{k_{D1} + k_{D2} - k_{am} - k_d - k_0} \quad \text{Gl. 3.51}$$

Eine detaillierte Beschreibung der Theorie für quantitative Auswertung der Fluoreszenzzerfälle beim Vorliegen einer Exciplexlöschung ist in der Dissertation von C. von Frese zu finden (von Frese, 1997).

Exciplex-Löschung im FRET-Experiment

Unterliegt der Donor in einem Einzelmolekül-FRET-Experiment einer Exciplex-Löschung müssen die bestimmten Fluoreszenzlebensdauern unter Berücksichtigung des besonderen Mechanismus korrigiert werden. Dazu wird zunächst angenommen, daß nur D* FRET-aktiv ist, nicht aber der Exciplex (DQ)*. Unter dieser Voraussetzung ergibt sich das Reaktionsschema in Abb. 3.16 B.

Mit Hilfe einer Fluoreszenzlebensdauerermessung des Donorfluorophors (in Abwesenheit des Akzeptors) unter dem Einfluß der Exciplex Löschung mit anschließender biexponentieller Anpassung des Fluoreszenzzerfalls können zunächst τ_{D1} ($\equiv 1/k_{D1}$) und τ_{D2} ($\equiv 1/k_{D2}$) sowie die dazugehörigen Amplituden X_{D1} und X_{D2} bestimmt werden. Zusätzlich muß die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluorophors τ_0 ($\equiv 1/k_0$) ohne den Einfluß der Exciplex-Löschung gemessen werden, sofern diese nicht aus der Literatur bekannt ist.

Mit Hilfe dieser Parametern lassen sich die, für den Exciplex-Mechanismus charakteristischen Geschwindigkeitskonstanten der Exciplexbildung k_{am} und der Dissoziation k_d sowie die Fluoreszenzlebensdauer τ_e nach den Gleichungen 3.49 bis 3.51 bestimmen.

Im nächsten Schritt wird das Auftreten eines zusätzlichen Zerfallskanals durch FRET diskutiert (Abb. 3.16 B). Dazu wird eine neue Zerfallsrate $k_{0,DA}$ bzw. Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{0,DA}$ definiert:

$$\tau_{0,DA} = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + k_{FRET}} \quad \text{Gl. 3.52}$$

In Verbindung mit den Gl. 3.53 und 3.54 (aus Gl. 3.47 und 3.48) und unter der vereinfachenden Annahme, daß τ_e , k_d und k_{am} unabhängig von der FRET-Effizienz sind, können dann für beliebige k_{FRET} die Amplituden $X_{D(A)1}$ und $X_{D(A)2}$ sowie die Lebensdauern $\tau_{D(A)1}$ ($\equiv 1/k_{D(A)1}$) und $\tau_{D(A)2}$ ($\equiv 1/k_{D(A)2}$) berechnet werden.

$$k_{D(A)1} = \frac{1}{\tau_{D(A)1}} = k_d + (1/\tau_e) + k_{am} + (1/\tau_{0,D(A)}) + \sqrt{\left((k_d + (1/\tau_e) - k_{am} - (1/\tau_{0,D(A)}))^2 + 4k_d k_{am} \right)}$$

Gl. 3.53A

$$k_{D(A)2} = \frac{1}{\tau_{D(A)2}} = k_d + (1/\tau_e) + k_{am} + (1/\tau_{0,D(A)}) - \sqrt{\left((k_d + (1/\tau_e) - k_{am} - (1/\tau_{0,D(A)}))^2 + 4k_d k_{am} \right)}$$

Gl. 3.53B

$$X_{D(A)2} = \frac{k_{am} + \frac{1}{\tau_{0,D(A)}} - \frac{1}{\tau_{D(A)1}}}{\frac{1}{\tau_{D(A)2}} - \frac{1}{\tau_{D(A)1}}} \quad \text{und} \quad X_{D(A)1} = 1 - X_{D(A)2} \quad \text{Gl. 3.54 A,B}$$

Anschließend werden aus den speziesgewichteten Amplituden $X_{D(A)1}$ und $X_{D(A)2}$ nach Gl. 3.6 die entsprechenden fluoreszenzgewichteten Amplituden $A_{D(A)1}$ und $A_{D(A)2}$ berechnet, so daß schließlich $\tau_{D(A),av}^A$ nach Gl. 3.38 bestimmt werden kann.

$\tau_{0,DA}$ entspricht der Fluoreszenzlebensdauer, die für die Berechnung der FRET-Effizienz benötigt wird, und $\tau_{D(A),av}^A$ in etwa der im Einzelmolekülexperiment bestimmten

Fluoreszenzlebensdauer. Analog zum Vorgehen bei der irreversiblen statischen Löschung wird $\tau_{0,D(A)}$ gegen $\tau_{D(A),av}^A$ aufgetragen. Man approximiert den Zusammenhang zwischen $\tau_{0,D(A)}$ und $\tau_{D(A),av}^A$ durch eine Regressionsgerade; aus deren Steigung ergibt sich der Korrekturfaktor, b :

$$\tau_{0, D(A)} = b \tau_{D(A),av}^A \qquad \text{Gl. 3.55}$$

Dieser Faktor wird schließlich zur Korrektur der im Einzelmolekülexperiment bestimmten Fluoreszenzlebensdauern verwendet. Die auf diese Weise korrigierte Fluoreszenzlebensdauer entspricht der Fluoreszenzlebensdauer bei Abwesenheit der Exciplex-Löschung. Um das Vorgehen zu verdeutlichen ist auch für den Fall der reversiblen Löschung im Anhang eine Beispielrechnung zu finden.

3.7 Die Untersuchten Biomoleküle

3.7.1 DNA-Synthese und Sequenzen für die DNA-Strukturuntersuchung

Synthese

Alle verwendeten 2'-Desoxyoligonukleotide wurden mit Hilfe der Standard Phosphoramidittechnologie hergestellt (Carruthers, 1987; Sinha, 1984) und mittels PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgereinigt von der Firma IBA-NAPS GmbH (Göttingen) bezogen (FCS Grade). Die entsprechenden Sequenzen und die daraus gebildeten Duplexe sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 angegeben.

Tabelle 3.4 Sequenzen

Name	Sequenz
A _{X,es}	5'-d(Cy5-TGT AAA ACG ACG GCC AGT)
A _{Y,es}	5'-d(Cy5- TGT AAA ACG AGA GAG CCT AAA ACG ATC)
A _{Z,es}	5'-d(Cy5-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC TAG TTA TGA CGA GTA AAT C)
U _{X,es}	5'-d(TGT AAA ACG ACG GCC AGT)
U _{Y,es}	5'-d(TGT AAA ACG AGA GAG CCT AAA ACG ATC)
U _{Z,es}	5'-d(TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC TAG TTA TGA CGA GTA AAT C)
U _{DX,es}	5'-d(ACT GGC CGT CGT TTT ACA)
D _{es-3}	5'-d(ACT GGC CGT CGT TTT* ACA)
D _{es-4}	5'-d(ACT GGC CGT CGT TT*T ACA)
D _{es-5}	5'-d(ACT GGC CGT CGT T*TT ACA)
D _{es-6}	5'-d(ACT GGC CGT CG T* TTT ACA)
D _{es-9}	5'-d((ACT GGC CG T* CGT TTT ACA)
D _{es-11}	5'-d(GAT CGT TTT AGG CTC T*CT CGT TTT ACA)
D _{es-13}	5'-d(GAT CGT TTT AGG C T*C TCT CGT TTT ACA)
D _{es-15}	5'-d(AC T* GGC CGT CGT TTT ACA)
D _{es-17}	5'-d(Alexa488-ACT GGC CGT CGT TTT ACA)
D _{es-18}	5'-d(GAT TTA CTC GTC ATA ACT AGA T*AC TGG CCG TCG TTT TAC A)
D _{es-20}	5'-d(GAT CGT T*TT AGG CTC TCT CGT TTT ACA)
D _{es-22}	5'-d(GAT TTA CTC GTC ATA AC T* AGA TAC TGG CCG TCG TTT TAC A)
D _{es-36}	5'-d(GAT T*TA CTC GTC ATA ACT AGA TAC TGG CCG TCG TTT TAC A)

T* = Mit Alexa 488 versehenes Thymin

Aus diesen Sequenzen wurden die folgenden Duplexe gebildet:

Tabelle 3.5 Duplexe

Duplex	Name	Δ_{bp}	Duplex	Name
$D_{es-3} \bullet A_{X,es}$	DA-3	3	$D_{es-3} \bullet U_{X,es}$	D-3
$D_{es-4} \bullet A_{X,es}$	DA-4	4	$D_{es-4} \bullet U_{X,es}$	D-4
$D_{es-5} \bullet A_{X,es}$	DA-5	5	$D_{es-5} \bullet U_{X,es}$	D-5
$D_{es-6} \bullet A_{X,es}$	DA-6	6	$D_{es-6} \bullet U_{X,es}$	D-6
$D_{es-9} \bullet A_{X,es}$	DA-9	9	$D_{es-9} \bullet U_{X,es}$	D-9
$D_{es-11} \bullet A_{Y,es}$	DA-11	11	$D_{es-11} \bullet U_{Y,es}$	D-11
$D_{es-13} \bullet A_{Y,es}$	DA-13	13	$D_{es-13} \bullet U_{Y,es}$	D-12
$D_{es-15} \bullet A_{X,es}$	DA-15	15	$D_{es-15} \bullet U_{X,es}$	D-15
$D_{es-17} \bullet A_{X,es}$	DA-17	17	$D_{es-17} \bullet U_{X,es}$	D-17
$D_{es-18} \bullet A_{Z,es}$	DA-18	18	$D_{es-18} \bullet U_{Z,es}$	D-18
$D_{es-20} \bullet A_{Y,es}$	DA-20	20	$D_{es-20} \bullet U_{Y,es}$	D-20
$D_{es-22} \bullet A_{Z,es}$	DA-22	22	$D_{es-22} \bullet U_{Z,es}$	D-22
$D_{es-36} \bullet A_{Z,es}$	DA-36	36	$D_{es-36} \bullet U_{Z,es}$	D-36
			$U_{DX,es} \bullet A_{X,es}$	A-DUP

D = Duplexe die nur den Donorfluorophor (Alexa 488) tragen

DA = Duplexe die sowohl den Donor als auch den Akzeptorfluorophor tragen (FRET-Proben)

Die Zahl gibt jeweils die separierenden Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor an (Δ_{bp}). Bei den D-Duplexen deutet die Zahl die Äquivalenz zum entsprechenden DA-Duplex an.

Markierung

Die Farbstoffmarkierung der Oligonukleotide erfolgte anschließend an die Synthese und wurde bis auf die Markierung mit dem Fluorophor Alexa 488 ebenfalls von IBA-NAPS durchgeführt. Die Markierung der Oligonukleotide mit Alexa 488 erfolgte in unserem Labor nach dem Standard Protokoll von Molecular Probes aus dem „Proteinlabeling Kit“. Für die Markierung von 100 nmol DNA wurde dazu jeweils 1 Labeling Kit von der Firma Molecular Probes, Eugene (USA) verwendet. Die Strukturen der Fluorophore gekoppelt an die DNA sind in Kap. 4.1 dargestellt.

Hybridisierung

Die Proben wurden hybridisiert indem die entsprechenden Einzelstränge mit einer Konzentration von je 8.5 μM im Hybridisierungs-Puffer zusammengegeben wurden. Im Fall von Donor bzw. Akzeptor-Only Proben wurde ein 5-facher Überschuß des entsprechenden unmarkierten Strangs verwendet. Die Proben wurden ca. 5 Minuten im 95°C heißen Wasserbad getempert und anschließend langsam (über nacht) auf Raumtemperatur abgekühlt.

Puffer- und Meßbedingungen

Die Messung der DNA Proben erfolgte im Natriumphosphat-Puffer. Der Puffer wurde zusätzlich mit 400 μM Ascorbinsäure als Antioxidans versetzt, um ein frühzeitiges Ausbleichen des Cy5 zu verhindern. Die Probenkonzentration für FCS Messungen betrug einige Nanomol pro Liter, die Konzentrationen für die Einzelmolekülmessungen bewegten sich im 10 picomolaren Bereich.

Setup

Die Messungen wurden an dem in Abb. 3.3 dargestellten Aufbau durchgeführt. Für die Anregung des Donors wurde der Argon-Ionen-Laser gepulst bei einer Wellenlänge von 496.5 nm betrieben. Dabei betrug die Anregungsleistung im Fokus je nach Meßtag 70 bis 90 kW/cm^2 . Für Konstrukte mit einem großem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, wurden ferner Messungen durchgeführt, bei denen der Akzeptor zusätzlich direkt mit einem Krypton-Ionen-Laser im kontinuierlichen Betrieb (cw) bei 647 nm angeregt wurde. Die Anregungsleistung wurde dabei so gewählt, daß der FRET nicht durch Sättigungseffekte beeinträchtigt ist und betrug 10 bis 13 kW/cm^2 . Die verwendeten Filter für das Donor-Akzeptor-Paar Alexa 488-Cy5 sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

3.7.2 Die Holliday-Junctions: Synthese der Sequenzen, Hybridisierung und Meßbedingungen

Synthese

Die Synthese der für diese Studie verwendeten 2'-Desoxyoligonukleotide wurde ebenfalls von der Firma IBA-NAPS GmbH (Göttingen) durchgeführt. Alle Angaben bezüglich der Aufreinigung der 2'-Desoxyoligonukleotide sowie über deren Markierung entsprechen denen der DNA-Strukturuntersuchung. Bei den farbstoffmarkierten Sequenzen wurde der

Donorfluorophor Alexa 488 über einen Aminomodifier (C6) an das 5'-Ende des Stranges 1 gebunden. Der Akzeptorfluorophor Cy5 wurde ebenfalls über einen Aminomodifier (C6) und den C5-Linker des Cy5 an das 5'-Ende der Stränge 2 bzw. 3 gebunden. Die Sequenzen der verwendeten Stränge 1-4 ist in Tabelle 3.6 dargestellt:

Tabelle 3.6: Sequenzen für die Holliday-Junction

Name	Sequenz
HO-1-D	5'-d(Alexa 488-TTG CAA TCC AGA GCA CAA)
HO-2-A	5'-d(Cy5-TTG TGC TCT CCG AAT CAA)
HO-3-A	5'-d(Cy5-TTG ATT CGG TCT ATG CAA)
HO-1	5'-d(TTG CAA TCC AGA GCA CAA)
HO-2	5'-d(TTG TGC TCT CCG AAT CAA)
HO-3	5'-d(TTG ATT CGG TCT ATG CAA)
HO-4	5'-d(TTG CAT AGA GGA TTG CAA)

Hybridisierung

Die Proben wurden in TRIS-Puffer mit 10 mM MgCl₂ hybridisiert. Dabei betrug die Konzentration der markierten Einzelstränge ca. 0.5 µM und die der unmarkierten Stränge ca. 1.5 µM (≡ 3-facher Überschuß). Die Proben wurden ca. 5 Minuten im 95°C heißen Wasserbad getempert und anschließend langsam (über nacht) auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die drei unterschiedlich markierten Holliday-Junctions die im Rahmen dieser Studie verwendet wurden, wurden die folgenden Stränge zusammengegeben:

Tabelle 3.7: Stangkombinationen für das 1;2-Konstrukt, das 1;3-Konstrukt und das Donor-Konstrukt (nur mit dem Donor markierte Holliday-Junction)

Name	verwendete Stränge
1;2-Konstrukt	HO-1-D • HO-2-A • HO-3 • HO-4
1;3-Konstrukt	HO-1-D • HO-2 • HO-3-A • HO-4
D-Konstrukt	HO-1-D • HO-2 • HO-3 • HO-4

Puffer- und Meßbedingungen

Die Holliday-Junctions wurden im TRIS-Puffer gemessen. Für die Messungen wurde dem Puffer, aus oben genannten Gründen, ebenfalls 400 μM Ascorbinsäure zugegeben. Weiterhin wurde bei den Messungen die MgCl_2 Konzentration von 0 bis 10 mM variiert. Bei MgCl_2 -Konzentrationen < 1 mM enthielt der TRIS-Puffer kein EDTA. Die Probenkonzentration für FCS- und Einzelmolekülmessungen lagen etwa in dem selben Bereich wie die der DNA-Strukturuntersuchungen.

Setup

Es wurden dieselben experimentellen Einstellungen wie bei der Strukturuntersuchung der DNA verwendet; lediglich die Filterkombination wurde leicht variiert (siehe Tabelle 3.2). Die Anregungsleistung des Argon-Ionen-Lasers betrug je nach Meßtag 42 bis 44 kW/cm^2 . Der Krypton-Ionen-Laser wurde im Rahmen dieser Studie nicht eingesetzt.

3.7.3 SNARE

Moleküle

Die verwendeten cytosolischen SNARE-Proteine Synaptobrevin 2 (1-96), Syntaxin-1a (1-262) und SNAP-25A (1-206) (alle vier Cysteine sind durch Serine ersetzt) sind in der Literatur beschrieben (Margittai, 2002). Den Konstrukten Syntaxin-1a und Synaptobrevin 2 fehlt die Transmembranregion.

Synthese der Proteine

Sowohl die Synthese der SNARE Proteine sowie die gesamte Aufreinigung und Farbstoffmarkierung der Proteine als auch die Formierung der entsprechenden Komplexe erfolgte in der Gruppe von Prof. Dr. R. Jahn und wurde von Dr. M. Margittai am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (MPIBPC) in Göttingen durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Prozedur findet sich in der Dissertation von M. Margittai. In Kürze: Im nativen Syntaxin-1 (Sx) befindet sich ein Cystein an Position 145, das zunächst durch Austausch gegen Serin entfernt werden muß. Anschließend werden durch zwei aufeinanderfolgende Mutationen zwei native Aminosäuren an den gewünschten Positionen durch Cysteine ersetzt. Alle Mutationen wurden nach der Methode von Higuchi (Higuchi, 1990; Margittai, 2002) durchgeführt. Nach den Mutationen erfolgt die Proteinexpression in E.

coli nach den entsprechenden Standardmethoden (Fasshauer, 1999; Margittai, 2001). Nach dem Aufschluß werden die doppelt mutierten Proteine mittels Affinitätschromatographie (His-tag Verfahren) aufgereinigt und die „Tags“ enzymatisch abgespalten. Nach diesem Verfahren wurden die folgenden 15 Syntaxin-Doppelmutanten hergestellt:

S59C/S91C (Sx 59/91), S59C/G105C (Sx 59/105), S59C/D167C (Sx 59/167), S59C/N207C (Sx 59/207), S59C/S225C (Sx 59/225), S91C/D167C (Sx 91/167), S91C/S193C (Sx 91/193), S91C/T197C (Sx 91/197), S91C/N207C (Sx 91/207), S91C/S225C (Sx 91/225), G105C/T197C (Sx 105/197), G105C/N207C (Sx 105/207), G105C/S225C (Sx 105/225), T197C/D167C (Sx 197/167), S225C/R151C (Sx 225/151). Die vereinfachten Bezeichnungen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden sind jeweils in Klammern angegeben.

Markierung

Für die Markierung der Proteine wurden die Maleinimide der entsprechenden Fluorophore verwendet, die mit den Cysteinen reagieren, so daß die Proteine nur an den ausgewählten Positionen markiert sind. Als Donorfluorophor wurde Alexa 488 und als Akzeptorfluorophor Alexa 594 verwendet. Für die Markierungsreaktion wurden die Maleinimide beider Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt, so daß beide Cysteine statistisch mit Alexa 488 und 594 markiert wurden. Dabei wurde ein 10-facher molarer Überschuß (bezogen auf die Proteinkonzentration) des Maleinimids von Alexa 488 und ein 30-facher Überschuß des Maleinimids von Alexa 594 verwendet.

Aufgrund dieser Markierungsprozedur sind acht verschiedene Syntaxinspezies denkbar: jeweils zwei einfach mit Donor bzw. Akzeptor markierte Syntaxine SxD und SxA, zwei FRET aktive doppelt markierte Spezies SxDA und SxAD sowie die zwei doppelt markierten Spezies DD und AA. Dieses heterogene Gemisch kann nicht ohne weiteres mit Hilfe konventioneller Verfahren aufgereinigt werden, so daß Experimente bei dieser Art der Markierung nur in Kombination mit Messungen auf Einzelmolekülebene möglich sind. Neben den spektralen Eigenschaften ist bei der Auswahl des Donor- und Akzeptorfluorophors bei einer solchen Markierungsprozedur darauf zu achten, daß die Maleinimide der beiden Farbstoffe in etwa die gleiche Reaktivität aufweisen. Aus diesem Grund konnte für diese Studie nicht das ansonsten verwendete Cy5 eingesetzt werden, da für ein Donor-Akzeptor-Verhältnis von 1:1 ein 50-facher Überschuß des Cy5 Maleinimid nötig ist. Die Maleinimide von Alexa 488 und Alexa 594 besitzen dagegen in etwa vergleichbare

Reaktivitäten. Für die Markierungsprozedur wurde ein 3-facher Überschuß des Alexa 594 Maleinimids (Bezogen auf Alexa 488, siehe oben) verwendet.

Komplex-Formierung

Bei der Bildung der ternären (SNARE) Komplexe wurde ein 50-facher molarer Überschuß an Synaptobrevin und SNAP-25 eingesetzt. Die Assoziation der Proteine erfolgte über Nacht auf Eis. Für die Formierung des Komplexes zwischen Syntaxin-1a und Munc-18 (von D. Schütz (MPIBPC, Göttingen) zur Verfügung gestellt) wurde ein 10-facher molarer Überschuß an Munc-18 verwendet. Die Vollständigkeit der Komplexformierung im Fall des Syntaxin-1a/Munc-18 Komplexes mittels einer SDS PAGE und im Fall des ternären Komplexes mit Hilfe einer nativen Gelelektrophorese überprüft.

Puffer- und Meßbedingungen sowie Probenvorbereitung

Die Messung der Proben erfolgen im PBS-Puffer. Bei Messungen des Syntaxin-1a/Munc-18 Komplex enthielt der Puffer zusätzlich 2 μM freies Munc-18 um eine Dissoziation des Komplexes zu vermeiden, während der SNARE-Komplex auch bei den Konzentrationen im Einzelmolekülexperiment genügend stabil ist. Um die Adsorption der zu untersuchenden Moleküle an die Glasoberfläche des Deckglases zu verhindern war es notwendig, die Glasoberfläche zu passivieren. Dazu wurde zunächst eine κ -Caseinlösung (1mg/ml in PBS-Puffer) aufgetragen und ca. 5 min auf dem Deckglass belassen. Nach dem Entfernen der Caseinlösung wurde mehrmals mit PBS-Puffer nachgespült, um nicht adsorbiertes Casein zu entfernen. Auf die so präparierten Deckgläser wurde dann die Probe gegeben und die Messung durchgeführt.

Setup

Die für diese Studie eingesetzte Filterkombination ist der Tabelle 3.2 zu entnehmen. Ein Nachteil des gewählten Donor-Akzeptor-Paares ist die ungenügende spektrale Trennung der Absorptionsspektren. Daraus resultiert eine nicht zu vernachlässigende direkte Anregung des Akzeptorfluorophors durch den Argon-Ionen-Laser. Um diesen Effekt zu minimieren wurde der Donor mit einer Wellenlänge von 476.5 nm anstatt der für Alexa 488 günstigeren Wellenlänge von 496.5 nm angeregt. Die dabei verwendete Anregungsleistung betrug je nach Meßtag 47 bis 55 kW/cm^2

4 DNA-Strukturanalyse

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist als Träger der genetischen Information eines der wichtigsten Moleküle in der Biologie. Die DNA ist ein langkettiges Polymer, das aus kleineren Untereinheiten den sogenannten Nukleotiden aufgebaut ist. Die Nukleotide bestehen ihrerseits aus einem Zucker, der Desoxyribose, einer Phosphatgruppe und einer heterozyklischen Base. In gewöhnlicher DNA kommen vier verschiedene Basen vor, und zwar die beiden Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C).

Die DNA kommt in verschiedenen Konformationen vor. Die weitaus häufigste ist die sogenannte B-DNA. Die dreidimensionale Struktur der B-DNA ist bereits 1953 von Watson und Crick (Watson, 1953) mit Hilfe der Röntgenbeugung aufgeklärt worden. Sie stellten fest, daß sich zwei Polynukleotidstränge zu einer rechtsgängigen doppelsträngigen Helix zusammenlagern, wobei die Stränge in entgegengesetzte Richtungen laufen und durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin zusammengehalten werden. Die Phosphat- und Desoxyribosesterreste befinden sich außen und bilden das „Rückgrat“ der DNA, während die Basen nach innen weisen, die Ringebenen der Basen stehen dabei senkrecht zur Helixachse. Der Durchmesser der DNA beträgt ca. 2 nm. Benachbarte Basen entlang der Helixachse sind 0,34 nm voneinander entfernt und um 36° gegeneinander verdreht. Somit wiederholt sich die Struktur entlang der Helixachse nach jeweils zehn Basenpaaren, d.h. in Intervallen von 3,4 nm.

4.1 Zielsetzung der Studie

Die definierte und rigide Struktur der DNA soll zunächst dazu genutzt werden, um das Auflösungsvermögen der MFD-Technik bei Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen zu bestimmen. Im Vordergrund steht dabei die Fragestellung, ob die Technik in der Lage ist die Helizität der DNA nachzuweisen. Weiterhin sollen die Eigenschaften des Donor-Akzeptor-Paars Alexa 488 und Cy5 an DNA-Systemen analysiert werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Bestimmung der Fluorophorposition relativ zur DNA. Die Fluorophore sind über relativ lange Kohlenwasserstoffketten (Linker) an die DNA gebunden, um eine hohe Flexibilität der Farbstoffe zu gewährleisten, so daß Orientierungsartefakte (κ^2 -Problem, vgl. Kap. 2.3) bei der Abstandsbestimmung ausgeschlossen werden können. Andererseits ist in

aller Regel nicht der gemessene Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, sondern der Abstand zwischen den „Ankerpunkten“ der Fluorophore am entsprechenden Makromolekül von Interesse. Folglich ist für die Interpretation des gemessenen Abstandes, die genaue Kenntnis der Fluorophorposition relativ zur DNA notwendig. Die Erkenntnisse bezüglich der Eigenschaften der Fluorophore, die im Rahmen dieser Studie gewonnen werden, können dann bei der Interpretation späterer Meßreihen an komplexeren DNA-Strukturen genutzt werden.

4.2 Das Konzept

Für die Strukturuntersuchung der DNA mit Hilfe von FRET-Mesungen ist es notwendig verschiedene DNA-Konstrukte zu messen, die sich in der Anzahl der Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Duplexe hergestellt, bei denen die Position des Donorfarbstoffs in der Sequenz variiert, während der Akzeptor in der entsprechenden Gegensequenz jeweils am 5'-Ende gebunden ist. Die verwendeten Sequenzen und Duplexe sind in Tabelle 3.4 und 3.5 angegeben. Abb. 4.1 soll das Vorgehen schematisch verdeutlichen.

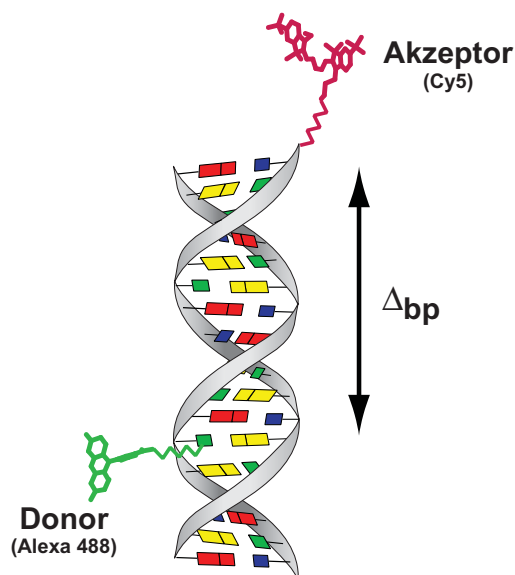


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der verwendeten DNA-Konstrukte. Der Akzeptor ist am 5' Ende gebunden, während sich der Donor an verschiedenen Positionen im Gegenstrang befindet, so daß sich Abstände von $\Delta_{bp} = 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 22$ und 36 ergeben.

Der Abstand zwischen der Positionen an der Donor und Akzeptor an die DNA gebunden ist, wird im Folgenden in separierenden Basenpaaren Δ_{bp} angegeben. Dabei ist für den Fall, daß sich Donor und Akzeptor am selben Basenpaar befinden $\Delta_{bp} = 0$. Im Rahmen dieser Studie wurden Konstrukte mit einer Donor-Akzeptor-Separation von $\Delta_{bp} = 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 22$ und 36 verwendet.

Nomenklatur

Im Folgenden werden Proben, die Moleküle beinhalten, die sowohl den Donor als auch den Akzeptor tragen, also die eigentlichen FRET-Proben, als DA-Proben und die Proben der Moleküle die nur mit dem Donorfluorophor markiert sind als D-Proben bezeichnet. Dahinter folgt jeweils eine Zahl die den Basenpaarabstand Δbp angibt, der für die D-Proben virtueller Natur ist. Bei der DA-13 Probe handelt es sich folglich um die Probe des DNA-Duplexes, der mit Alexa 488 und Cy5 markiert ist und der Abstand zwischen beiden 13 Basenpaare beträgt.

Verbindung Fluorophor/DNA

Der Akzeptorfluorophor Cy5 ist über einen Aminomodifizier mit sechs Methylengruppen (C6) und einen (C5)-Linker mit weiteren fünf Methylengruppen an das 5'-Ende des 2'-Desoxynukleotids gebunden:

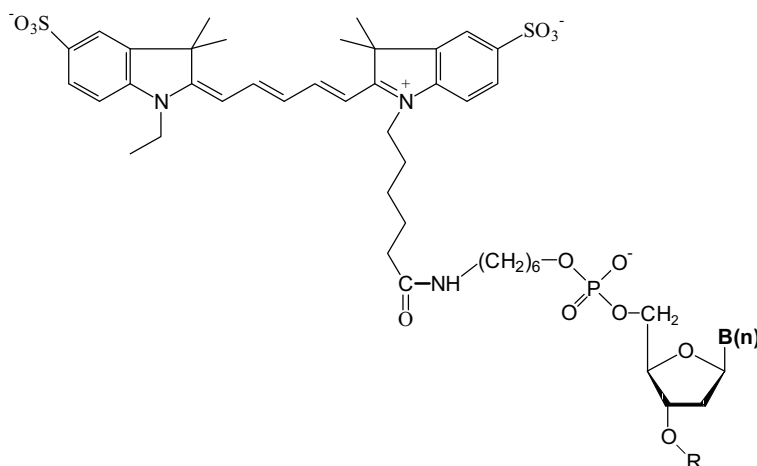


Abb. 4.2: Cy5 gebunden an das 5'-Ende. Die Gesamtlänge des ausgestreckten Linkers beträgt ca. 17Å.

Der Donorfluorophor Alexa 488 ist über ein aminomodifiziertes Thymidin gebunden, das sich im entsprechenden Gegenstrang befindet. Die resultierende Struktur ist in Abb. 4.3 dargestellt. Ausnahme ist das D-17 bzw. DA-17 Konstrukt, bei dem das Alexa 488, entsprechend dem Cy5 über einen Aminomodifizier an das 5'-Ende des 2'-Desoxynukleotids gebunden ist.

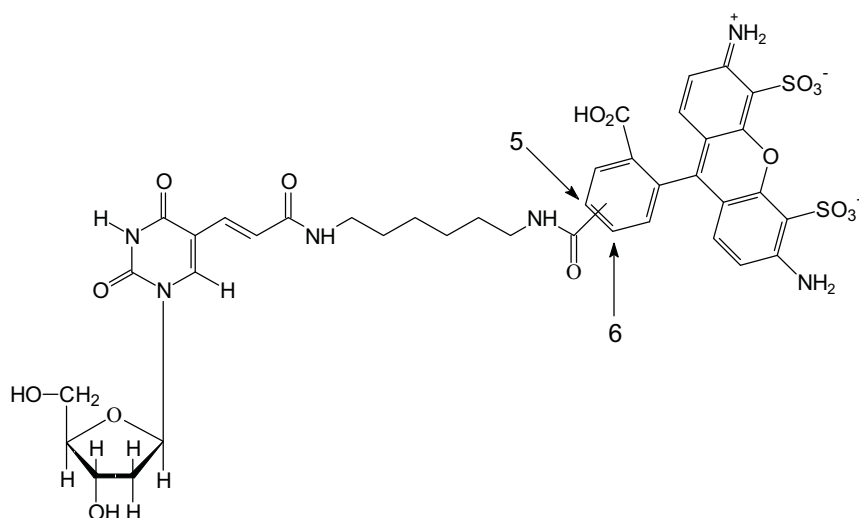


Abb. 4.3: Alexa 488 (5,6-Isomer) gebunden an modifiziertes Thymin. Die Gesamtlänge des ausgestreckten Linkers beträgt 15,6 Å (unter Einbeziehung des Phenylrings ca. 21 Å).

Aus den dargestellten Strukturen kann der maximal mögliche Abstand der Fluorophore von der DNA abgeschätzt und später als zusätzliche Information beim Anpassen der Meßergebnisse an ein DNA Modell verwendet werden (Kap. 4.3.6).

4.3 Die Ergebnisse

4.3.1 Die Eigenschaften des Donorfluorophors Alexa 488

Das hier als Donorfluorophor eingesetzte Alexa 488 gehört zur Klasse der Rhodaminfarbstoffe, die sich durch eine hohe Photostabilität und Fluoreszenzquantenausbeute auszeichnen. Im Allgemeinen sind Rhodaminfarbstoffe durch die Protonierung einer Aminogruppe positiv geladen, Alexa 488 besitzt jedoch zwei Sulfonsäuregruppen, die diesem Rhodaminfluorophor eine negative Gesamtladung verleihen. Aus diesem Grund ist Alexa 488 besonders für FRET-Untersuchungen an DNA und RNA geeignet; da das Zucker-Phosphat-Rückgrat der Nucleinsäuren ebenfalls negativ geladen ist werden unerwünschte Interaktionen zwischen Nucleinsäure und Fluorophor durch die elektrostatische Abstoßung minimiert.

Die Fluoreszenzeigenschaften des Alexa 488-NHS-Esters

Interessanterweise zeigt sich im Einzelmolekülexperiment, daß der für die Markierung der 2'-Desoxyoligonukletide verwendete Alexa 488-NHS-Ester (Molecular Probes) bei Einzelmolekülexperimenten eine inhomogene Fluoreszenzlebensdauerverteilung aufweist, die auf das Vorliegen von mindestens zwei Zuständen mit unterschiedlicher Fluoreszenzlebensdauer hindeutet. Diese inhomogene Verteilung bleibt auch dann erhalten,

wenn die 5,6-Isomeren (Vgl. Abb. 4.3) des Alexa-488 aufwendig getrennt werden (von Evotec OAI A.G., Hamburg) und nur das 5-Isomer untersucht wird. Das Ergebnis der Messung des 5-Isomers ist in Abb. 4.4 dargestellt:

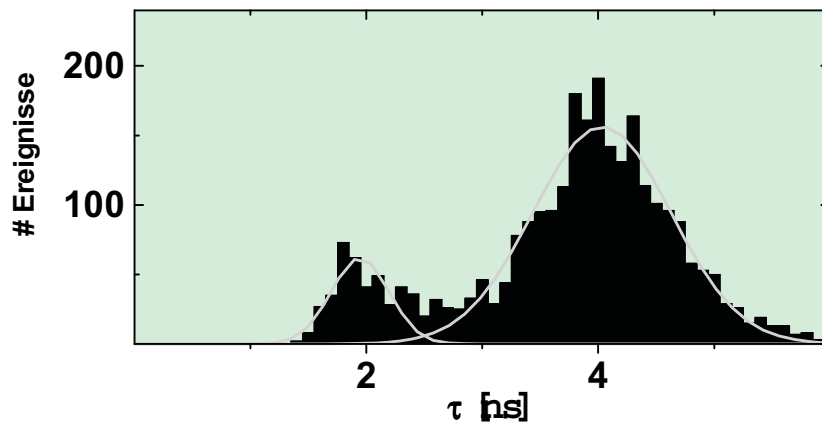


Abb. 4.4: Fluoreszenzlebensdauerverteilung des Alexa 488-NHS-Esters (frei, ungekoppelt). Die grauen Kurven deuten die beiden Fluoreszenzlebensdauerzustände an.

Die Fluoreszenzlebensdauerverteilung von freiem Alexa 488-NHS-Ester weist zwei deutlich erkennbare Zustände mit den Lebensdauern $\tau = 1,9$ ns und $\tau = 4,0$ ns auf. Die genaue Ursache für die heterogenen Fluoreszenzlebensdauerverteilung ist unklar. Tatsache ist jedoch das Anteil des Zustands mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 1,9 ns stark von der verwendeten Charge des Alexa 488-NHS-Esters abhing und bei dem entsprechenden Maleinimidderivat gar nicht auftrat.

Fluoreszenzeigenschaften von Alexa 488 gebunden an die DNA

Für jedes der eingesetzten Konstrukte wurde neben der DA-Probe stets die entsprechende D-Probe gemessen. Auf diese Weise können eventuelle lokale Quenchingeffekte sowie die Beweglichkeit des Donorfluorophors ohne den Einfluß der Akzeptorfluorophors untersucht werden, so daß eine sicherere Interpretation der FRET-Messungen möglich ist. Abb. 4.5 zeigt die Fluoreszenzlebensdauerverteilung des D-13 Konstrukts.

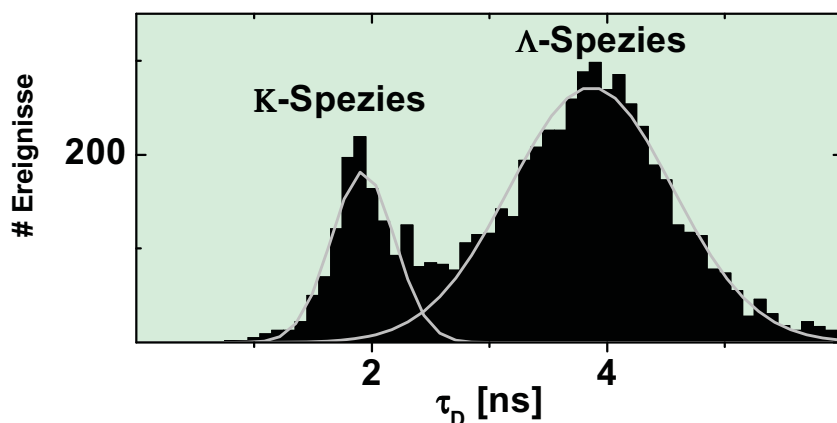


Abb. 4.5: Fluoreszenzlebensdauerverteilung des D-13 Konstrukts. Auch das gebundene Alexa 488 zeigt die beiden Lebensdauerzustände, die bereits beim freien Alexa 488 beobachtet wurden. Der Zustand mit der kurzen Fluoreszenzlebensdauer wird im Folgenden als K-Spezies (oder K-Zustand) bezeichnet, der mit der langen als Λ -Spezies.

Ist Alexa 488 an die DNA gebunden, werden im Einzelmolekülexperiment ebenfalls zwei Zustände mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern beobachtet. Das Auftreten von zwei Lebensdauerzuständen für einen Fluorophor, der an DNA gekoppelt ist, ist nicht neu. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für Rhodamin 6G an DNA beobachtet. Dabei wurden die beiden Zustände durch spezifische Wechselwirkungen des Rhodamin 6G mit der Nukleobase Guanin verursacht (Gaiko, 2002). Eine solche DNA-Fluorophor-Wechselwirkung kann in dem hier vorliegenden Fall als Ursache für die beiden definierten und über den Millisekundenbereich stabilen Lebensdauerzustände jedoch ausgeschlossen werden, da bereits der freie Fluorophor zwei Lebensdauerzustände aufweist (Abb. 4.4).

Speziesselktive-Auswertung

Trotz der elektrostatischen Abstoßung zwischen DNA und Alexa 488 können schwache Wechselwirkungen, die Fehler bei der Berechnung der FRET-Effizienz nach sich ziehen, nicht ausgeschlossen werden. Für eine genauere Analyse der Lebensdauerzustände wurde daher eine speziesselktive-Auswertung (Vgl. Kap. 3.3.5) durchgeführt. Durch die verbesserte Statistik und die damit verbundene höhere Zeitaufösung konnte nachgewiesen werden, daß sich sowohl die K-Spezies als auch die Λ -Spezies jeweils aus zwei Subzuständen zusammensetzt. Die Ergebnisse der Speziesselktiven-Auswertung für das D-13-Konstrukt können im einzelnen der folgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 4.1: Ergebnisse der speziesselktiven Auswertung für das D-13 Konstrukt:

	$A_{D1} (X_{D1})$	$\tau_{D1} [\text{ns}]$	$A_{D2} (X_{D2})$	$\tau_{D2} [\text{ns}]$
K-Spezies	0.35 (0.48)	1.3	0.65 (0.52)	2.2
Λ -Spezies	0.11 (0.21)	1.8	0.89 (0.79))	3.8

Die Substände werden hier, um konsistent mit der Nomenklatur in Kap. 3.6.1 zu bleiben jeweils mit den Indizes D1 und D2 gekennzeichnet. A und X entsprechen den fluoreszenz- bzw. speziessgewichteten Amplituden. Da die Subspezies bei einer Einzelmolekülmessung nicht mehr getrennt identifiziert werden können, muß Umwandlungsgeschwindigkeit zwischen den beiden Subzuständen schneller sein als die Diffusionszeit der Oligonukleotide durch das Detektionsvolumen. In einem solchen Fall wird im Einzelmolekülexperiment jeweils der fluoreszenzgewichtete Mittelwert der Lebensdauer τ_{av}^A gemessen, der nicht direkt zur Berechnung von Quantenausbeuten oder FRET-Effizienzen herangezogen werden kann, sondern zuvor in die speziessgewichtete mittlere Lebensdauer τ_{av}^X umgerechnet werden muß. Alle in Tabelle 4.1 auftretenden Fluoreszenzlebensdauern sind kürzer als die des freien Fluorophors, so daß von einer dynamischen Löschung als Ursache für die unterschiedlichen Subzustände ausgegangen werden kann. Daher kann zur Umrechnung von τ_{av}^A die in Kap. 3.6.1 beschriebene Prozedur angewendet werden. Die nach diesem Verfahren zur Berechnung von $\tau_{D(A),av}^X$ nach Gl. 3.40 notwendigen Faktoren a, b und c, die mit Hilfe der Daten aus Tabelle 4.1 ermittelt wurden sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben.

Tabelle 4.2 die Koeffizienten der Spezies Λ und K:

Λ -Spezies			K-Spezies		
a	b	c	a	b	c
-0.0176	1.0077	0.0006	-0.0446	1.0254	0.0030

Die Analyse weiterer D-Moleküle zeigte, daß sowohl die Amplituden als auch die Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Subspezies über die gesamte Molekülserie ähnliche Werte annehmen. Eine sequenzspezifische Interaktion zwischen Fluophor und DNA kann somit ausgeschlossen werden, so daß die für das D-13-Konstrukt ermittelten Werte der Koeffizienten a, b und c auf alle Messungen dieser Studie übertragen werden können.

Um die Einführung von zwei unterschiedlichen Lebensdauerachsen für die beiden Zustände K und Λ zu vermeiden wurden die Gleichungen 3.41 und 3.42 für die Berechnung des

Zusammenhangs zwischen F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ bzw. zur Berechnung der Iso-Effizienz-Linien in den $(F_D/F_A, \tau_{D(A)})$ -Histogrammen verwendet.

Donorquantenausbeuten

Die Donorquantenausbeuten $\Phi_{FD}(K)$ und $\Phi_{FD}(\Lambda)$ der beiden Zustände K und Λ werden aus den entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern nach Gl. 3.16 berechnet. Dazu werden die im Einzelmolekülexperiment bestimmten fluoreszenzgewichteten mittleren Lebensdauern $\tau_{D,av}^A$ zunächst nach Gl. 4.1 (Vgl. Gl. 3.40) in die entsprechenden speziesgewichteten Lebensdauern $\tau_{D,av}^X$ umgerechnet:

$$\tau_{D,av}^X = a \left(\tau_{D,av}^A \right)^2 + b \tau_{D,av}^A + c \quad \text{Gl. 4.1}$$

Die notwendigen Koeffizienten a, b und c können der Tabelle 4.2 entnommen werden. Als Referenz wurde jeweils die Fluoreszenzlebensdauer (4.0 ns) und Quantenausbeute (0.95) von Rhodamin 110 verwendet. Die Ergebnisse der Donorquantenausbeute-Bestimmung für alle DNA-Konstrukte ist in Tabelle 4.3 zusammengefaßt:

Tabelle 4.3: Donorfluoreszenzquantenausbeuten.

D-Molekül	$\Phi_{FD}(K)$	$\Phi_{FD}(\Lambda)$
D-3	0.40	0.82
D-4	0.39	0.80
D-5	0.40	0.82
D-6	0.41	0.82
D-9	0.40	0.82
D-11	0.39	0.82
D-13	0.40	0.80
D-15	0.37	0.74
D-17	0.38	0.75
D-18	0.39	0.75
D-20	0.41	0.81
D-22	0.41	0.79
D-36	0.40	0.77

4.3.2 Die Eigenschaften des Akzeptorfluorophors Cy5

Der Cyaninfarbstoff Cy5 verfügt wie Alexa 488 durch zwei Sulfonsäuregruppen, über eine negative Gesamtladung, so daß Wechselwirkungen mit der DNA weitestgehend vermieden werden. Charakteristisch für Cyaninfarbstoffe ist die intensive Absorption infolge eines $\pi - \pi^*$ Übergangs. Die Energiedifferenz zwischen den Orbitalen und damit die Wellenlänge der Absorption bzw. Fluoreszenz, ist abhängig von der Länge der Polymethinkette, die die beiden Kopfgruppen des Cyaninfarbstoffs verbindet (Kuhn, 1949; Schäfer, 1973). Generell gilt: Je mehr C-Atome in der Polymethinkette enthalten sind desto bathochromer sind Absorption und Emission verschoben. Die hohe Fluoreszenzquantenausbeute und Photostabilität sowie der große Extinktionskoeffizient und die geringe pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz machen die Cyaninfarbstoffe zu den am häufigsten eingesetzten extrinsischen Fluorophoren bei Fluoreszenzuntersuchungen.

Die Polymethinkette der Cyaninfarbstoffe liegt üblicher Weise in der all-trans-Konformation vor. Ähnlich wie beim Retinal während des Sehprozesses, kann durch Lichtabsorption die reversible Isomerisierung in die cis-Konformation ausgelöst werden (Abb. 4.2).

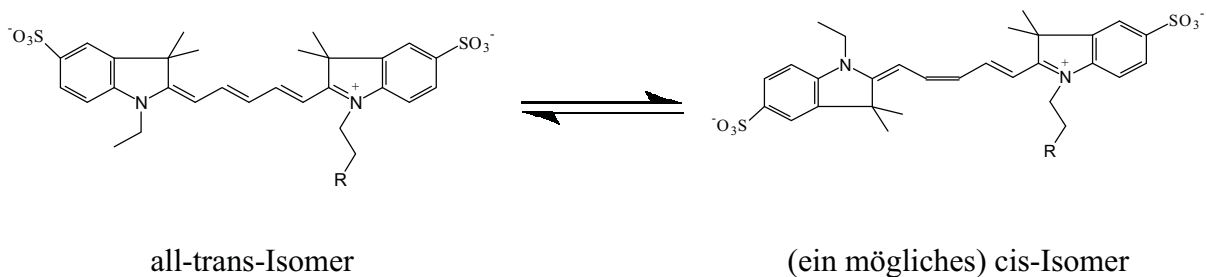


Abb. 4.6: all-trans und cis Form des Cy5

Die Absorptionseigenschaften des cis-Isomers sind im Vergleich zum all-trans-Isomer kaum verändert, jedoch ist die Fluoreszenzquantenausbeute so gering, daß das cis-Isomer als nicht fluoreszierend bezeichnet werden kann. Diese Eigenschaft stellt zunächst einen Nachteil dar, da die Fluoreszenzquantenausbeute der Cyaninfarbstoffe auf diese Weise herabgesetzt wird. In der Tat sind Cyanin-Farbstoffe synthetisiert worden, die nicht mehr in die cis-Form übergehen können (Denovo Biolabels GmbH, Münster). Andererseits ist die Isomerisierungsreaktion nichts anderes als ein hell (trans) – dunkel (cis)-Prozeß, ähnlich wie der Übergang vom Singulett in den Triplettzustand, so daß sich die Kinetik der Isomerisierung mit der FCS untersuchen läßt.

Da das cis-Isomer nicht fluoresziert aber dennoch FRET-aktiv ist, kann dieser Prozeß zur Messung von FRET-Effizienzen mit Hilfe der FCS verwendet werden. Dabei wird die Tatsache genutzt, daß die Geschwindigkeit der photoinduzierten Isomerisierungsreaktion stark von der Anregungsintensität abhängt (Widengren, 2001). Bei diesem Effekt spielt es keine Rolle, ob die Anregung wie üblich direkt von einem Laser ausgeht oder ob Cy5 über einen Donor via FRET angeregt wird. Daher ist die aus der FCS-Analyse bestimmte Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung direkt proportional zur FRET-Effizienz. Eine ausführliche Beschreibung dieser interessanten Variante zur Bestimmung von FRET-Effizienzen findet sich bei (Widengren, 2001).

Bestimmung der Akzeptorquantenausbeute

Im Gegensatz zum Donor befindet sich Cy5 für alle verwendeten Konstrukte an der gleichen Position am Oligonukleotid (5'-Ende) und somit in der gleichen Mikroumgebung, so daß es prinzipiell ausreicht die Quantenausbeute für ein Konstrukt zu bestimmen. Die Quantenausbeute von Cy5 am Oligonukleotid wurde nach der in Kap. 3.2.6 beschriebenen Vorgehensweise mit Hilfe von Spektrometermessungen bestimmt und beträgt 40%.

Bezüglich der Cyanin Farbstoffe wurde bereits auf die Problematik der cis-trans-Isomerisierung eingegangen. Der Anteil des nicht fluoreszierenden cis-Isomers hat entscheidenden Einfluß auf die Quantenausbeute des Cy5. Im Vergleich zu Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop ist die Anregungsintensität bei Spektrometermessungen um Größenordnungen niedriger. Bei solch geringen Anregungsintensitäten spielt die cis-trans-Isomerisierung keine Rolle und Cy5 liegt fast vollständig als all-trans-Isomer vor. Bei den hohen Anregungsintensitäten die am Fluoreszenzmikroskop auftreten stellt sich dagegen ein Gleichgewicht zwischen cis- und all-trans-Isomer ein, dessen Gleichgewichtskonstante für freies, direkt angeregtes Cy5 über weite Bereiche unabhängig von der Anregungsintensität ca. 0.5 beträgt (Khimenko, 1997). Das heißt, nur noch 50% der Moleküle liegen als fluoreszierendes all-trans-Isomer vor, mit der Folge, daß die Quantenausbeute bezogen auf die Gesamtpopulation des Cy5 nur 20% beträgt.

Überraschender Weise konnten FCS-Untersuchungen der Isomerisierungsreaktion des an die DNA gebundenen und via FRET angeregten Cy5 zeigen, daß neben der erwarteten Abhängigkeit der Geschwindigkeits- auch die Gleichgewichtskonstante der Isomerisierungsreaktion von der FRET-Effizienz abhängt (Widengren, 2001). Um dieser

Tatsache bei der Bestimmung der Akzeptorquantenausbeute Rechnung zu tragen wurde der Faktor a_{trans} eingeführt, der den Anteil des all-trans-Isomers widerspiegelt. Dieser Faktor wurde im Rahmen einer FCS-Messung für jedes DA-Konstrukt separat ermittelt und daraus nach Gl 4.2 jeweils die effektive Quantenausbeute $\Phi_{\text{FA, eff}}$ bestimmt.

$$\Phi_{\text{FA, eff}} = a_{\text{trans}} \Phi_{\text{FA}} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Die entsprechenden, im Rahmen dieser Studie bestimmten, effektiven Quantenausbeuten, sowie der jeweils verwendete Faktor a_{trans} sind in der Tabelle 4.4 aufgeführt.

Tabelle 4.4: Die Akzeptorquantenausbeuten unter Berücksichtigung der cis-trans-Isomerisierung

Konstrukt	a_{trans}	$\Phi_{\text{FA, eff}}$	Konstrukt	a_{trans}	$\Phi_{\text{FA, eff}}$
DA-3	0.87	0.36	DA-13	0.78	0.32
DA-4	0.85	0.35	DA-15	0.76	0.31
DA-5	0.84	0.35	DA-17	0.74	0.30
DA-6	0.84	0.34	DA-18	0.74	0.30
DA-9	0.82	0.34	DA-20	0.76	0.32
DA-11	0.81	0.33	DA-22	0.78	0.31

4.3.3 Die Heterogenität der Proben

Bevor die eigentlichen Resultate der Messungen wie FRET-Effizienzen und Abstände vorgestellt werden, soll an dieser Stelle kurz auf einen weiteren nicht zu unterschätzenden Vorteil von FRET-Messungen auf Einzelmolekülebene eingegangen werden:

In Hinblick auf verlässliche Ensemble-FRET-Messungen ist die Reinheit und Homogenität der Proben eines der größten Probleme. Mit großer Sorgfalt müssen alle Moleküle, die nur einen Fluorophor tragen aus der FRET-Probe entfernt werden, da ansonsten zu niedrige oder zu hohe FRET-Effizienzen berechnet werden. Abb. 4.7 zeigt, daß diese Schwierigkeit bei Messungen auf Einzelmolekülebene umgangen werden kann:

In den Abb. 4.7 sind die zweidimensionalen Häufigkeitsdiagramme mit den Zählraten für den grünen (Donor) als und den roten (Akzeptor) Spektralbereich als x- und y-Koordinate, für die Einzelmolekülmessungen des DA-18-Konstrukts dargestellt. Abb. 4.7 A zeigt das Ergebnis

der Einfarbenanregung (Anregungswellenlänge, $\lambda_{\text{EX}} = 496.5$ nm) und Abb. 4.7 B gibt das Resultat der Zweifarbenanregung ($\lambda_{\text{EX}} = 496.5$ und 647.5 nm) wieder.

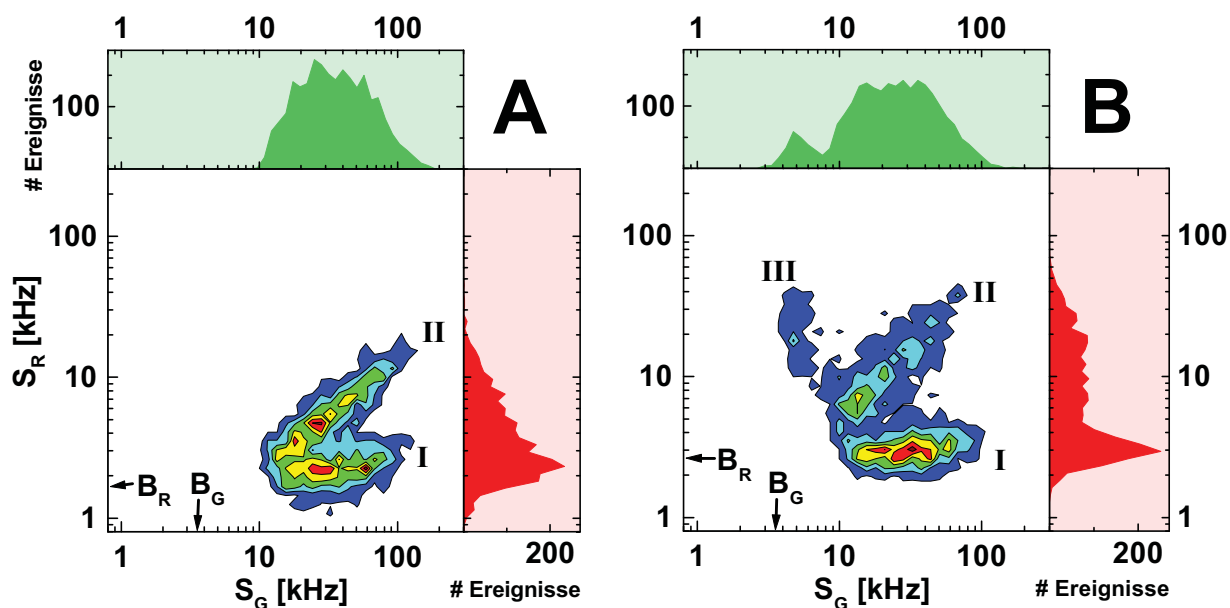


Abb. 4.7 (S_G, S_R)-Häufigkeitshistogramme. Die eindimensionalen Häufigkeitshistogramme sind als Projektionen oberhalb (S_G) und links neben (S_R) dem zweidimensionalen Feld gegeben. Dargestellt ist das Ergebnis der Messung des DA-18 Konstrukts mit A) Einfarbenanregung bei 496 nm und B) Zweifarbenanregung bei 496 und 647 nm. Die Schwarzen Pfeile zeigen jeweils die Untergrundzählrate an. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Probe wurde nach der Hybridisierung nicht weiter aufbereitet oder gereinigt, so daß bei Einfarbenanregung zwei definierte Populationen beobachtet werden. Population I weist eine hohe Intensität im grünen Spektralbereich S_G auf, während im roten Spektralbereich die Intensität unwesentlich über der des Untergrunds liegt. Diese Population ist auf Moleküle zurückzuführen, die ausschließlich den Donorfluorophor (D-Moleküle) tragen. Die FRET-aktiven Moleküle, die mit beiden Fluorophoren markiert sind (DA-Moleküle), sind in Abb. 4.7 als Spezies II gekennzeichnet. Diese Population zeichnet sich durch Zählraten aus, die sowohl im grünen als auch im roten Spektralbereich deutlich über den entsprechenden Untergrundzählraten liegen, die durch die schwarzen Pfeile angezeigt werden.

Bei Zweifarbenanregung wird der Akzeptor nicht nur über den Donor via FRET sondern zusätzlich durch den Krypton-Ionen-Laser, der bei einer Wellenlänge von 647 nm betrieben wird, direkt angeregt. Dementsprechend tritt in Abb. 4.7 B neben den Populationen I und II, die bereits bei der Einfarbenanregung beobachtet werden, noch eine dritte Population (Spezies III) mit einer hohen Zählrate S_R und einer niedrigen Zählrate S_G auf. Diese Population wird

durch die Moleküle verursacht, die ausschließlich mit dem Akzeptor Farbstoff (A-Moleküle) markiert sind.

Die Fraktion der D-Moleküle ist verglichen mit der der A-Moleküle groß. Die Ursache dafür kann unvollständige Markierung der 2'-Desoxyoligonukleotide mit Cy5 oder ein Verlust des Akzeptorfluorophors, während der Markierungsreaktion sein. Auch die Existenz einer photoinaktiven Form des Cy5 kann nicht ausgeschlossen werden. Hingegen kann das Vorliegen von Einzelsträngen durch nicht vollständige Hybridisierung als Grund für das Auftreten der D- und A-Moleküle ausgeschlossen werden, da mit Hilfe einer nativen PAGE Gelelektrophorese nachgewiesen wurde, daß der Einzelstranganteil in der Probe unter 5% lag (Daten hier nicht gezeigt).

Trotz der Heterogenität der Probe bietet die Einzelmolekülspektroskopie die Möglichkeit die Einzelmolekülereignisse die von DA-Molekülen herrühren aus der Datenspur zu selektieren und die weitere Auswertung gezielt auf diese Ereignisse zu beschränken. Wenn man so will kann hier von einer „Software“-Aufreinigung gesprochen werden.

Vergleicht man die Positionen der DA-Moleküle in den (S_G, S_R)-Histogrammen bei Ein- und Zweifarbenanregung, wird der Vorteil der Zweifarbenanregung bei der Bestimmung besonders niedriger FRET-Effizienzen deutlich. Durch die zusätzliche Anregung des Akzeptorfluorophors werden die FRET-aktiven DA-Moleküle besser von den D-Molekülen separiert, so daß die DA-Moleküle effektiver selektiert werden können. Auf diesen Vorzug der Zweifarbenanregung wird im Folgenden noch einmal eingegangen.

4.3.4 Bestimmung des Försterradius R_0

Beweglichkeit der Fluorophore

Für die Bestimmung von R_0 muß zunächst die Beweglichkeit der Fluorophore untersucht werden, um zu entscheiden ob und in welcher Hinsicht Orientierungseffekte (κ^2) berücksichtigt werden müssen. In Kap. 3.4.4 wurde gezeigt, daß aus Einzelmolekülmessungen die Beweglichkeit von Fluorophoren in Form der Rotationskorrelationszeit ρ abgeschätzt werden kann. Das für die Bestimmung der Rotationskorrelationszeit des Donorfluorophors im D-13-Konstrukt erforderliche (τ_D, r_D)-Histogramm ist in Abb. 4.8 A wiedergeben.

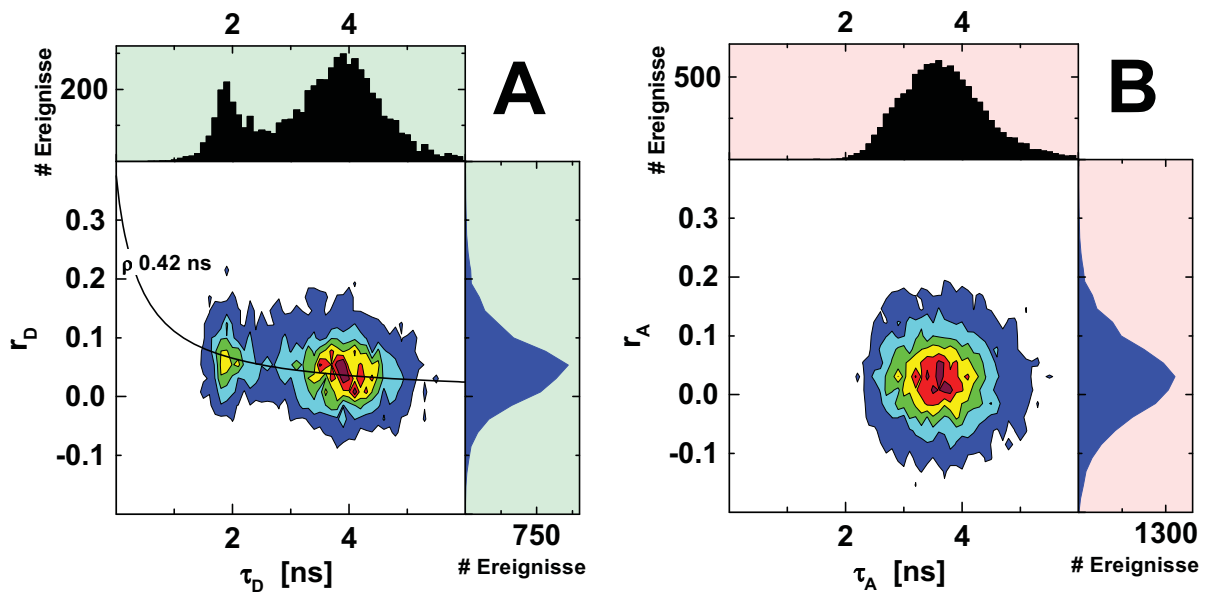


Abb. 4.8: (τ_D, r_D) -Häufigkeitshistogramme. A) zeigt die Daten für den Donor im D-13-Konstrukt. Die schwarze Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen r und τ nach der Perringleichung an mit $\rho = 0.42$ ns und $r_0 = 0.375$. B) zeigt die Daten für den Akzeptor im DA-13 Konstrukt angeregt via FRET.

Aus der Abb. 4.8 A kann für beide Fluoreszenzlebensdauerzustände des Donorfluorophors eine Rotationskorrelationszeit ρ von 0.42 ns abgeschätzt werden. Bei der Interpretation ist zu beachten, daß im Einzelmolekülexperiment eine mittlere Rotationskorrelationszeit bestimmt wird, die letztlich auf mehrere Bewegungsformen zurückgeführt werden kann. Im Fall der vorliegenden DNA-Moleküle ergeben sich mindestens drei Formen der Bewegung:

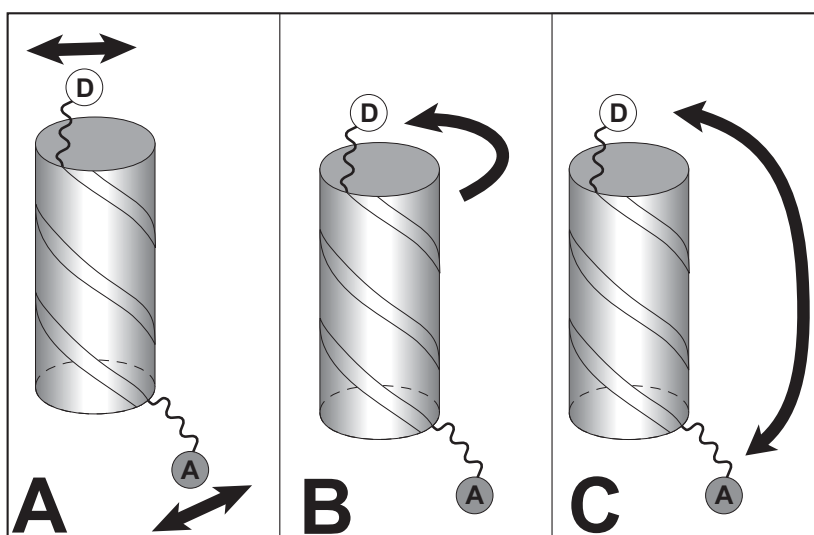


Abb 4.9: Bewegungsformen der Donor und Akzeptorfluorophore an DNA. A) zeigt die lokale Bewegung der Fluorophore; B) die Rotation der DNA um die Helixachse und C) die Rotation senkrecht zur Helixachse.

Für relative Orientierung des Donor- und Akzeptorfluorophors zueinander, die für κ^2 entscheidend ist, spielen die globalen Formen der Bewegung die in Abb. 4.9 A und B dargestellt sind keine Rolle. Das Molekulargewicht der DNA (≈ 11.6 kD) ist sehr viel größer als das des Alexa-Fluorophors (≈ 0.6 kD). Die globale Bewegung der DNA sollte deshalb langsam im Vergleich zur Fluorophorbewegung sein (Für ein DNA-Molekül vergleichbarer Größe wurde eine Rotationskorrelationszeit von ≈ 10 ns gemessen (Schaffer, 2000)). Daher ist Rotationskorrelationszeit der lokalen Bewegung des Fluorophors geringer als der durchschnittliche Werte von 0.42 ns und ist Vergleichbar mit der Rotationskorrelationszeit des freien Fluorophors von etwa 0.2 ns. Mit der freien Beweglichkeit des Donorfluorophors ist die erste Bedingung für die Gültigkeit der Näherung $\kappa^2 = 2/3$ erfüllt. Jedoch wird für diese Näherung die freie Beweglichkeit beider Fluorophore gefordert.

Die sicherste und effizienteste Methode zur Überprüfung der freien Beweglichkeit von Donor und Akzeptor ist die Messung der Akzeptoranisotropie bei Anregung des Akzeptors via FRET. Ein besonderer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die entsprechenden Daten direkt aus der Messung gewonnen werden können, die auch zur Bestimmung der FRET-Effizienz dient, so daß die Anisotropie für eventuelle FRET-Subpopulationen separat bestimmt werden kann.

Weiterhin spiegelt der Anisotropiezerfall bei Anregung des Akzeptors via FRET gleichzeitig die Donor und Akzeptorbeweglichkeit wider. Und zwar trägt die Donorbewegung nach der Absorption bis zum Transfer der Energie zum Anisotropiezerfall bei. Der restliche Beitrag wird durch die Bewegung des Akzeptors nach dem Energietransfer bis zur Emission verursacht. Daher kann mit Hilfe einer Messung die Beweglichkeit beider Fluorophore beurteilt werden.

Das Ergebnis einer Messung der Akzeptoranisotropie bei Anregung via FRET ist in Abb. 4.8 B für das DA-13-Konstrukt dargestellt. Die Anisotropieverteilung hat ihr Maximum nahe Null und reflektiert die hohe Mobilität der Fluorophore. Da die Lebensdauer τ_A aus den in Kap. 3.2.4 genannten Gründen, nicht die tatsächliche Fluoreszenzlebensdauer des Akzeptorfluorophors widerspiegelt ist die Perringleichung hier nicht gültig. Daher kann aus Abb. 4.8 B keine Rotationskorrelationszeit abgeleitet werden.

Als Fazit der Anisotropiemessungen bleibt festzuhalten, daß sowohl die Donor als auch die Akzeptoranisotropie bei FRET-Anregung auf eine nahezu uneingeschränkte Beweglichkeit

beider Fluorophore am Oligonukleotid hinweisen. Daher ist die Näherung $\kappa^2 = 2/3$ für die Berechnung von R_0 bzw. R_{0r} im Rahmen dieser Studie zulässig.

Berechnung der Försterradien des Λ - und K -Zustandes

Während der reduzierte Försterradius R_{0r} unabhängig von der Donorquantenausbeute für beide Lebensdauerspezies 53 Å beträgt (Vgl. Tabelle 3.3) muß der Försterradius R_0 für die beiden Donor-Lebensdauerzustände aufgrund der unterschiedlichen Quantenausbeuten separat bestimmt werden. Gemäß Gl. 2.14 und unter Berücksichtigung der Werte in Tabelle 3.3 errechnet sich für den K -Zustand ($\Phi_{FD, K} = 0.40$) ein durchschnittliches R_0 von 46 Å und für den Λ -Zustand ($\Phi_{FD, \Lambda} = 0.80$) ein R_0 von 51 Å.

4.3.5 Die Bestimmung der FRET-Effizienz

Die FRET-Effizienzen für die einzelnen DA-Konstrukte werden aus den entsprechenden (F_D/F_A , $\tau_{D(A)}$)-Histogrammen ermittelt. In den Abbildungen 4.10 A-D sind als repräsentative Beispiele die (F_D/F_A , $\tau_{D(A)}$)-Histogramme für die Messung der DA-6, DA-9, DA-13 und DA-15-Konstrukte gegeben. Die folgende Diskussion erfolgt auf der Grundlage der in Kap. 3.4.2 ausgeführten Überlegungen.

In jedem Histogramm sind mehr oder weniger deutlich zwei Verteilungen mit einem Intensitätsverhältnis F_D/F_A von über 100 zu beobachten. Diese sind auf die beiden Lebensdauerzustände Λ und K , des Alexa 488 der zusätzlich in der Probe befindlichen D-Moleküle zurückzuführen.

Die FRET-aktiven Moleküle zeigen demgegenüber eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ und ein verringertes Intensitätsverhältnis F_D/F_A . Erwartungsgemäß folgen die Verteilungen den schwarzen sigmoiden Kurven bei der Abnahme von Δ_{bp} von rechts oben nach links unten. Diese Kurven spiegeln die Beziehung zwischen $\tau_{D(A)}$ und F_D/F_A , für den jeweiligen Lebensdauerzustand K und Λ wider.

Bei Molekülen mit größerem Abstand zwischen Donor und Akzeptor (DA-13 und DA-15, Abb. 4.10) sind die Verteilungen der FRET-aktiven Molekül im (F_D/F_A , $\tau_{D(A)}$)-Histogramm horizontal stark verbreitert. Diese Verbreiterung wird durch die unterschiedlichen Fluoreszenzquantenausbeuten der Donorzustände K und Λ ausgelöst, die offensichtlich beide FRET-aktiv sind. Aus der Tatsache, daß sich die FRET-Verteilungen beider Zustände auf

einer horizontalen Linie befinden, kann abgeleitet werden, daß sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor beider Donorzustände nicht unterscheidet.

Gemäß dem Verlauf der sigmoiden Kurven wird der Unterschied zwischen dem Λ - und K-Zustand mit abnehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor zunehmend geringer, so

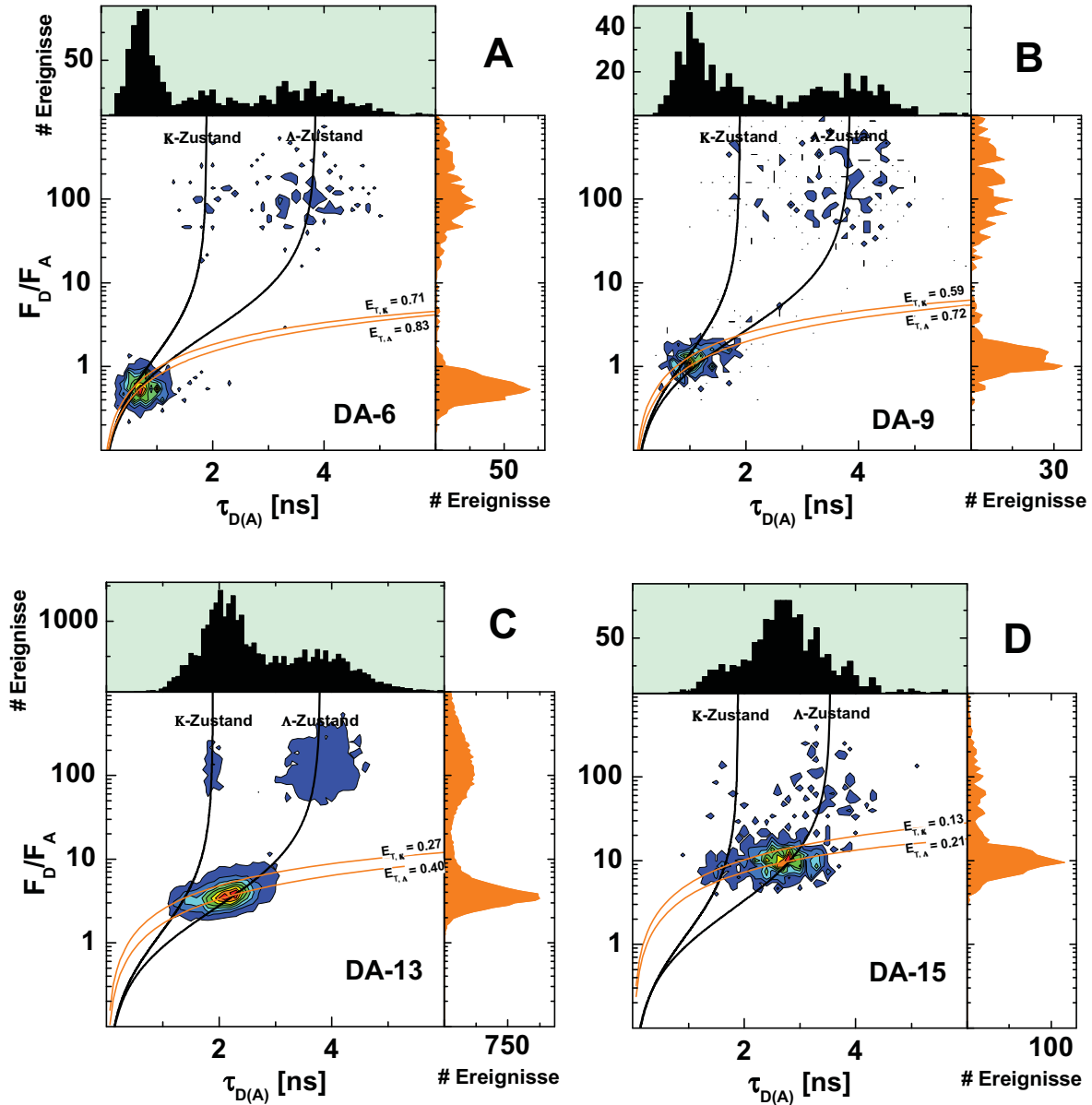


Abb. 4.10: $(F_D/F_A, \tau_{D(A)})$ -Histogramme für die A) DA-6, B) DA-9, C) DA-13 und D) DA-15-Konstrukte. Die entsprechenden eindimensionalen Histogramme sind jeweils als Projektionen angegeben. Folgende Parameter wurden zur Berechnung der Iso-Effizienz- und der sigmoiden Linien (Gl. 3.25 und 3.24) verwendet: Für alle Konstrukte beträgt k_F : 0.23 ns^{-1} ; die jeweiligen Werte für Φ_{FD} und Φ_{FA} sind im Einzelnen den Tabellen 4.3 und 4.4 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

daß die beiden Verteilung bei kurzen Abständen schließlich zu einer verschmelzen (DA-6, Abb. 4.10).

Die FRET-Effizienzen für die beiden Spezies sind jeweils durch den Schnittpunkt der orangen Iso-Effizienz-Linie und der jeweiligen sigmoiden Kurve abschätzen. Die detaillierte Beschreibung dieses Verfahrens zur Bestimmung der FRET-Effizienzen, sowie die Gleichungen zur Berechnung der Iso-Effizienz- und der sigmoiden-Kurve ist in Kap. 3.4.2 dargestellt. Für eine exaktere Bestimmung können die FRET-Effizienzen alternativ dazu nach Gl. 3.17 B aus dem F_D/F_A -Verhältnis berechnet werden, welches wiederum aus den entsprechenden eindimensionalen Histogrammen abgelesen wird. Das letztere Verfahren wurde zur Ermittlung der Werte in Tabelle 4.5 verwendet. Die unterschiedlichen FRET-Effizienzen ($E_{T, K}$ und $E_{T, \Lambda}$) für den K und den Λ -Zustand werden dabei durch die unterschiedlichen Donorquantenausbeuten verursacht.

Tabelle 4.5: FRET-Effizienzen und Abstände der untersuchten Konstrukte.

Konstrukt	$E_{T,K}$	$E_{T,A}$	R_{DA} [Å]
DA-3	0.89	0.94	29.0
DA-4	0.87	0.93	32.7
DA-5	0.80	0.89	36.2
DA-6	0.71	0.83	38.9
DA-9	0.59	0.72	43.5
DA-11	0.44	0.55	47.5
DA-13	0.28	0.4	54.5
DA-15	0.13	0.21	62.5
DA-17	0.07	0.10	68.8
DA-18	0.08	0.12	71.3
DA-20	0.07	0.09	76.1
DA-22	0.04*	0.04*	86.0*
DA-36	0.00*	0.00*	> 100

* Werte wurden aus Zweifarbenanregungs-Experimenten gewonnen

Bestimmung von FRET-Effizienzen < 10%

Bei der Anwendung der Einfarbenanregung sind besonders kleine FRET-Effizienzen schwierig zu bestimmen (Eggeling, 1999). Unter diesen Bedingungen sind die DA-Moleküle nur noch sehr schwer von den D-Molekülen zu unterscheiden. Die untere Grenzen für die Bestimmbarkeit der FRET-Effizienzen mit Hilfe der Einfarbenanregung wird dabei durch das Verhältnis F_D/F_A der D-Moleküle vorgegeben und liegt bei den hier beschriebenen Studien in etwa bei $E_T = 5-10\%$. Mit Hilfe der Kombination von Einzelmolekülspektroskopie und zweifarben Anregung können die FRET-aktiven DA-Moleküle von den D-Molekülen selbst dann unterschieden werden, wenn die FRET-Effizienz nahe Null ist:

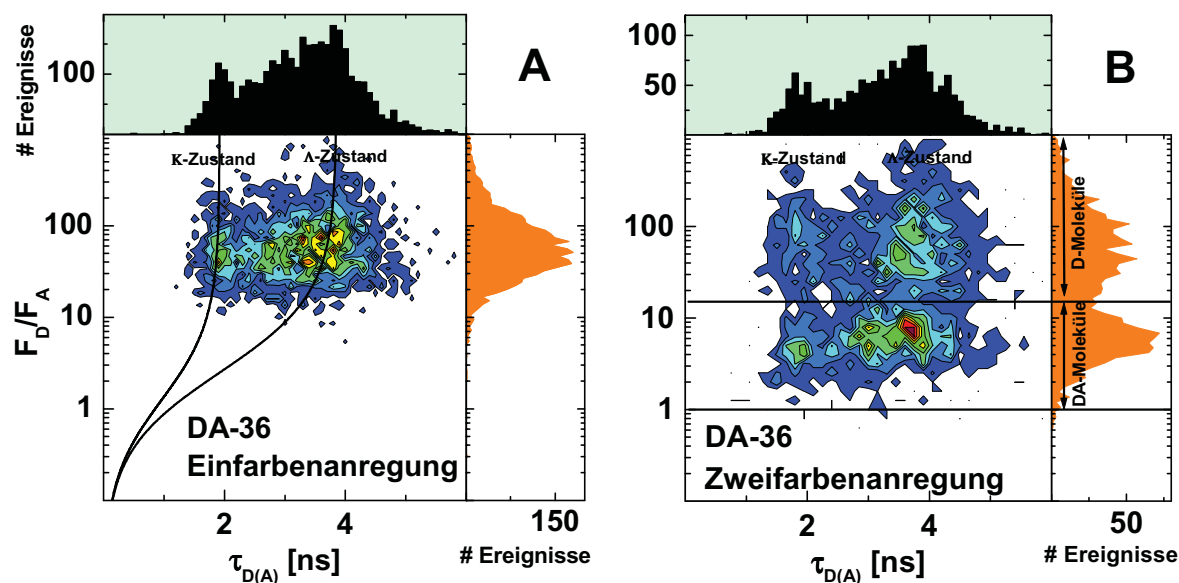


Abb. 4.11: FRET-Konstrukt DA-36 bei Zweifarbenanregung. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist in diesem Fall so groß, daß die FRET-Effizienz kleiner als 1% ist. A) zeigt die Probe bei Einfarbenanregung ($\lambda_{\text{Ex}} = 496.5 \text{ nm}$). In diesem Fall sind DA und D-Molekülen nicht differenzierbar. B) Erst wenn der Akzeptor zusätzlich mit dem Krypton-Ionen-Laser ($\lambda_{\text{Ex}} = 647 \text{ nm}$) angeregt wird lassen sich die DA-Moleküle anhand der höheren Zählrate S_R im roten Spektralbereich (kleineres Verhältnis F_D/F_A) von den D-Molekülen unterscheiden. Die sigmoiden Linien sind bei zweifarbenanregung nicht mehr gültig.

Wird dabei die Anregungsintensität für den Akzeptorfarbstoff so moderat gewählt, daß Sättigungseffekte ausgeschlossen werden können, kann bei der zweifarben Anregung die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ des Donorfluorophors nach Gl. 3.17 A zur Berechnung der FRET-Effizienz genutzt werden. Mit dieser Methode kann der Empfindlichkeitsbereich von FRET-Untersuchung auf Abstände die größer sind als $1.5 R_0$ ausgedehnt werden.

Mit Hilfe der Zweifarbenanregung wurde die FRET-Effizienz für das DA-22-Konstrukt bestimmt, die in Tabelle 4.5 angegeben ist, und es konnte nachgewiesen werden das die Transferrate im Fall des DA-36-Konstrukts vernachlässigbar gering ist.

4.3.6 Bestimmung der Fluorophorposition

Um die Position des Donor und Akzeptorfarbstoff zu ermitteln werden die Meßergebnisse mit einer Funktion angepaßt, die auf der Grundlage des vereinfachten zylindrischen Modell der B-DNA entwickelt wurde (Clegg, 1993), das in Abb. 4.12 wiedergegeben ist.

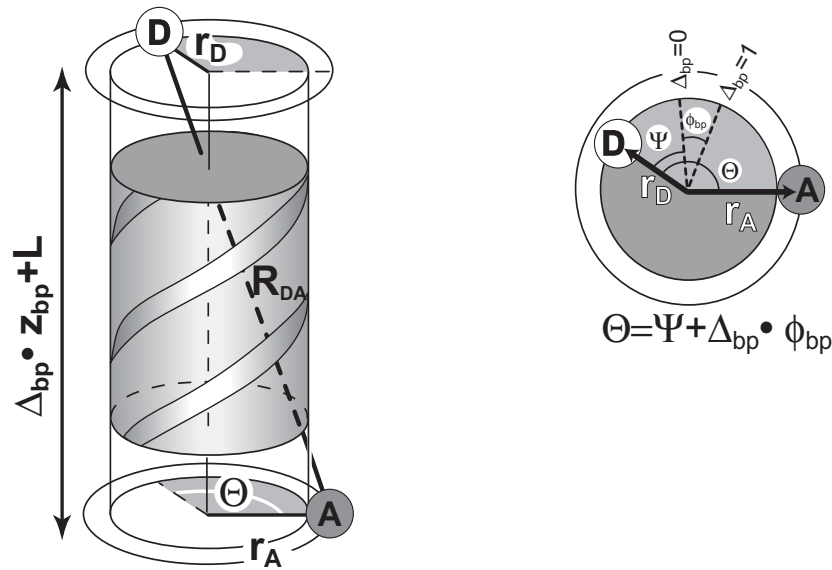


Abb. 4.12: Schematische Darstellung des helikalen Modells der DNA, A) in der Seitenansicht und B) in der Aufsicht. R_{DA} ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. r_D und r_A sind die Abstände zwischen der Helixachse in der Mitte des Zylinders und Donor bzw. Akzeptor. $L + \Delta_{bp} z_{bp}$ ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor projiziert auf die Helixachse. Dabei ist z_{bp} der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basenpaaren, der für gewöhnliche B-DNA 3.4 \AA beträgt. Der Abstand L („Offset“) berücksichtigt, daß die Farbstoffe sich oberhalb bzw. unterhalb der Ebene des Basenpaares befinden können, an das sie gebunden sind. $\theta = \Psi + \Delta_{bp} \phi_{bp}$ beschreibt den Gesamtwinkel zwischen den Vektoren r_A und r_D . Dabei ist ϕ_{bp} der Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basenpaaren (36° für B-DNA) und Ψ entspricht dem Winkel zwischen r_A und r_D für den Fall, daß sich Donor und Akzeptor an demselben Basenpaar befinden ($\Delta_{bp} = 0$).

Nach diesem Modell läßt sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor in Abhängigkeit von der Anzahl Δ_{bp} der separierenden Basenpaare nach Gl. 4.3 berechnen:

$$R_{DA} = \sqrt{(L + \Delta_{bp} \cdot z_{bp})^2 + (r_A^2 + r_D^2 - 2r_A r_D \cdot \cos(\Psi + \Delta_{bp} \cdot \phi_{bp}))} \quad \text{Gl. 4.3}$$

Aus Gl. 4.3 ergibt sich unter Berücksichtigung der Gl. 2.13 ein Ausdruck für die FRET-Effizienz in Abhängigkeit von Δ_{bp} :

$$E_T = \left[\frac{\left[(L + \Delta_{bp} \cdot z_{bp})^2 + (r_A^2 + r_D^2 - 2r_A r_D \cdot \cos(\Psi + \Delta_{bp} \cdot \phi_{bp})) \right]^3}{R_0^6} + 1 \right]^{-1} \quad \text{Gl. 4.4}$$

Die Zunahme des Abstands R_{DA} mit der Anzahl Δ_{bp} der separierenden Basenpaare besteht aus einer Komponente entlang der Helixachse ($L + \Delta_{bp} z_{bp}$), die mit Δ_{bp} linear zunimmt. Die zweite Komponente ist abhängig von den Abständen r_A und r_D sowie dem Winkel Θ und beschreibt die Bewegung der Fluorophore senkrecht zur Helixachse. Diese Bewegung ist sinusförmig moduliert. Aus dieser Komponente resultiert eine betonte Nichtlinearität der Abstandszunahme für kleine Δ_{bp} . Der Einfluß der Modulation auf die Entwicklung von R_{DA} nimmt jedoch schnell mit zunehmendem Δ_{bp} ab. Dieses Verhalten überträgt sich entsprechend auf E_T . Befindet sich einer der beiden Fluorophore auf der Helixachse (r_A oder $r_D = 0$) wird der Ausdruck $2r_A r_D \cos(\Theta)$ null, so daß in diesem Fall keine sinusförmige Modulation beobachtet wird, oder umgekehrt: je weiter entfernt beide Fluorophore von der Helixachse sind desto stärker ist die Modulation.

Durch Anpassung der Funktion, die durch Gl. 4.2 beschrieben wird, an die Meßdaten lassen sich Werte für die Parameter r_D , r_A , Ψ und L bestimmen. Abb. 4.13 zeigt die gemessenen FRET-Effizienzen aus Tabelle 4.5 für die unterschiedlichen Abstände als Funktion von Δ_{bp} . Da Alexa 488 zwei Lebensdauerspezies aufweist gibt es für jeden Abstand zwei Werte für die FRET-Effizienz. Anhand der $(F_D/F_A, \tau_{D(A)})$ -Histogramme konnte nachgewiesen werden, daß der Abstand R_{DA} zwischen Donor und Akzeptor für die unterschiedlichen Lebensdauerspezies des Alexa 488 identisch ist.

Dies rechtfertigt die Annahme, daß die beiden Lebensdauerspezies sich bezüglich der Position relativ zur DNA nicht unterscheiden, so daß eine globale Anpassung für beide Spezies sinnvoll erscheint. Das heißt, die geometrischen Parameter werden für beide Spezies gemeinsam angepaßt. Lediglich R_0 ist aufgrund der unterschiedlichen Quantenausbeuten der beiden Donorzustände verschieden und wird für die Anpassung für die Λ -Spezies auf 51 Å und für die K-Spezies auf 46 Å fixiert.

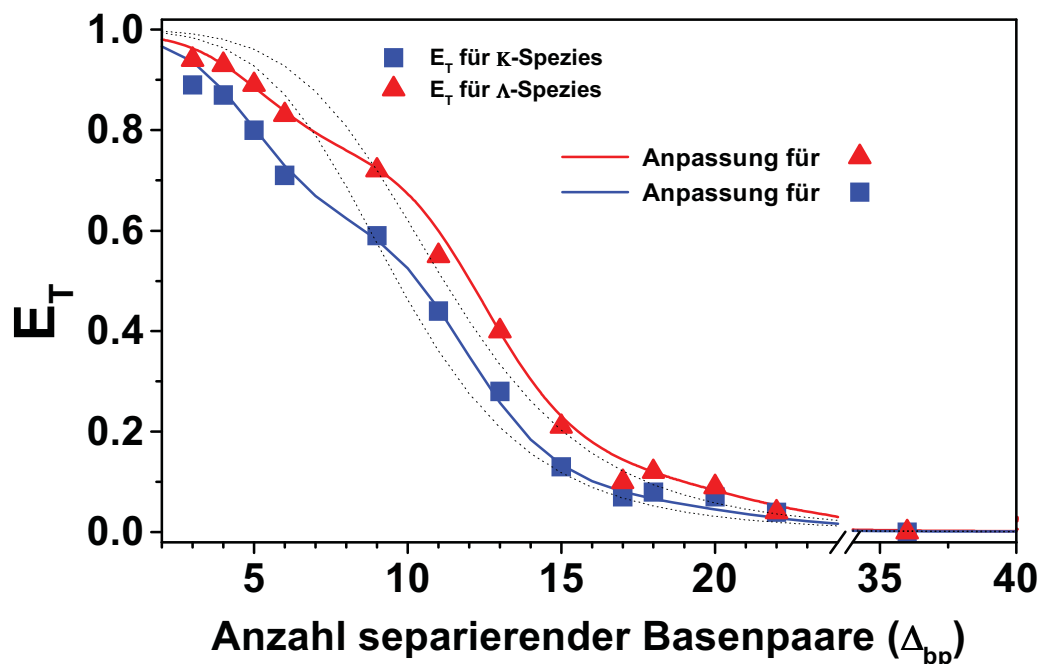


Abb. 4.13: FRET-Effizienz als Funktion der separierenden Basenpaare Δ_{bp} . Die Quadrate geben die Effizienzen der λ -Spezies und die Kreise die der κ -Spezies für die unterschiedlichen Abstände an (Vgl. Tabelle 4.5). Die Linien resultieren aus einer globalen Anpassung an die Meßwerte nach Gl 4.4. Die Anpassung liefert für r_A $3.5 \pm 0.8 \text{ \AA}$, für r_D $26.6 \pm 1.5 \text{ \AA}$, für L $4.3 \pm 1.1 \text{ \AA}$, und für Ψ $320^\circ \pm 9^\circ$. Die Parameter z_{bp} und ϕ_{bp} wurden mit 3.4 \AA und 36° für B-DNA vorgegeben. Die gestrichelten Kurven kennzeichnen jeweils den Verlauf für $r_A = 0$, also ohne den Einfluß der Helizität wieder. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Für z_{bp} und ϕ_{bp} wurden die für B-DNA typischen Werte 3.4 \AA und 36° eingesetzt und bei der Anpassung festgehalten. Die Daten für das DA-3 Konstrukt wurden bei der Anpassung nicht berücksichtigt, da FCS-Messungen auf eine Störung des FRET bei diesem Konstrukt hingedeutet hatten (Widengren, 2001). Bei diesen geringen Abständen werden zu FRET konkurrierende Energietransferprozesse beobachtet (Gilbert, 1991). Ferner wurden die Werte des DA-17 Duplex nicht in die Anpassung einbezogen. Bei diesem Konstrukt befindet sich der Donorfluorophor am Ende des Duplexes und nicht wie bei allen anderen Konstrukten in der Sequenz. Dadurch unterscheiden sich die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen DNA und Fluorophor bei dem DA-17 Konstrukt von denen der anderen Konstrukte. Dies erklärt auch die Abweichung der gemessenen FRET-Effizienzen von den Werten, die nach der Anpassung für dieses Konstrukt erwartet werden.

Deutlich ist die sinusförmige Modulation im Verlauf der FRET-Effizienzen bei kleinen Abständen ($\Delta_{bp} < 10$) erkennbar. Diese Modulation zeigt an, daß sich weder Donor noch Akzeptor auf der Helixachse befinden. Um dies zu veranschaulichen zeigen die gestrichelten

Kurven den Verlauf für $r_A = 0$. Die globale Anpassung ergibt für den Akzeptor einen Abstand r_A von $3.5 \pm 0.8 \text{ \AA}$ und für den Donor einen Abstand r_D von $26.6 \pm 1.5 \text{ \AA}$, wobei unter Berücksichtigung der Linkerlänge und dem Durchmesser der DNA, ein maximaler Abstand für r_A und r_D von 28 \AA vorgegeben wurde. Bei der Interpretation der Abstände r_A und r_D ist darauf zu achten, daß die Kovarianz der beiden Parameter sehr ausgeprägt ist. Mit anderen Worten, man erhält die identische Anpassung wenn die Werte von r_D und r_A gegeneinander ausgetauscht werden.

Der „Offset“ L von $4.3 \pm 1.1 \text{ \AA}$ zeigt an, daß zumindest einer der beiden Fluorophore sich nicht auf einer Ebene mit dem Basenpaar befindet an das er gebunden ist. Das hat zur Folge, daß der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren stets größer ist, als der Abstand der aufgrund der Anzahl Δ_{bp} der separierenden Basenpaare zu erwarten ist.

Insgesamt stimmen die angepaßten Parameter sehr gut mit Vorstellung überein, daß die Farbstoffe sich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung möglichst weit vom negativ geladenen Phosphatrückrat der DNA entfernen. Dabei wird der Akzeptor, der sich am Ende der Helix befindet schräg nach oben ausweichen und verursacht dadurch den „Offset“ L , während der radiale Abstand r_A zur Helixachse relativ gering ist. Der Donor befindet sich dagegen in der Sequenz. Es ist plausibel anzunehmen, daß er aufgrund der Coulombabstoßung nahezu gestreckt seitlich absteht, so daß der Abstand r_D entsprechend groß ist.

In dieses Bild paßt auch, daß der Abstand des DA-17 Konstrukts im Vergleich zur Anpassung etwas zu lang ist. Die Abstoßungskräfte am Ende der Helix zwingen das Alexa 488, wie Cy5 zum Ausweichen entlang Helixachse nach oben.

4.4 Machbarkeitsstudie: Analyse einer heterogenen FRET-Probe

Die bisher gezeigten Ergebnisse wären prinzipiell, zwar mit sehr viel mehr Aufwand bei der Probenaufarbeitung, auch aus Ensemblemessungen zugänglich. Um die Vorteile von Einzelmolekülmessungen zu verdeutlichen und das Auflösungsvermögen unserer Technik zu demonstrieren, wurde im Rahmen einer Machbarkeitsstudie eine Einzelmolekül-MFD-Messung mit einer Mischung aus vier verschiedenen Konstrukten durchgeführt. Neben den DA-5, DA-9, DA-13 und DA-15 Molekülen enthielt die Probe, bedingt durch unvollständige Markierung, die entsprechenden D-Moleküle. Unter Berücksichtigung der beiden Spezies A und K beinhaltet die Probe letztlich fünf unterscheidbare Molekülsorten.

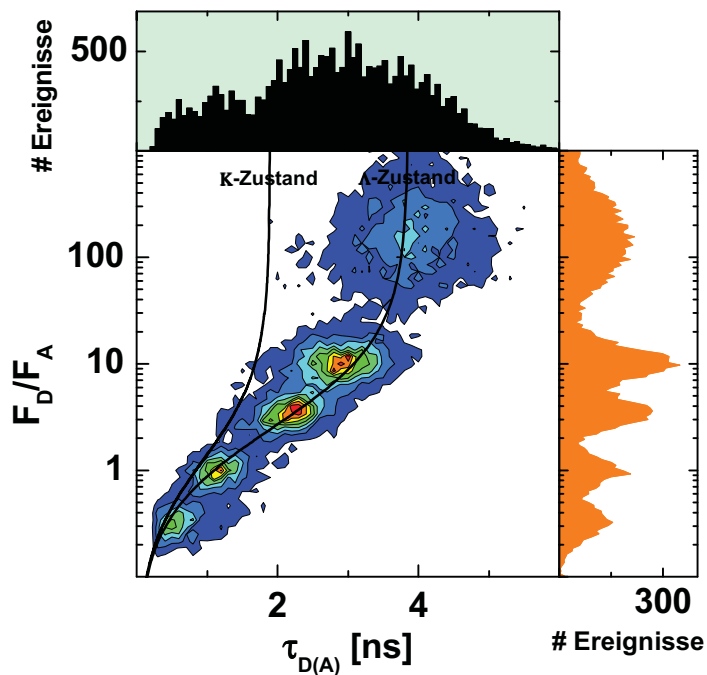


Abb. 4.13: $(F_D/F_A, \tau_{D(A)})$ -Histogramm für die Messung einer Probe mit vier verschiedenen DA-Konstrukten (DA-5; DA-9; DA-13 und DA-15). Die Verteilung mit einem Verhältnis $F_D/F_A > 100$ wird durch zusätzliche D-Moleküle verursacht. Im Gegensatz zu einer Ensemblemessung, bei der die Unterscheidung einer solchen Vielzahl verschiedenartiger, FRET-aktiver Moleküle unmöglich ist, können im Einzelmolekülexperiment die vier DA-Konstrukte sowie die D-Moleküle separiert werden. Die Verteilungen für kurzlebige K-Spezies sind bei den Molekülen, die in diesem Experiment verwendet wurden allgemein nicht sehr ausgeprägt und auf Grund der Skalierung in dieser Abbildung nicht erkennbar.

Aus der Anzahl der Ereignisse kann der Anteil jeder FRET-Spezies in der Probe abgeschätzt werden. Diese Eigenschaft der Einzelmolekül FRET-Experimente eröffnet die Möglichkeit statische sowie dynamische Gleichgewichte zu untersuchen und daraus Gleichgewichts sowie Geschwindigkeitskonstanten von biologisch relevanten Prozessen, wie Enzymkinetiken oder Konformationsänderungen in Proteinen sowie Nukleinsäuren zu ermitteln (Vgl. Kap 6 und Kap. 5).

Weiterhin zeigt diese Machbarkeitsstudie, daß die Empfindlichkeit bei Abständen um R_0 ausreicht, um DNA-FRET-Moleküle zu unterscheiden, bei denen der Abstand zwischen Donor und Akzeptor lediglich um 2 Basenpaare variiert. Dies entspricht einer Abstandsauflösung von weniger als 0.7 nm.

4.5 Fazit der Einzelmolekül FRET Experimente mit DNA Doppelsträngen

Für diese FRET-Studie an einem linearen DNA-Duplex wurden 13 unterschiedliche Donor-Akzeptor-Konstrukte verwendet. Dabei unterscheiden sich die Konstrukte in der Anzahl der Basenpaare zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor. Als Donor-Akzeptor-Paar wurde Alexa 488 und Cy5 aufgrund photophysikalischer Vorteile und, der für Studien an Nukleinsäuren, günstigen negativen Gesamtladung der beiden Fluorophore ausgewählt.

Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, daß der Donorfluorophor Alexa 488, zwei über Millisekunden stabile Zustände (Λ und K) aufweist, die sich in ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterscheiden. Eine speziesselktive Analyse konnte zeigen, daß die beiden Zustände Λ und K sich ihrerseits aus je zwei Lebensdauer-Subzuständen zusammensetzen, die sich auf einer Zeitskala ineinander umwandeln, die jenseits der Zeitauflösung eines Einzelmolekülexperiments liegt. Aufgrund dessen war eine Korrektur der aus den Einzelmolekülexperimenten ermittelten Fluoreszenzlebensdauern notwendig. Beim Akzeptorfluorophor Cy5 galt es, die bei Cyaninfarbstoffen auftretende Cis-Trans-Isomerisierung bei der Bestimmung der Akzeptorquantenausbeute zu berücksichtigen.

Durch Anisotropiemessungen auf Einzelmolekülniveau konnte gezeigt werden, daß die Mobilität der Fluorophore durch die Bindung an die DNA nicht wesentlich eingeschränkt wird. Damit konnte zum ersten Mal im Rahmen einer Einzelmolekül-FRET-Studie die Gültigkeit des Wertes von $2/3$ für den Orientierungsfaktor experimentell überprüft werden.

Weiterhin konnte anhand der Messungen verschiedener DNA-FRET-Konstrukte gezeigt werden, daß die Genauigkeit bei der FRET-Effizienz Bestimmung auf Einzelmolekülbasis ausreicht, um die helikale Struktur der DNA nachzuweisen. Ferner konnte mit Hilfe dieser Messungen und Vergleich der Ergebnisse mit einem geometrischen Modell der DNA die Position der Fluorophore relativ zur DNA bestimmt werden. Speziell dieses Ergebnis kann bei der Interpretation von Abständen präzisieren, die bei komplizierteren DNA Strukturen gemessen werden.

Im Rahmen einer Machbarkeitsstudie konnten schließlich vier verschiedene DNA-Konstrukte mit unterschiedlichen Abständen zwischen Donor und Akzeptor sicher nebeneinander nachgewiesen werden, wobei die Abstandsdifferenz zwischen den Konstrukten zum Teil weniger als 7 \AA betrug.

5 Untersuchung der Konformerverteilung bei einer Holliday-Junction

Nachdem die MFD-Technik auf ein einfaches statisches DNA-System angewandt wurde, soll nun eine Studie vorgestellt werden, bei der diese Methode zur Untersuchung einer komplizierteren und biologisch relevanten DNA-Struktur, der Holliday-Junction, eingesetzt wird. Dabei ist die Untersuchung des bei der Holliday-Junction auftretenden Konformerengleichgewichts von besonderem Interesse. Anhand dieses Konformerengleichgewichts werden die Techniken zur Analyse von Kinetiken auf Einzelmolekülniveau vorgestellt, deren theoretische Beschreibung in Kap. 3.5 zu finden ist.

5.1 Allgemeines zur Holliday-Junction

Die Holliday-Junction ist das zentrale Zwischenprodukt bei dem molekulargenetischen Vorgang der homologen Rekombination, der bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen eine entscheidende Rolle spielt (Holliday, 1964). Die Holliday-Junction besteht aus einer Kreuzung, an der vier DNA-Stränge aufeinandertreffen (Abb. 5.1), und dient als Substrat für eine Reihe von Proteinen, die an der Rekombination beteiligt sind. Dabei erkennen diese Proteine gezielt die Form dieser Vier-Wege-Kreuzung. Um die spezifischen Interaktionen zwischen Proteinen und DNA zu verstehen, ist die genaue Kenntnis der Struktur der Holliday-Junction essentiell.

Die Struktur der Holliday-Junction ist wesentlich von der Konzentration divalenter Kationen, insbesondere Mg^{2+} , abhängig. In Abwesenheit solcher Ionen bedingt die elektrostatische Abstoßung der Phosphatgruppen am Kreuzungspunkt die sog. offene (planare) Form (Abb. 5.1). Bei dieser Konformation sind die Basen am Kreuzungspunkt nicht gestapelt und die vier Arme zeigen in die Ecken eines Quadrats.

Divalente Kationen werden bei der Holliday-Junction selektiv durch die Phosphatgruppen am Kreuzungspunkt gebunden, dadurch wird deren negative Ladung kompensiert und die Holliday-Junction geht in die X-Struktur (auch als geschlossene Form bezeichnet) über. Bei dieser Konformation sind jeweils zwei Arme der Holliday-Junction koaxial übereinander gestapelt (engl.: "coaxial stacking"), wodurch zwei durchgängige DNA-Helices entstehen (Duckett, 1988). Durch den selektiven Charakter der Bindung sind divalente Ionen bei der Abschirmung der negativen Ladung sehr viel effektiver als monovalente. So liegt die

„kritische“ Konzentration für den Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation für Mg^{2+} bei $100 \mu M$, während selbst eine Konzentration von $35 mM Na^+$ die Holliday-Junction nicht völlig in die X-Konformation überführen kann (Duckett, 1990).

Für die X-Struktur sind grundsätzlich, je nach Wahl der Stapelungs-("stacking")-Partner und Ausrichtung der resultierenden Helices, vier Konformere denkbar (Abb. 5.1). Heute gilt als gesichert, daß DNA-Holliday-Junctions grundsätzlich nur die beiden antiparallelen Formen (rechts in Abb. 5.1) ausbilden (Duckett, 1988; Murchie, 1989). Daher werden in der folgenden Diskussion die beiden parallelen Strukturen auf der linken Seite in Abb. 5.1 vernachlässigt.

Legt man die Nomenklatur der Arme aus Abb. 5.1 zu Grunde, ergibt die Stapelung der Helix A auf B sowie C auf D die antiparallele X-Struktur oben rechts, die als A/B-Konformer

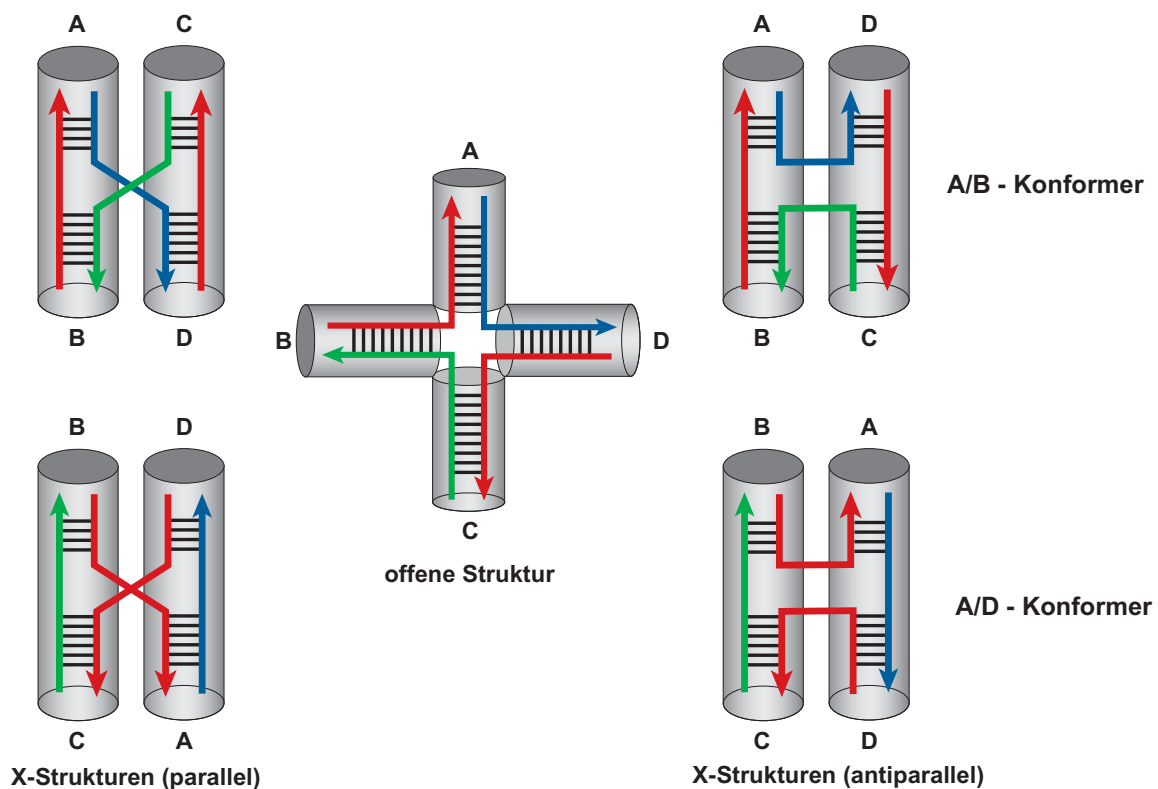


Abb. 5.1. Mögliche Konformere der Holliday-Junction. Die grauen Zylinder deuten DNA-Doppelhelices an und die Pfeile die einzelnen DNA-Stränge mit dem 5'-Ende als Pfeilspitze. In der Mitte ist die offene Konformation abgebildet, bei der die Basen am Kreuzungspunkt nicht gestapelt („stacked“) sind. Die anderen Konformere (X-Strukturen) ergeben sich durch koaxiale Stapelung von jeweils zwei Helices. Die Strukturen in der oberen Reihe werden als A/B-Konformer bezeichnet und entstehen durch Stapelung der Helices A und B bzw. C und D; während das A/D-Konformer in der unteren Reihe durch Stapelung der Helices A und D bzw. B und C gebildet wird. Die auf diese Weise entstandenen Helices können sich dann entweder in paralleler (rechts) oder antiparalleler Richtung anordnen.

bezeichnet wird. Das A/D-Konformer unten links entsteht durch Stapelung der Helix A auf D sowie B auf C. Welches der X-Konformere bevorzugt gebildet wird, hängt von der Sequenz am und um den Kreuzungspunkt ab. Dabei spielen neben den unterschiedlichen Stapelungs- („Stacking“-)Energien zwischen den Basen am Kreuzungspunkt auch sequenzabhängige Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Phosphaten und Basen eine Rolle, die zur bevorzugten Bildung eines Konformers führen können (Eichman, 2000; Ortiz-Lombardia, 1999).

Die beiden X-Konformere können sich über die offene Form als Intermediat ineinander umfalten. Dabei ist die Umfaltungsgeschwindigkeit stark von der Konzentration divalenter Ionen abhängig (Overmars, 1997).

Die klassische Holliday-Junction entsteht bei der Rekombination durch ein Aneinanderlagern von zwei homologen DNA-Doppelhelices, die dann durch eine Endonuklease geschnitten und anschließend wieder neu verknüft werden. Die Homologie der Stränge bedingt dabei, daß der Kreuzungspunkt entlang der Sequenz wandern kann (Abb. 5.2):

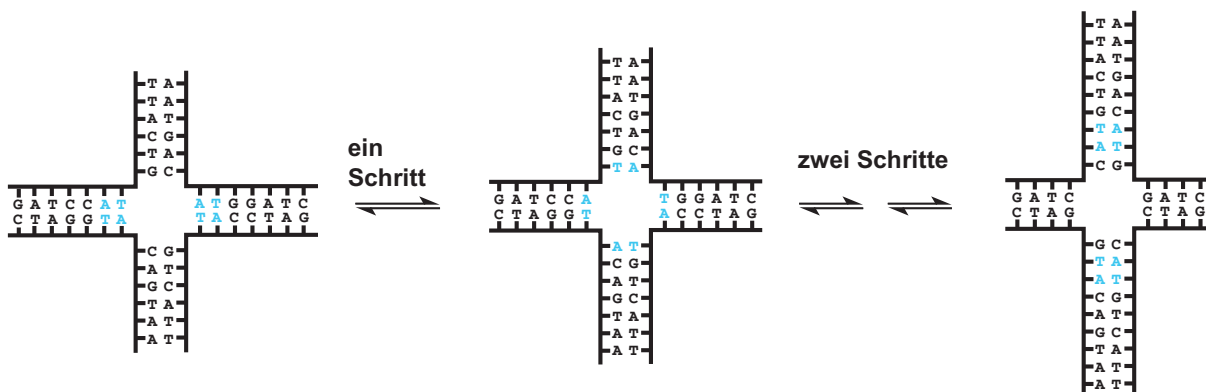


Abb. 5.2: Illustration der Wanderung des Kreuzungspunkts (branch migration) einer Holliday-Junction mit vollständig homologer Sequenz.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist wiederum stark von der Konzentration divalenter Ionen abhängig, da auch hier transient die offene Form auftritt, die bevorzugt bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen ausgebildet wird. Bei einer Konzentration von 10 mM Mg^{2+} , bei der die gestapelte Struktur stabilisiert ist, beträgt die durchschnittliche Wandergeschwindigkeit ca. drei Basenpaaren pro Sekunde. In Abwesenheit jeglicher divalenter Ionen steigert sich diese Geschwindigkeit um das 1000fache auf ca. 3000 Basenpaare pro Sekunde (Welch, 1993).

5.2 Zielsetzung dieser Studie

Die Holliday-Junction ist ein ideales System, um die Möglichkeiten der MFD-FRET-Technik in Bezug auf kinetische Fragestellungen zu testen, da sich die Geschwindigkeit der Dynamik mit Hilfe der Mg^{2+} -Konzentration über einen weiten Bereich beliebig einstellen läßt.

Im Rahmen dieser Studie wurde eine „künstliche“ Holliday-Junction untersucht, bei der die Sequenzen (vgl. Tabelle 3.6) der vier DNA-Stränge so gewählt wurden, daß eine Wanderung des Kreuzungspunkts, wie bei natürlich vorkommenden Holliday-Junctions ausgeschlossen ist (immobiler Holliday-Junction).

Diese Holliday-Junction soll bei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Messungen untersucht werden. Dabei soll zum einen die Gleichgewichtsverteilung zwischen dem A/D- und A/B-Konformer bestimmt und zum anderen die Umwandlungsgeschwindigkeit zwischen den beiden Konformeren ermittelt werden.

5.3 Die verwendete Holliday-Junction

Die Sequenzen der verwendeten DNA-Stränge sind in Tabelle 3.6 angegeben und wurden von David Millar (Scribbs-Institut, La Jolla, San Diego (USA)) angeregt. Die daraus resultierende Holliday-Junction ist in Abb. 5.3 dargestellt.

Bei der im Rahmen dieser Studie verwendeten Holliday-Junction handelt es sich um eine CTGA-Junction, die der Klasse YYRR angehört (Y = Pyrimidin; R = Purin). Die Zentralsequenz dieser Junction lautet demnach für Strang 1 CA, für Strang 2 TC, für Strang 3 GT und für Strang 4 AG.

Für die FRET-Experimente wurde die Sequenz 1 am 5'-Ende über einen Aminomodifizierer mit Alexa 488 markiert, so daß sich der Donorfluorophor am Ende der Helix A befindet. Der Akzeptorfluorophor Cy5 wurde analog zur DNA-Strukturanalyse über einen Aminomodifizierer an das 5'-Ende der Stränge 2 bzw. 3 gebunden. Damit können wahlweise die Helices B (= 1,2-Konstrukt) oder C (= 1,3-Konstrukt) mit dem Akzeptor Farbstoff markiert werden.

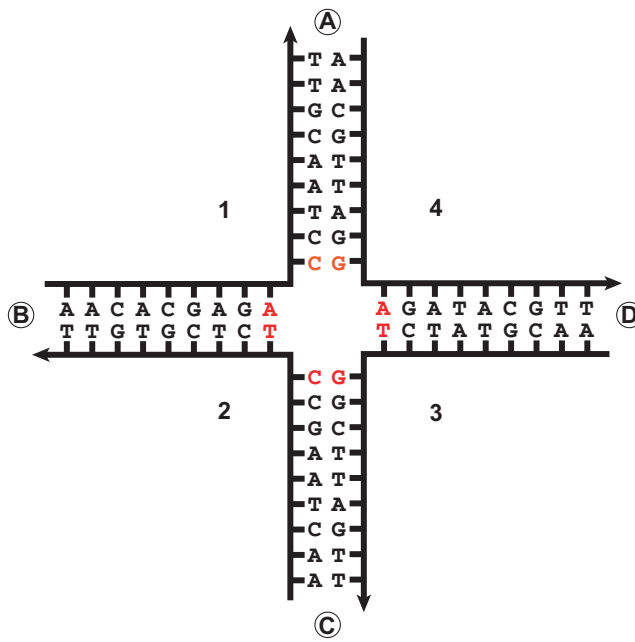
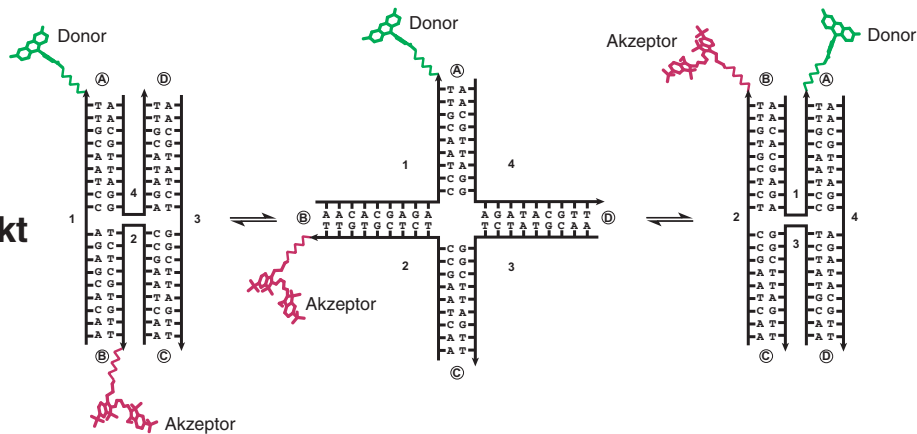
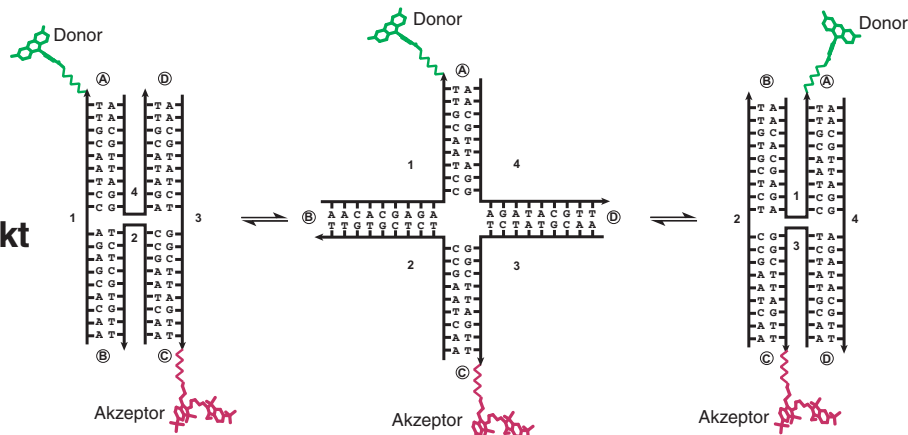


Abb. 5.3: Die im Rahmen dieser Studie verwendete Holliday Junction. Die Buchstaben bezeichnen die Arme und die Zahlen die Stränge. Die Pfeilspitzen zeigen jeweils das 5'-Ende eines DNA-Stranges an. Durch die Wahl der Sequenzen wurde eine Wanderung des Kreuzungspunkts ausgeschlossen. (Die Nomenklatur der Helices und Konformere folgt den Regeln der "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (NC-IUBMB) sowie den Regeln für die Klassifizierung von Junctions von Altona (Altona, 1996).)

1,2-Konstrukt



1,3-Konstrukt



A/B-Konformer

A/D-Konformer

offene Struktur

Abb. 5.4: Schematische Darstellung der verwendeten FRET-Konstrukte unter Berücksichtigung der beiden möglichen antiparallelen Konformere. Die beiden Konformere A/B (links) und A/D (rechts) können anhand des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor beim 1,2-Konstrukt (obere Reihe) unterschieden werden, während der Abstand beim 1,3-Konstrukt (untere Reihe) für beide Konformere nahezu identisch ist.

Beim 1,2-Konstrukt unterscheiden sich die Konformere A/B und A/D durch den jeweiligen Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor und können im FRET-Experiment anhand ihrer Transfereffizienzen separiert werden. Im Gegensatz dazu ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor beim 1,3-Konstrukt für beide Konformere nahezu identisch. Dieses Konstrukt diente als zusätzliche Kontrolle und als Referenz für die Kinetik-Auswertungen

5.4 Eigenschaften der Fluorophore

Bei den im Rahmen dieser Studie untersuchten Molekülen handelt es sich um DNA, die mit dem Donor-Akzeptor-Paar Alexa 488 und Cy5 markiert ist. Daher kann auf Ergebnisse und Erfahrungen aus der DNA-Strukturuntersuchung zurückgegriffen werden, da die Interaktionen zwischen Biomolekül und Fluorophoren im wesentlichen identisch sein sollten. So kann der reduzierte Försterradius, R_{0r} , der im Rahmen der DNA-Strukturstudie ermittelt wurde, bei dieser Studie übernommen werden, sofern keine unerwarteten κ^2 -Effekte auftreten. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Mobilität der Fluorophore, anhand der entsprechenden (τ_D, r_D) -Histogramme überprüft (vgl. Kap. 4.3.4 und 3.4.4).

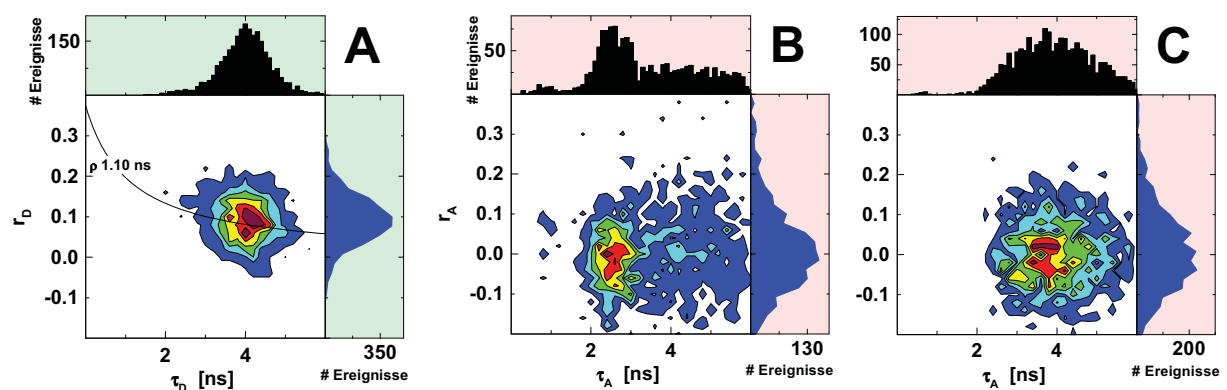


Abb. 5.5: (τ_D, r_D) -Histogramme für A) Alexa 488 gebunden an Strang 1 der Holliday-Junction (ohne Akzeptor); B) Cy5 im 1,2-Konstrukt und C) im 1,3-Konstrukt angeregt via FRET.

Die im Vergleich zur DNA-Studie längere Rotationskorrelationszeit des Donorfluorophors (Abb. 5.5 A) von 1.1 ns kann im wesentlichen durch die langsamere globale Bewegung der Holliday-Junction erklärt werden. Die Akzeptorfluoreszenz ist für beide Konstrukte vollständig isotrop (Abb. 5.5 B und C). Daher sollte die Approximation des Orientierungsfaktors κ^2 mit dem Wert von 2/3 für freie und schnell rotierende Fluorophore, trotz der verhältnismäßig langen Rotationskorrelationszeit des Donorfluorophors, zu keinen größeren Abweichungen bei der späteren Abstandsberechnung führen.

Ferner zeigt Abb. 5.5 A, daß der bei der DNA-Strukturstudie aufgetretene Fluoreszenzlebensdauerzustand K des Alexa 488, hier, wenn überhaupt, nur in Spuren vorhanden ist und daher im folgenden nicht weiter beachtet werden muß. Eine speziessensitive Analyse der Verteilung in Abb. 5.5 A zeigt, daß die Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung inhomogen ist und sich aus zwei Subspezies zusammensetzt. Dementsprechend wurden die Koeffizienten a, b und c nach dem in Kap. 3.6.1 vorgestellten Verfahren ermittelt und die Lebensdauerachse für die Einzelmolekülmessungen entsprechend korrigiert ($a = -0.046$, $b = 1.0732$, $c = -0.0175$)

5.5 Abstände in der Holliday-Junction unter statischen Bedingungen

Um die beiden X-Konformere ohne den Einfluß einer strukturellen Dynamik studieren zu können, wurde eine Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM gewählt, die gewährleistet, daß die Konformere während der Diffusion durch das Beobachtungsvolumen stabil sind. Abb. 5.6 zeigt das Ergebnis dieser Messung für das 1,2 und das 1,3- Konstrukt. Um die Interpretation zu erleichtern, wurde das Intensitätsverhältnis F_D/F_A in den Histogrammen direkt in den Abstand R_{DA} umgerechnet (vgl. Kap. 3.4.3; benötigte Parameter: $R_{0r} = 53.9$ (aus Tabelle 3.3), $g_G/g_R = 1.6$ (aus Tabelle 3.2), $\Phi_{FA,eff.} = 0.32$ für Cy 5 (vgl. Tabelle 4.4)).

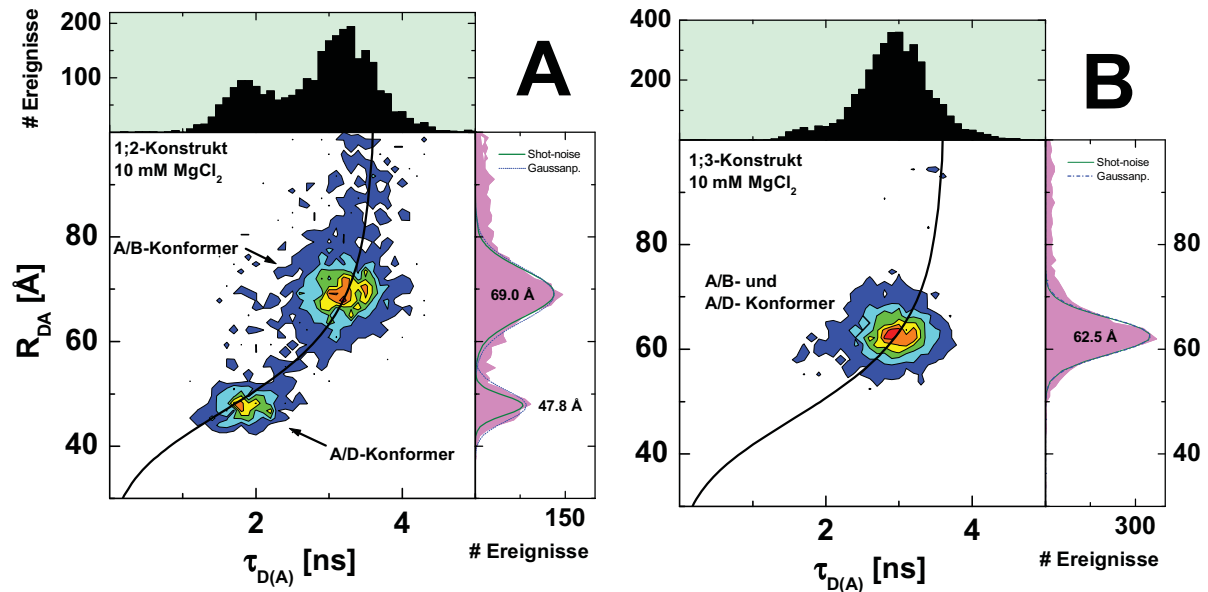


Abb. 5.6: $(R_{DA}, \tau_{D(A)})$ -Histogramme der Messungen des A) 1,2-Konstrukts und B) des 1,3-Konstrukts bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 10 mM. Die olivfarbenen Kurven zeigen jeweils den Shot-noise nach Gl. 3.3 an. Die dunkelblauen, gestrichelten Kurven zeigen eine Gaußanpassung an die gemessene Verteilung. (A, A/B-Konformer: $R_{DA} = 69.0 \pm 0.3 \text{ \AA}$, $w = 10 \text{ \AA}^*$, $\sigma(R_{DA}) = 4.6 \text{ \AA}$; A, A/D-Konformer: $R_{DA} = 47.8 \pm 0.3 \text{ \AA}$, $w = 5.86 \pm 0.6 \text{ \AA}$; $\sigma(R_{DA}) = 1.9 \text{ \AA}$; B, A/B und A/D-Konformer: $R_{DA} = 62.5 \pm 0.1 \text{ \AA}$, $w = 7 \text{ \AA}^*$; $\sigma(R_{DA}) = 3.4 \text{ \AA}$. * bedeutet hierbei, daß der Wert bei der Gaußanpassung festgehalten wurde. $\sigma(R_{DA})$ ist die nach Gl. 3.13 berechnete Breite des Shot-noise, w die Breite der gemessenen Verteilung, die sich aus der Gaußanpassung ergibt). Die schwarze sigmoide Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ nach Gl. 3.30 an, dabei ist $\tau_D = 3.5 \text{ ns}$, $R_{0r} = 53 \text{ \AA}$ (mit $k^2 = 2/3$) und $k_F = 0.16$. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Im $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramm des 1,2-Konstrukts (Abb. 5.6 A) lassen sich zwei definierte Populationen unterscheiden. Die Population mit einem mittleren Abstand von 47.8 \AA kann dabei dem A/D-Konformer und die Population mit einem mittleren Abstand von 69.0 \AA dem A/B-Konformer zugeschrieben werden. Beim 1,3-Konstrukt sind die Abstände zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor für die beiden antiparallelen Konformere identisch (vgl. Abb. 5.5 unten), daher zeigt das $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramm der Abb. 5.6 B erwartungsgemäß nur eine Population mit einem mittleren Abstand von 62.5 \AA . Weder die Abstandsverteilung des 1,3-Konstrukts noch die beiden Abstandsverteilungen für das A/B- und A/D Konformer in Abb. 5.6 A sind signifikant breiter als der berechnete Shot-noise (olivfarbene Kurven in Abb. 5.6). Daher kann ausgeschlossen werden, daß bereits bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 10 mM eine schnelle Umfaltung zwischen A/B- und A/D-Konformer stattfindet (Vgl. Kap. 3.5).

5.5.1 Die relativen Anteile der A/D- und A/B-Konformere

Mit Hilfe der Flächen, die aus der Abstandsverteilung im eindimensionalen R_{DA} -Histogramm (Abb. 5.6 A, rechte Projektion) bestimmt werden, läßt sich der relative Anteil des A/B- und A/D-Konformers ermitteln. Dabei muß jedoch zunächst berücksichtigt werden, daß Donor und Akzeptorfluorophor unterschiedliche Fluoreszenzquantenausbeuten besitzen und die Detektionseffizienzen g_R und g_G für den grünen und den roten Spektralbereich unterschiedlich sind. In Verbindung mit dem Schwellenkriterium, das bei der Auswahl der Einzelmolekülereignisse (Mindestanzahl an Photonen pro Ereignis ist bei den Messungen dieser Studie 160) angewendet wird, führt dies dazu, daß Ereignisse mit unterschiedlichen FRET-Effizienzen mit einer unterschiedlichen Effektivität selektiert werden. Oder anders ausgedrückt: Das Verhältnis der selektierten zur Gesamtzahl der Ereignisse hängt von der FRET-Effizienz ab. Um diesen Effekt zu berücksichtigen, müssen die relativen Selektionseffizienzen $sel_{A/B}$ und $sel_{A/D}$ für die beiden Konformere bestimmt werden. Dazu werden die Einzelmolekülereignisse für das A/B- und A/D-Konformers selektiert und jeweils die Anzahl der Einzelmolekülereignisse gegen die Anzahl der Photonen pro Ereignis aufgetragen (siehe Abb. 5.7a).

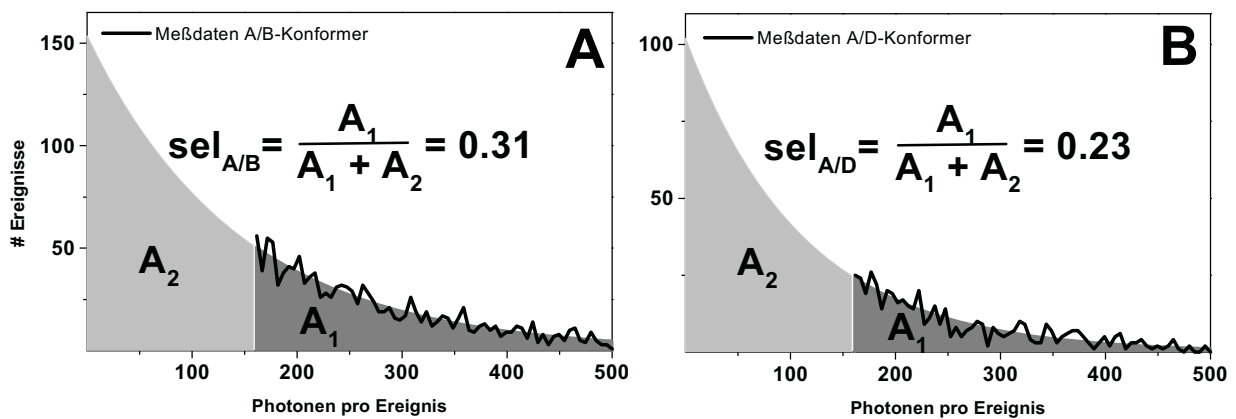


Abb. 5.7a: Bestimmung der Selektionseffizienzen A) $sel_{A/B}$ und B) $sel_{A/D}$. Die Meßdaten enthalten aufgrund des Selektionskriteriums bei der Auswahl der Einzelmolekülereignisse nur Ereignisse mit mehr als 160 Photonen. An die Meßdaten wird eine monoexponentielle Funktion angepaßt. Die Fläche unter dieser exponential Funktion kann in zwei Teilbereiche zerlegt werden. Die daraus resultierende Fläche A_1 ist proportional zur Anzahl der selektierten Ereignisse und die Fläche A_2 ist proportional zur Anzahl der nicht detektierten Ereignisse. Aus dem Verhältnis der Fläche A_1 zur gesamten Fläche ($A_1 + A_2$) ergibt sich schließlich $sel_{A/B}$ für das A/B-Konformer und $sel_{A/D}$ für das A/D-Konformer. Aus den Daten der Messung des 1,2-Konstrukts in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ (Abb. 5.6 A) wird für $sel_{A/B}$ ein Wert von 0.31 und für $sel_{A/D}$ ein Wert von 0.23 berechnet.

Aus den Flächen A_1 für die nicht selektierten Ereignisse und A_2 für die selektierten Ereignisse können die Werte für $sel_{A/B}$ und $sel_{A/D}$ bestimmt werden. Abb. 5.7a soll das Vorgehen illustrieren.

Aus dem Verhältnis $sel_{A/B}$ zu $sel_{A/D}$ ergibt sich der Korrekturfaktor (hier $0.31/0.23 = 1.35$) mit dem die Fläche des A/D-Konformers, die aus der Abstandsverteilung ermittelt wird, multipliziert werden muß, um die schlechtere Selektionseffizienz auszugleichen.

Aus der Messung des 1,2-Konformers in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ läßt sich mit der auf diese Weise korrigierten Fläche ein Anteil von 37.1 % für das A/D-Konformer berechnen, während das A/B-Konformer nur zu 62.9% bevölkert wird.

5.5.2 Bestimmung des interhelikalen Winkels

Bei der X-Struktur sind die beiden jeweils aus zwei Armen der Holliday-Junction gebildeten Helices nicht, wie Abb. 5.1 suggeriert, exakt parallel ausgerichtet, sondern sie stehen in einem gewissen Winkel (interhelikaler Winkel, γ_{ih}) zueinander, so daß die namensgebende X-Form zustande kommt.

Der interhelikale Winkel wurde für eine Reihe von Holliday-Junctions mit unterschiedlichen Methoden bestimmt und schwankt je nach Quelle zwischen 55° und 70° (Eichman, 2000; Mao, 1999; Ortiz-Lombardia, 1999; Torbet, 1992). Im Rahmen einer Molecular-Modelling-Studie konnte ein interhelikaler Winkel von 60° berechnet werden (von Kitzing, 1990).

Prinzipiell kann aus den Einzelmolekül-FRET-Messungen der Holliday-Junction bei 10 mM $MgCl_2$, deren Ergebnisse in der Abb. 5.6 dargestellt sind, der interhelikale Winkel γ_{ih} ermittelt werden. Eine Voraussetzung für die exakte Berechnung ist jedoch die genaue Kenntnis der Fluorophorpositionen relativ zur DNA. Im vorherigen vierten Kapitel wurden die Fluorophorpositionen relativ zur DNA für ein einfaches DNA-Konstrukt bestimmt. Leider können diese Ergebnisse nicht auf die vorliegende Holliday-Junction übertragen werden, da der Donorfluorophor hier am 5'-Ende gebunden ist und die spezielle Struktur der Holliday-Junction die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen DNA und Fluorophor beeinflusst, so daß nur eine grobe Abschätzung des interhelikalen Winkels aus den gemessenen Abstände möglich ist. Dazu wird angenommen, daß die Fluorophore sich in der Nähe der Helixachse befinden. Da die elektrostatische Abstoßung am Ende einer Helix die negativ geladenen

Fluorophore veranlaßt, entlang der Helixachse auszuweichen (vgl. Kap. 4) ist diese Annahme nicht unvernünftig.

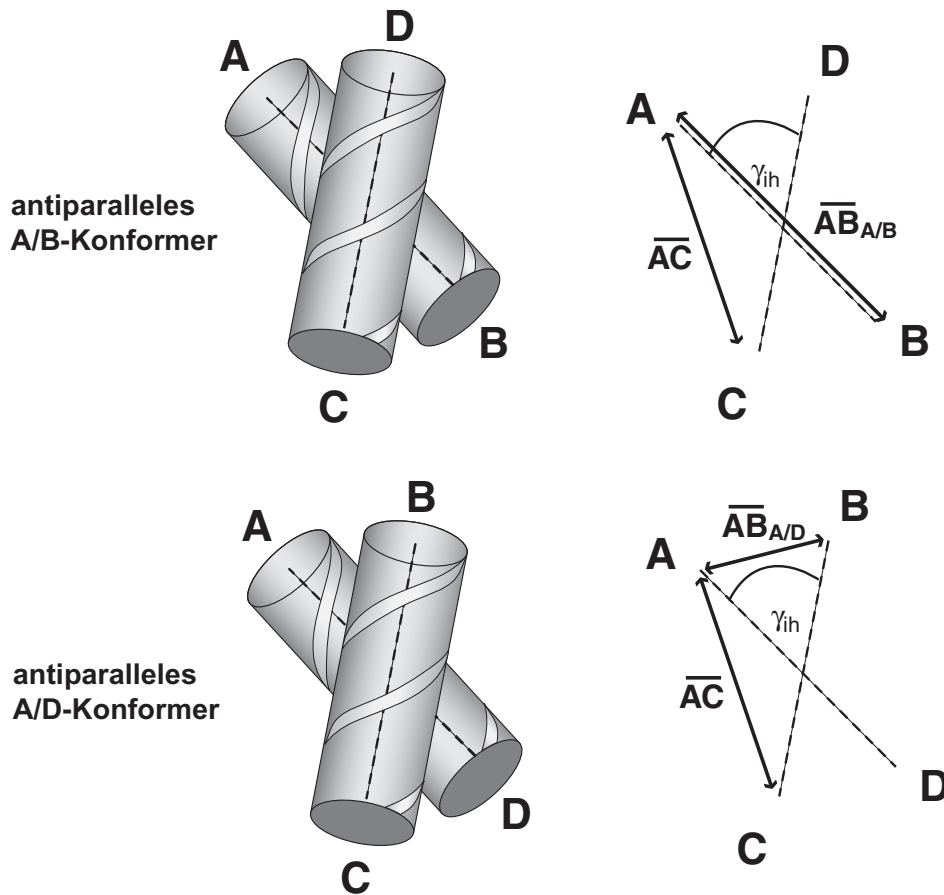


Abb. 5.8: Dreidimensionale Ansicht der beiden antiparallelen X-Konformere der Holliday-Junction: A/B-Konformer oben und A/D-Konformer unten. Die Helices sind nicht exakt parallel zueinander ausgerichtet, sondern stehen in einen Winkel zueinander, der als interhelikaler Winkel (γ_{ih}) bezeichnet wird. Zum besseren Verständnis des interhelikalen Winkels sind rechts jeweils nur die Helixachsen dargestellt. Zusätzlich sind die aus den Einzelmolekül-FRET-Messungen (Abb. 5.8) bestimmten Abstände eingezeichnet. Die Abstände $\overline{AB}_{A/D}$ und \overline{AC} , bei denen sich Donor und Akzeptor jeweils auf unterschiedlichen Helices befinden, werden aus den gemessenen Abständen $\overline{AB}^*_{A/D}$ und \overline{AC}^* unter Berücksichtigung des Durchmessers der DNA (d_{DNA}) berechnet.

Unter dieser Voraussetzung kann aus den ermittelten Abständen ($\overline{AB}^*_{A/D} = 47.8 \text{ \AA}$, $\overline{AB}_{A/B} = 69.0 \text{ \AA}$ und $\overline{AC}^* = 62.5 \text{ \AA}$) der interhelikale Winkel berechnet werden. Dazu müssen zunächst die Abstände $\overline{AB}^*_{A/D}$ und \overline{AC}^* , bei denen Donor- und Akzeptorfluorophor sich auf unterschiedlichen Helices befinden, um den Durchmesser der DNA ($d_{DNA} = 20 \text{ \AA}$) korrigiert werden:

$$\overline{AB}_{A/D} = \sqrt{(\overline{AB}^*_{A/D})^2 - d_{DNA}^2} \quad \text{und} \quad \overline{AC} = \sqrt{(\overline{AC}^*)^2 - d_{DNA}^2} \quad \text{Gl. 5.1 A, B}$$

Der interhelikale Winkel kann dann aus drei unterschiedlichen Abstandsverhältnissen berechnet werden:

$$\gamma_{ih,A} = 2 \arcsin\left(\frac{\overline{AB}_{A/D}}{\overline{AB}_{A/B}}\right) \quad \text{Gl. 5.2 A}$$

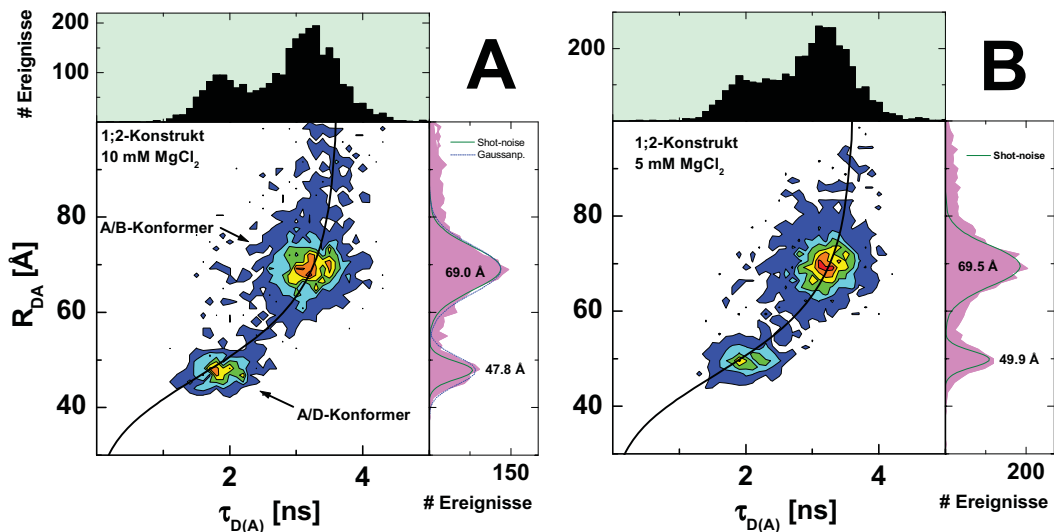
$$\gamma_{ih,B} = 2 \arctan\left(\frac{\overline{AB}_{A/D}}{\overline{AC}}\right) \quad \text{Gl. 5.2 B}$$

$$\gamma_{ih,A} = 2 \arccos\left(\frac{\overline{AC}}{\overline{AB}_{A/B}}\right) \quad \text{Gl. 5.2 C}$$

Auf diese Weise berechnet sich aus den Gleichungen 5.2 A bis C ein mittlerer interhelikaler Winkel von $67^\circ \pm 6^\circ$. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den oben genannten Literaturwerten überein.

5.6 Messung der Holliday Junction bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen

Um die Umfaltzeit zwischen den beiden Konformeren in den Bereich der Diffusionszeit und darunter zu verschieben wurde die MgCl_2 -Konzentration im Rahmen einer Meßserie systematisch von 10 mM bis auf 0.1 mM verringert. Die $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme der entsprechenden Einzelmolekül-FRET-Messungen für das 1,2-Konstrukt sind in den Abb. 5.9 A-F dargestellt:



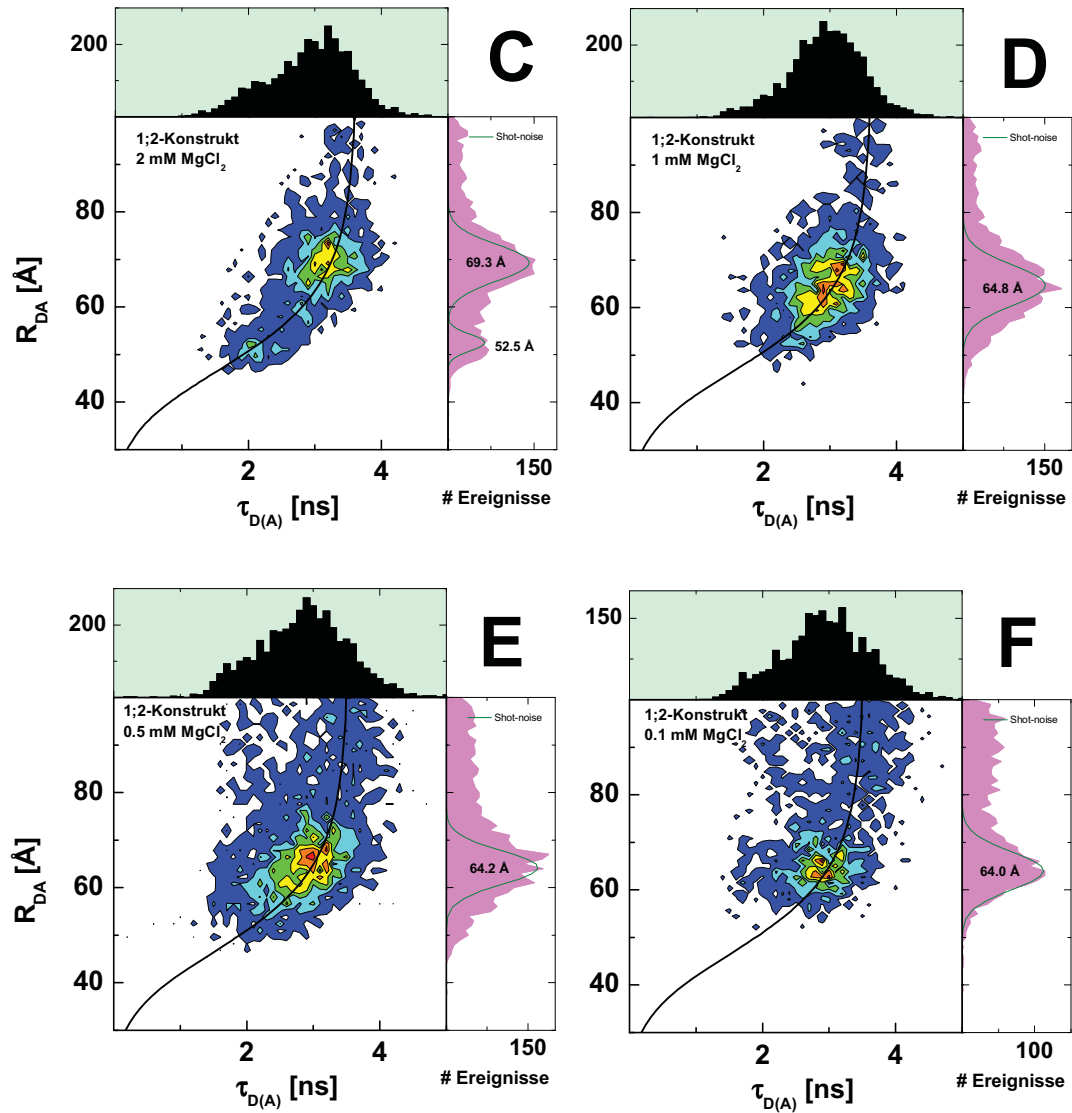


Abb 5.9: Meßergebnisse für das 1,2-Konstrukt bei von A) nach F) abnehmender MgCl_2 Konzentration. In den eindimensionalen R_{DA} -Histogrammen sind jeweils die mittleren Abstände der Verteilungen angegeben und die olivfarbenen Kurven geben den Shot-noise an, der nach Gl. 3.3 berechnet wurde. Die schwarze sigmoide Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ nach Gl. 3.30 an, dabei ist $\tau_D = 3.5$ ns, $R_{0r} = 53$ Å (mit $k^2 = 2/3$) und $k_F = 0.16$ (Im folgenden sind die Daten der Gaußanpassung sowie der jeweilige berechnete Shot-noise für die Abb. 5.9 A bis F angegeben: **A**, A/B-Konformer: $R_{DA} = 69.0 \pm 0.3$ Å, $w = 10$ Å*, $\sigma(R_{DA}) = 4.6$ Å; **A**, A/D-Konformer: $R_{DA} = 47.8 \pm 0.3$ Å, $w = 5.86 \pm 0.6$ Å; $\sigma(R_{DA}) = 1.9$ Å; **B**, A/B-Konformer: $R_{DA} = 69.5 \pm 0.2$ Å, $w = 10$ Å*; $\sigma(R_{DA}) = 4.24$ Å; **B**, A/D-Konformer: $R_{DA} = 49.9 \pm 0.3$ Å, $w = 5.7 \pm 0.5$ Å; $\sigma(R_{DA}) = 1.73$ Å; **C**, A/B-Konformer: $R_{DA} = 69.3 \pm 0.3$ Å, $w = 12$ Å*; $\sigma(R_{DA}) = 3.83$ Å; **C**, A/D-Konformer: $R_{DA} = 52.5 \pm 0.5$ Å, $w = 8.1 \pm 1.0$ Å; $\sigma(R_{DA}) = 1.74$ Å; **D**, A/B- und A/D-Konformer: $R_{DA} = 64.8 \pm 0.3$ Å, $w = 15.7 \pm 0.5$ Å; $\sigma(R_{DA}) = 4.23$ Å; **E**, A/B- und A/D-Konformer: $R_{DA} = 64.2 \pm 0.3$ Å, $w = 13.5$ Å*; $\sigma(R_{DA}) = 4.50$ Å; **F**, A/B- und A/D-Konformer: $R_{DA} = 64.0 \pm 0.3$ Å, $w = 9.5$ Å*; $\sigma(R_{DA}) = 3.56$ Å; * bedeutet hierbei, daß der Wert im Fit festgehalten wurde. $\sigma(R_{DA})$ ist die nach Gl. 3.13 berechnete Breite des Shot-noise, w die Breite der gemessenen Verteilung.) Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Bei einer geringeren Mg^{2+} -Konzentration werden die negativen Ladungen der DNA weniger effektiv abgeschirmt, so daß die elektrostatische Abstoßung zwischen den beiden Helices der X-Struktur zunimmt. Dieser Effekt bewirkt, daß der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bzw. der interhelikale Winkel bei abnehmender Mg^{2+} -Konzentration größer wird, so daß sich die Verteilung, die das A/D-Konformer repräsentiert, zunächst zu einem längeren Abstand verschiebt (Abb. 5.9 A und B). Der Abstand des A/D-Konformers bleibt dagegen unverändert, da sich beim 1,2-Konstrukt Donor- und Akzeptorfluorophor auf der gleichen Helix befinden.

Ab einer Konzentration von 2 mM $MgCl_2$ (Abb. 5.9 C) kommt ein zweiter Effekt zum tragen: Die Umwandlungsgeschwindigkeit zwischen dem A/B- und A/D-Konformer liegt ab dieser Konzentration in einem Bereich, in dem es bei einer signifikanten Anzahl von Ereignissen zu einer Umfaltung innerhalb der Beobachtungszeit kommt. Das führt im Einzelmolekülexperiment zur Bestimmung eines mittleren Abstands und die Verteilungen des A/B- und A/D-Konformers beginnen zu verschmelzen (vgl. Kap. 3.5).

Dieser Effekt ist bei der Konzentration von 2 mM $MgCl_2$ noch nicht sehr ausgeprägt, so daß beide Populationen noch erkennbar sind. Doch bereits bei einer Konzentration von 1 mM $MgCl_2$ (Abb. 5.9 D) ist die Geschwindigkeit der Umfaltung so groß, daß nur noch eine breite Verteilung, deutlich breiter als der Shot-noise, mit einem mittleren Abstand von 64.8 Å beobachtet wird. Bei weiterer Verringerung der $MgCl_2$ -Konzentration (Abb. 5.9 E und F) werden die Verteilungen des Mischzustands aus A/B- und A/D-Konformer durch weitere Steigerung der Umfaltgeschwindigkeit zunehmend schmaler (vgl. Kap. 3.5). Bei einer Konzentration von 0.1 mM $MgCl_2$ ist die Abstandsverteilung der FRET-aktiven Moleküle schließlich kaum breiter als der berechnete Shot-noise. Zusätzlich tritt ab einer Konzentration von 0.5 mM $MgCl_2$ eine weitere Spezies mit einem scheinbar großen Abstand auf. Diese ist auf Einzelmolekülereignisse zurückzuführen, die durch Moleküle verursacht werden, die nur den Donorfluorophor tragen. Das Auftreten dieser Spezies zeigt an, daß die Holliday-Junction unter diesen Bedingungen zunehmend instabiler wird und in die Einzelstränge dissoziiert. Unterhalb einer Konzentration von 0.1 mM $MgCl_2$ war die Holliday-Junction schließlich so instabil, daß keine verwertbaren Messungen mehr durchgeführt werden konnten.

Neben der geschilderten Interpretation der Meßergebnisse ist eine zweite Erklärung denkbar: Unterhalb einer Mg^{2+} -Konzentration von 2 mM geht die Holliday-Junction in die strukturell weniger definierte, offene Form über. Dies würde ebenfalls zu einer breiteren Verteilung mit einem mittleren Abstand zwischen dem des A/D- und dem des A/B-Konformers führen.

Bei der Kontrollmessung des 1,3-Konstrukts wird jedoch keine Abhängigkeit der gemessenen Abstandsverteilungen von der MgCl_2 -Konzentration beobachtet. Die $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme für eine Konzentration von 10 bzw. 1 mM sind in Abb. 5.10

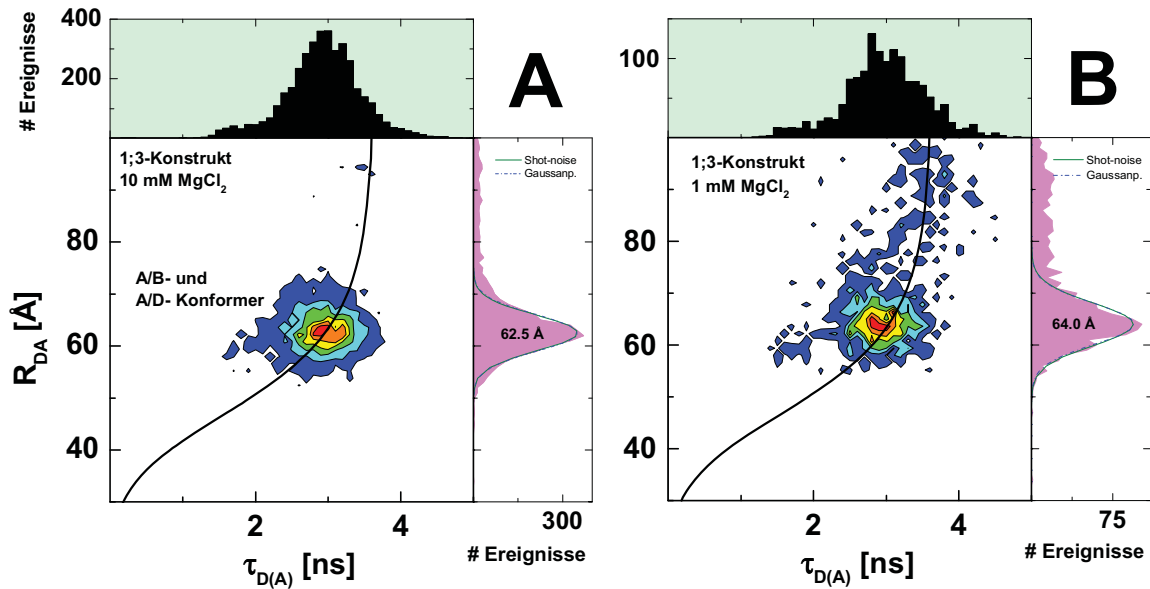


Abb. 5.10: Die $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme für das 1,3-Konstrukt: A) Bei einer Konzentration von 10 mM MgCl_2 und B) bei einer Konzentration von 1 mM MgCl_2 . Die cyanfarbenen Kurven geben den Shot-noise an, der nach Gl. 3.13 berechnet wurde, und die blauen, gestrichelten Kurven entsprechen einer Gaußanpassung an die Daten. Die schwarze sigmoide Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ nach Gl. 3.30 an, dabei ist $\tau_D = 3.5$ ns, $R_{0r} = 53$ Å (mit $k^2 = 2/3$) und $k_F = 0.16$. (A, A/B- und A/D-Konformer: $R_{DA} = 62.5 \pm 0.1$ Å, $w = 7$ Å*, $\sigma(R_{DA}) = 3.43$ Å; B, A/B- und A/D-Konformer: $R_{DA} = 64.0 \pm 0.2$ Å, $w = 8$ Å*, $\sigma(R_{DA}) = 4.12$ Å; * bedeutet hierbei, daß der Wert im Fit festgehalten wurde. w ist die Breite der gemessenen Verteilung.) Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden.

dargestellt. Lediglich der Anteil der Moleküle, die nur den Donorfluorophor tragen, nimmt bei abnehmender MgCl_2 -Konzentration aus den oben genannten Gründen zu.

Das Auftreten der offenen Form hätte hier eine Verkürzung des Abstands zwischen Donor und Akzeptor zur Folge (vgl. Abb. 5.4, untere Reihe), so daß die Messungen des 1,3-Konstrukts für das Vorliegen einer Umfaltungskinetik sprechen, bei der der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor für beide X-Konformere sich nicht unterscheidet.

5.7 Kinetische Betrachtung des Konformerengleichgewichts bei der Holliday-Junction

In dem nun folgenden Kapitel sollen die Verfahren der Zeitfenster- und Korrelationsanalyse, die in Kapitel 3.5 vorgestellt wurden, zur Untersuchung der intramolekularen Dynamik bei der Holliday-Junction angewendet werden.

5.7.1 Die Zeitfensteranalyse

Die bisher diskutierten Ergebnisse wurden mit Hilfe der Standardauswertung, der sog. burstweisen Analyse, gewonnen. Bei diesem Verfahren werden alle Parameter über die Länge eines Ereignisses gemittelt, so daß die Zeitauflösung von der Diffusionszeit der Moleküle durch das Detektionsvolumen abhängt. Um die Zeitauflösung zu verbessern und auf diese Weise abschließend zu klären, ob die breite Abstandsverteilung des 1,2-Konstrukts bei einer MgCl_2 -Konzentration von 1 mM auf eine dynamische Umwandlung zwischen den beiden X-Konformeren oder auf den Übergang in die offene Konformation zurückzuführen ist, wurde eine Zeitfensteranalyse durchgeführt.

Dabei werden die Einzelmolekülereignisse in kleinere Zeitintervalle (Zeitfenster) aufgeteilt. In dem hier vorliegenden Fall wurde die Analyse mit drei unterschiedlichen Intervallgrößen IG (2 ms, 1 ms und 0.5 ms) durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den folgenden R_{DA} -Histogrammen jeweils nur die Ergebnisse der Zeitfensteranalyse mit der kleinsten Intervallgröße IG von 0.5 ms im Vergleich zur Abstandsverteilung bei "burstweiser" Analyse dargestellt. Abb. 5.11 zeigt die Ergebnisse der Zeitfensteranalyse der Daten des 1,2-Konstrukts in Gegenwart von 1 mM MgCl_2 . Als Kontrolle wurde die Zeitfensteranalyse auch für die Messung der Holliday-Junction bei einer MgCl_2 -Konzentration von 10 mM durchgeführt. Bei dieser Konzentration sind die X-Konformere so stabil, daß keine Abstandsfluktuationen zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor während der Diffusion durch das Detektionsvolumen auftreten (siehe oben).

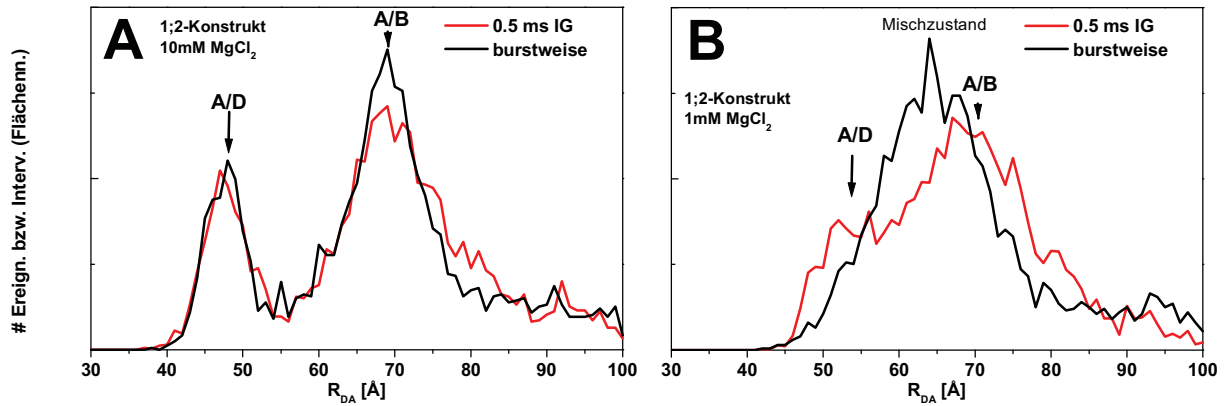


Abb. 5.11: Zeitfensteranalyse der Messung des 1,2-Konstrukts in Gegenwart von A) 10 mM MgCl_2 und B) 1 mM MgCl_2 . Die Zeitintervallgröße IG beträgt für die gezeigte Analyse 0.5 ms. Zum Vergleich sind jeweils zusätzlich die Verteilungen der "burstweisen" Analysen der Messungen dargestellt. Bei der Zeitfensteranalyse wurden nur solche Zeitfenster berücksichtigt, die mehr als 50 Photonen beinhalten. Alle dargestellten Verteilungen sind auf die Fläche normiert.

Erwartungsgemäß ist für die Messung des 1,2-Konstrukts in Gegenwart von 10 mM MgCl_2 kein signifikanter Unterschied zwischen der Abstandsverteilung, die aus der Zeitfensteranalyse hervorgeht, und der nach burstweiser Auswertung zu beobachten (Abb. 5.11 A). Nach beiden Auswerteverfahren sind Verteilungen der beiden X-Konformere gut separiert und weichen weder in der Form noch in der Position der Verteilung voneinander ab. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Resultat der beiden Auswerteverfahren bei einer MgCl_2 -Konzentration von 1 mM deutlich: Während bei burstweiser Analyse der Messung nur eine breite Verteilung beobachtet wird, sind die beiden Konformere aufgrund der besseren Zeitauflösung bei der Zeitfensteranalyse wieder separat nachweisbar. Im Vergleich zum mittleren Abstand bei der burstweisen Analyse verschiebt sich das Maximum der Verteilung des A/B-Konformers zu einem größeren Abstand, während das A/D-Konformer durch eine Schulter bei kürzerem Abstand repräsentiert wird.

Die Separation der beiden Konformere ist auch bei der Zeitfensteranalyse nicht annähernd so gut wie bei der Kontrolle in Gegenwart von 10 mM MgCl_2 . Dies wird zum einen dadurch verursacht, daß der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor tatsächlich für das A/D-Konformer aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der beiden Helices bei geringerer Mg^{2+} -Konzentration größer wird; zum anderen ist die Intervallgröße IG mit 0.5 ms wahrscheinlich nicht klein genug, so daß die Mittelung der beiden Zustände noch nicht

vollständig aufgehoben ist. Eine kleinere Intervallgröße war aus photonenstatistischen Gründen bei dieser Messung nicht möglich.

Dennoch konnte die Zeitfensteranalyse zeigen, daß die Verschmelzung der Abstandsverteilungen bei einer MgCl_2 -Konzentration von 1 mM durch die schnelle Umfaltung der beiden X-Konformere verursacht wird. Eine intermediäre offene Struktur mit einer Zustandslebensdauer größer 500 μs kann dagegen ausgeschlossen werden. Zudem kann der Zeitbereich, in dem die intramolekulare Dynamik stattfindet, auf 0.1 bis 1.0 ms eingegrenzt werden.

5.7.2 Die Korrelationsanalyse

Um quantitative Aussagen über die intramolekulare Dynamik der Umfaltung zu gewinnen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden aus der Messung des 1,2-Konstrukts bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM die Ereignisse, die durch FRET-aktive Moleküle verursacht wurden, selektiert. Anschließend wurden aus den Photonen dieser Ereignisse die Autokorrelationsfunktionen für den grünen (Donor) und roten (Akzeptor) Spektralbereich ($G(t_c)_{DD}$ und $G(t_c)_{AA}$) sowie die Kreuzkorrelationsfunktion ($G(t_c)_{KK}$) berechnet. Zur Kontrolle wurde dieselbe Prozedur für das 1,3- Konstrukt, bei dem aufgrund der Markierungspositionen keine FRET- bzw. Abstandsfluktuationen auftreten, durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 5.12 dargestellt. Um die Kurven besser vergleichen zu können, wurden diese normiert.

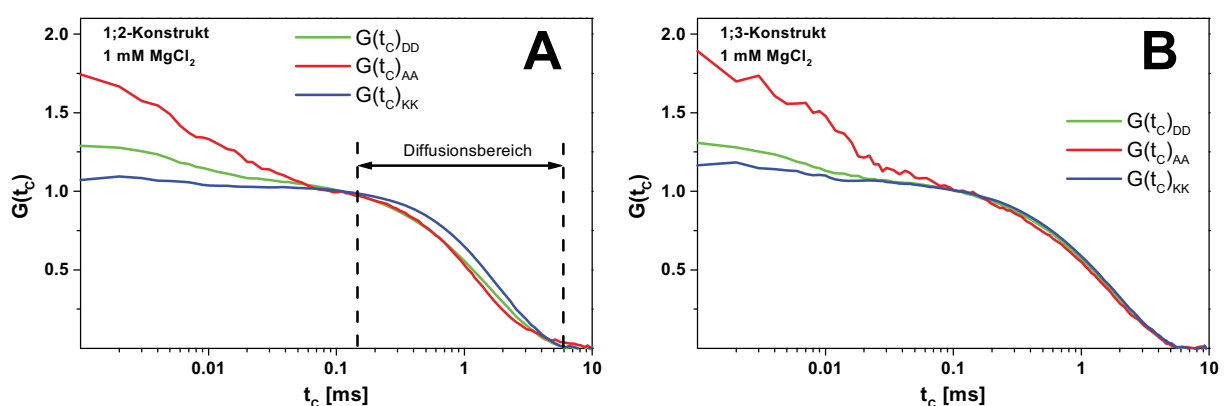


Abb. 5.12: Normierte Autokorrelationskurven für den Donor ($G(t_c)_{DD}$) und Akzeptor ($G(t_c)_{AA}$) sowie die normierte Kreuzkorrelationskurve ($G(t_c)_{KK}$) für das A) 1,2-Konstrukt und B) 1,3-Konstrukt jeweils bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM.

Das 1,2-Konstrukt (Abb. 5.12 A) zeigt im Bereich der Diffusion ($t_C \approx 1$ ms) einen signifikanten Unterschied zwischen den Autokorrelationsfunktionen ($G(t_C)_{DD}$ und $G(t_C)_{AA}$) und der Kreuzkorrelationsfunktion, $G(t_C)_{KK}$. Ein solches Verhalten deutet auf eine Abstandsfluktuation hin, deren Kinetik sich im Bereich der Diffusionszeit bewegt. Die Abstandsfluktuation führt zu einem Antikorrelationsbeitrag in der Kreuzkorrelationsfunktion $G(t_C)_{KK}$ und hat daher eine scheinbar verlängerte Diffusionszeit zur Folge, während in den Autokorrelationsfunktion der Beitrag der Abstandsfluktuation zu einem früheren Abklingen führt (vgl. Kap. 3.5).

Im Gegensatz zum 1,2-Konstrukt unterscheiden sich die Korrelationskurven des 1,3-Konstruks erwartungsgemäß nur wenig. Zwar klingt auch hier die Kreuzkorrelationsfunktion im Vergleich zu den Autokorrelationsfunktionen etwas später ab, diese vergleichsweise geringe Abweichung ist jedoch auf den in Kap. 3.5 angesprochenen chromatischen Effekt zurückzuführen.

Im Unterschied zu den Autokorrelationsfunktionen in Abb. 5.11 ist die Funktion der Kreuzkorrelation über einen weiten Zeitbereich von 0.001 bis ca. 0.1 ms konstant. Dies zeigt zum einen, daß in diesem Zeitbereich keine weiteren Abstandsfluktuationen mit großer Amplitude stattfinden. Ferner sind die photophysikalischen Eigenschaften des Donors (Triplet) bzw. Akzeptors (Cis-Trans-Isomerisierung), die ein Abklingen der jeweiligen Autokorrelationsfunktionen im Bereich um 0.05 ms zur Folge haben, nicht miteinander korreliert und übertragen sich somit nicht auf die Kreuzkorrelationsfunktion. Anders ausgedrückt beeinflussen diese Prozesse den Energietransfer nicht, ansonsten würden die entsprechenden Effekte wie Donor-Triplett oder Cis-Trans-Isomerisierung des Cy5 sich in der Kreuzkorrelationsfunktion widerspiegeln.

5.7.3 Die Bestimmung der Relaxationszeit der FRET-Dynamik

Im Rahmen einer Anpassung der Gl 3.35 an die Kreuzkorrelationsfunktionen ($G(t_C)_{KK}$) kann die Relaxationszeit für die Dynamik des Gleichgewichts zwischen A/D- und A/B-Konformer bestimmt werden (vgl. Kap. 3.5). Dabei wird die Diffusionszeit sowie die Abmessung des Detektionsvolumens, ausgedrückt durch das Verhältnis z_0/ω_0 (Vgl. Kap. 2.4), für die Referenz (1,3-Konstrukt) und das 1,2-Konstrukt global angepaßt. Auf diese Weise wird die Diffusionszeit t_D aus der Kreuzkorrelationsfunktion der Referenz bestimmt, so daß die Relaxationszeit t_{FRET} aus der Kreuzkorrelationsfunktion des 1,3-Konstrukts extrahiert werden

kann. Nach diesem Verfahren konnten aus den in Abb. 5.11 gezeigten Kreuzkorrelationskurven die folgenden Parameter bestimmt werden:

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Korrelationsanalyse

	N	z_0/ω_0	t_d [ms]	T_{eq}	t_T [μs]	A_{FRET}	t_{FRET} [ms]
1,2-Konstrukt	0.5±0.1	1.0 ²⁾	2.81±0.01 ¹⁾	0.06±0.02	6.43±3.20	-0.13±0.01	0.30±0.03
1,3-Konstrukt	0.4±0.1	1.0 ²⁾	2.81±0.01 ¹⁾	0.10±0.01	4.66±0.46	-	-

¹⁾ Diese Parameter wurden global angepaßt. ²⁾ Diese Parameter wurden bei der Anpassung festgehalten

N ist die Anzahl der Fluorophore die sich in einem der Singulettzustände befinden; t_D ist die Diffusionszeit; t_T die charakteristische Triplettzerfallszeit; T_{eq} die relative Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustands. A_{FRET} ist die Amplitude für die FRET-Dynamik und z_0 und ω_0 sind die 1/e - Radien in axialer und radialer Richtung.

Als zusätzliche Information erhält man aus der Anpassung die Anzahl N der Fluorophore, die sich in einem der Singulettzustände befinden, sowie die Triplettzerfallszeit t_T mit der entsprechenden Amplitude T_{eq} , die das leichte Abklingen der Kreuzkorrelationsfunktion im Bereich um 0.01 ms charakterisieren. (Aufgrund der Prozedur, die bei der Kreation der Korrelationsfunktionen angewandt wurde, ist eine Interpretation der Anzahl der Fluorophore im Detektionsvolumen N im üblichen Sinn hier nicht möglich.)

Die Parameter, die die FRET-Dynamik charakterisieren A_{FRET} und t_{FRET} sind in den letzten beiden Spalten der Tabelle 5.1 angegeben. Das negative Vorzeichen der Amplitude A_{FRET} drückt das antikorrelierte Verhalten aus. Die auf diese Weise bestimmte Relaxationszeit t_{FRET} von 0.3 ms ist konform mit den Ergebnissen der zuvor gezeigten Zeitfensteranalyse. Diese Untersuchung zeigt, daß die neuartige speziesselktive Kreuzkorrelationsanalyse von FRET-Einzelmoleküldaten sehr gut geeignet ist, um Zeitkonstanten von dynamischen Intramolekularenprozessen zu ermitteln, die ansonsten nur schwer zugänglich sind.

5.7.4 Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} für die Umfaltung der Holliday-Junction

Zum Abschluß der Studie soll eine kurze Beispielrechnung zeigen, daß sich aus den Ergebnissen der Einzelmolekülanalyse leicht die Geschwindigkeitskonstanten einer intramolekularen Dynamik bestimmen lassen. Die Umfaltung der beiden Konformere A/B

und A/D läßt sich unter Vernachlässigung der offenen Struktur als Übergangszustand als einfache Gleichgewichtsreaktion beschreiben:

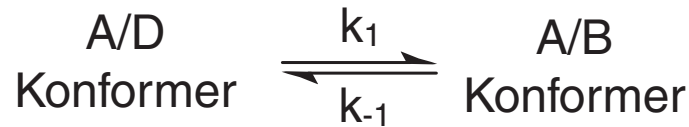


Abb. 5.13: Konformeren -Gleichgewicht zwischen A/D- und AB-Konformer

Die Gleichgewichtskonstante K für eine solche Reaktion ist folgendermaßen definiert:

$$K = \frac{\text{A/B-Konformer}}{\text{A/D-Konformer}} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad \text{Gl.6.3}$$

Im Rahmen dieser Messungen konnte gezeigt werden, daß die relativen Anteile der Konformere nicht wesentlich von der Mg^{2+} -Konzentration abhängen. Daher kann K für alle Mg^{2+} -Konzentrationen aus den relativen Anteilen für das A/B- und A/D-Konformer aus der Messung des 1,2-Konstrukts approximiert werden. Daraus ergibt sich ein Wert für K von 1.7.

Für die Messung des 1,2-Konstrukts bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1.0 mM wurde mit Hilfe der Korrelationsanalyse eine Relaxationszeit t_{FRET} von 0.3 ms bestimmt. Die Relaxationszeit t_{FRET} ist nach Gl. 3.34 mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} verknüpft, so daß diese sich nach den folgenden Gleichungen berechnen lassen:

$$k_1 = \frac{K}{t_{\text{FRET}}(1+K)} \quad \text{Gl. 6.4 A}$$

$$k_{-1} = \frac{k_1}{K} \quad \text{Gl. 6.4 B}$$

Somit ergibt für die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion k_1 ein Wert von 2.1 ms und für k_{-1} ein Wert von 1.2 ms. Das entspricht einer Zustandslebensdauer des A/D-Konformers von $\approx 480 \mu\text{s}$, die Zustandslebensdauer des A/B-Konformers beträgt entsprechend $\approx 830 \mu\text{s}$.

5.8 Fazit der Untersuchungen an der Holliday Junction

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die untersuchte Holliday-Junction beide antiparallelen X-Konformationen bevölkert. Dabei ist das A/D-Konformer thermodynamisch leicht bevorzugt, so daß das Verhältnis von A/D- zu A/B-Konformer ca. 62.9% zu 27.1% beträgt.

Aus den berechneten Abständen zwischen Donor und Akzeptor wurde der interhelikale Winkel, γ_{ih} , aus drei unterschiedlichen Abstandspaaren abgeschätzt. Mit $67^\circ \pm 7^\circ$ liegt dieser im erwarteten Bereich und ist konform mit entsprechenden Literaturangaben.

Ferner konnte gezeigt werden, daß sowohl der Interhelikale Winkel als auch die Umfaltgeschwindigkeit zwischen den beiden X-Konformeren von der Mg^{2+} -Konzentration abhängt, während das Verhältnis A/D- zu A/B-Konformer nicht wesentlich beeinflusst wird. Die Umfaltgeschwindigkeit zwischen den Konformeren war bis zu einer Konzentration von 2 mM $MgCl_2$ langsamer als die Diffusionszeit der Moleküle durch das Detektionsvolumen (ca. 2 ms) und damit im Rahmen dieser Studie nicht näher bestimmbar.

Für das Konformeren-Gleichgewicht der untersuchten Holliday-Junction in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$ konnte, mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit erstmals angewendeten Zeitfenster- und Kreuzkorrelationsanalyse von selektierten Einzelmolekülereignissen, eine Relaxationszeit von 300 μs bestimmt werden. Schließlich konnten aus der Relaxationszeit die Zustandslebensdauer des A/D-Konformers ($\approx 480 \mu s$) und des A/B-Konformers ($\approx 830 \mu s$) bestimmt werden.

Insgesamt konnte diese Studie zeigen, daß Einzelmolekül-FRET-Messungen auf der Grundlage der MFD-Technik gezielt zur Untersuchung von intramolekularen Kinetiken eingesetzt werden können, die andernfalls nur schwer zugänglich sind.

6 Struktur- und Dynamik eines SNARE-Proteins

Während die bisherigen Studien sich auf die Aufklärung von relativ einfachen und definierten Nukleinsäurestrukturen beschränkten, soll die Technik nun zur Untersuchung eines Proteins herangezogen werden. Bei diesem Protein handelt es sich um Syntaxin-1, das an der Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt ist. Im Rahmen dieser Studie soll sowohl die Struktur als auch die konformationelle Dynamik mittels FRET charakterisiert werden.

6.1 Allgemeine Bemerkungen

Syntaxin-1 gehört zur Familie der SNARE-Proteine (SNARE = Soluble NSF Attachment Protein Receptor). Bei den SNARE-Proteinen handelt es sich um relativ kleine und in der Regel membrangebundene Proteine (Brunger, 2001; Hughson, 1999; Jahn, 1999; Rothman, 1994), denen eine Schlüsselfunktion bei exozytotischen Membranfusionsvorgängen bei eukariontischen Zellen zugeordnet wird. Für jede Art von Membranfusionsprozessen gibt es individuelle SNARE-Proteine. Allen Proteinen ist eine homologe „Heptad-Repeat“ Sequenz von 60 Aminosäuren gemeinsam, die als SNARE-Motiv bezeichnet wird.

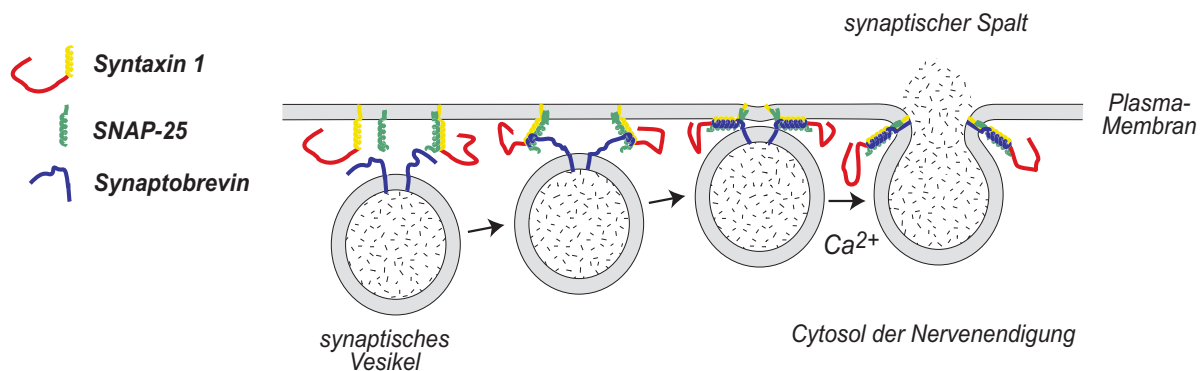


Abb. 6.1: Modell der Membranfusion an der Synapse. Die Ausschüttung des Neurotransmitters wird durch die Bildung des ternären SNARE-Komplexes aus den SNARE-Proteinen Syntaxin 1, Synaptobrevin und SNAP-25 eingeleitet. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Syntaxin 1 gehört neben SNAP-25 (\equiv Synaptosomal-Associated Protein) und Synaptobrevin zu den drei Proteinen die den ternären SNARE-Komplex bilden. Vermutlich leitet diese Komplexbildung die Membranfusion zwischen den mit Neurotransmittern beladenen synaptischen Vesikeln und der präsynaptischen Membran am Ende des Axons einer Nervenzelle ein. Ein Modell dieses Prozesses, der zur Freisetzung der Neurotransmitter in den

synaptischen Spalt führt und damit die Reizweiterleitung zwischen den Nervenzellen gewährleistet, ist schematisch in Abb. 6.1 dargestellt.

Synaptobrevin befindet sich an der Vesikelmembran und wird deshalb auch als VAMP (= Vesicle Associated Membrane Protein) bezeichnet, während Syntaxin und SNAP-25 an der präsynaptischen Membran lokalisiert sind und einen binären Komplex bilden. Nähert sich ein Vesikel der Membran, treten die SNARE-Motive der drei Proteine in Wechselwirkung und bilden in einer Art Reißverschlußmechanismus den ternären trans-SNARE-Komplex (kurz: SNARE-Komplex): Die Komplexbildung zwingt beide gegenüberliegende Membranen zu einem engen Kontakt. In einem Ca^{2+} -abhängigen Schritt kommt es schließlich zur Fusion der beiden Lipiddoppelschichten und damit zur Freisetzung des Neurotransmitters. Anschließend kann der Komplex in einem ATP-abhängigen Schritt wieder aufgelöst und die einzelnen Komponenten für den nächsten Zyklus wiederverwendet werden.

Der gebildete SNARE-Komplex besteht aus einem verdrehten rechtsgängigen Bündel von vier α -Helices mit ca. 12 nm Länge (Sutton, 1998). Dabei steuern Synaptobrevin und Syntaxin 1 jeweils eine Helix (SNARE-Motiv) und SNAP-25 zwei Helices bei. Abb. 6.3 zeigt eine schematische Darstellung des Komplexes.

Unter den drei Proteinen, die den SNARE-Komplex bilden, nimmt Syntaxin-1 eine Sonderstellung ein. Es besteht aus einer C-terminalen Transmembranregion, an die sich das SNARE-Motiv anschließt. Im Gegensatz zu Synaptobrevin und SNAP-25 besteht der N-Terminus des Syntaxins, der über ein kurzes Verbindungstück mit dem SNARE-Motiv verbunden ist, aus einer unabhängig gefalteten Domäne, die als Habc-Domäne bezeichnet wird und nicht an der Bildung des SNARE-Komplexes beteiligt ist. Die Aminosäuresequenz der Habc-Domäne ist innerhalb der verschiedenen Isoformen des Syntaxins kaum verändert. Dies läßt vermuten, daß die N-terminale Domäne eine spezifische Funktion bei der Exocytose besitzt.

Die Struktur der Habc-Domäne wurde zuerst mit Hilfe von NMR-Untersuchungen aufgeklärt (Fernandez, 1998) und später durch eine Röntgenstrukturstudie bestätigt (Lerman, 2000). Die Domäne besteht aus drei α -Helices, a, b und c, die sich zu einem Helix-Bündel zusammenlagern (Habc -Domäne). Dabei entsteht eine Mulde, deren Oberfläche aufgrund der dort lokalisierten Aminosäurereste eine ideale Bindungsstelle für eine weitere α -Helix darstellt.

Einige Studien deuten darauf hin, daß das SNARE-Motiv (H3-Domäne des Syntaxins, vgl. Abb. 6.2) im freien, ungebundenen Syntaxin-1 auf die Mulde der Habc-Domäne zurückfaltet (Dulubova, 1999; Munson, 2000; Nicholson, 1998). Durch diese Interaktion entsteht die sog. geschlossene Konformation des Syntaxins (Abb. 6.2).

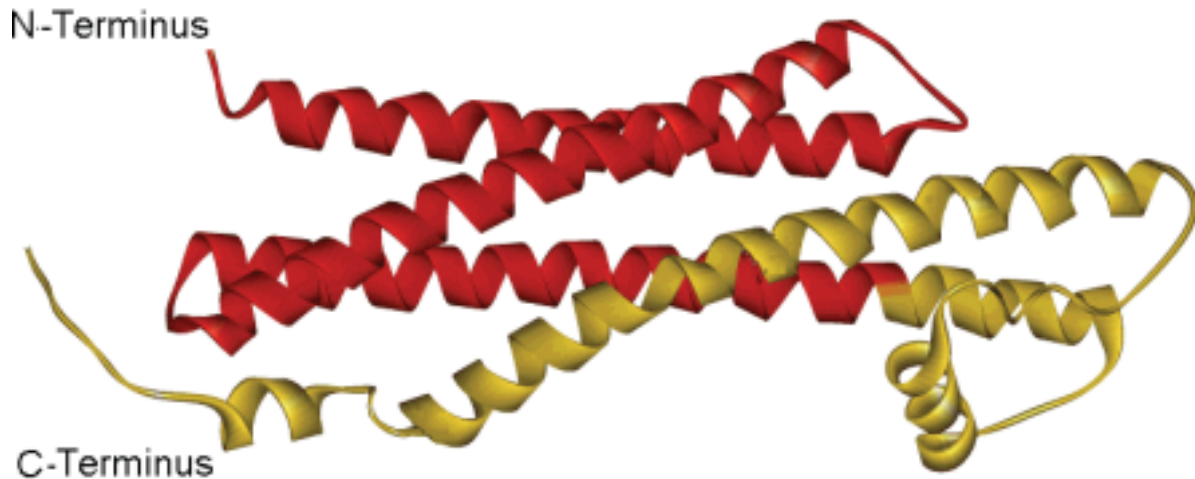


Abb. 6.2: Struktur des Syntaxin-1a in der geschlossenen Konformation, ohne die Transmembran-Region (aufgenommen im Komplex mit Munc-18 (Misura, 2000)). Die drei Helices der Habc-Domäne sind rot markiert, die H3-Domäne einschließlich der Verbindung zur Habc-Domäne ist gelb.

In der geschlossenen Konformation kann das Syntaxin-1 nicht mit Synaptobrevin und SNAP-25 interagieren, so daß die geschlossene Konformation in direkter Konkurrenz zur Bildung des SNARE-Komplexes steht.

Untersuchungen der Interaktion zwischen Syntaxin-1 und Proteinen, die in den Nervenendigungen lokalisiert sind, haben gezeigt, daß einige für die Neurotransmitterausschüttung essentielle Proteine an die Habc-Domäne binden (Betz, 1997; Hata, 1993; Kee, 1995). Ein Beispiel für eine solche Interaktion ist der Syntaxin-1/Munc-18-Komplex (Munc-18 wird häufig auch als n-Sec1 bezeichnet). Im Rahmen einer Röntgenstrukturanalyse dieses Komplexes (Misura, 2000) konnte gezeigt werden, daß Munc-18 das Syntaxin-1 in der geschlossenen Konformation arretiert.

6.2 Ziel der Studie

Es ist selbstverständlich, daß ein Prozeß wie die Übertragung eines Nervenimpulses hochgradig kontrolliert ablaufen muß. Die bereits genannten Eigenschaften des Syntaxin-1 machen es zu einem Kandidaten, der für die Kontrolle der Bildung des SNARE-Komplexes in Frage kommt, so daß Syntaxin-1 eine wichtige Funktion bei der Regulation der

Neurotransmitterausschüttung zukommen könnte. Während bekannt ist, daß Syntaxin-1 im ternären SNARE-Komplex in der offenen und im Komplex mit Munc-18 in der geschlossenen Konformation vorliegt, sind bis heute nur wenige Details über die Struktur und das dynamische Verhalten des ungebundenen Syntaxins unter physiologischen Bedingungen bekannt.

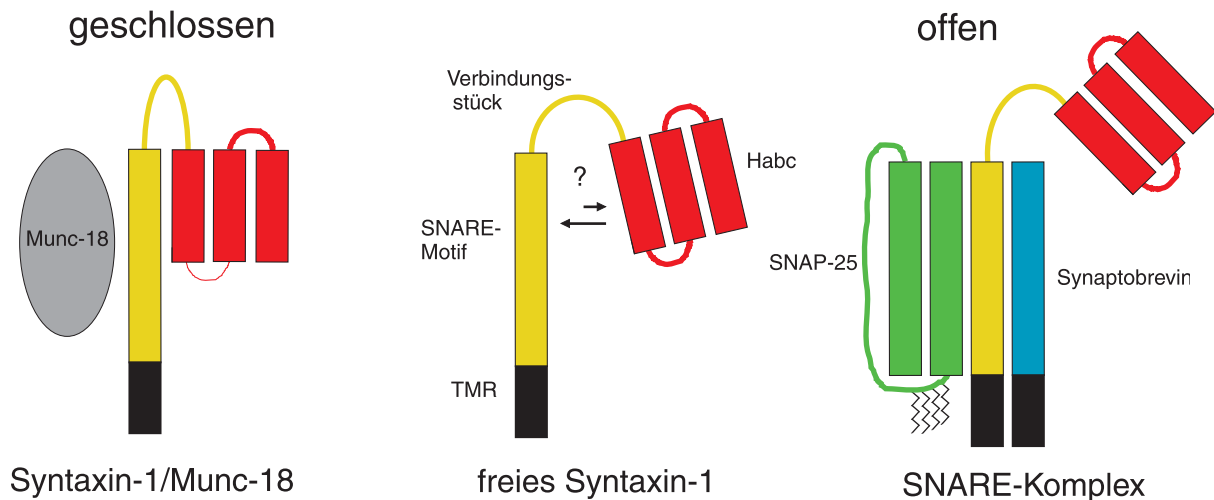


Abb. 6.3: Schematische Darstellung der Konformationen des Syntaxin-1: Rechts offen im ternären SNARE-Komplex und links geschlossen im Komplex mit Munc-18. In der Mitte ist das freie, ungebundene Syntaxin-1 gezeigt, über dessen Konformation und eventuelles dynamisches Verhalten nur wenig bekannt ist. Sowohl natives Syntaxin als auch Synaptobrevin besitzen jeweils eine Transmembranregion (TMR).

Doch diese Informationen sind essentiell für das Verständnis der Funktion des Syntaxins als molekularer Schalter bei der Bildung des SNARE-Komplexes. Nach der bisher vorherrschenden Meinung liegt das freie Syntaxin im wesentlichen in der geschlossenen Konformation vor (Nicholson, 1998). Daraus ergibt sich die Frage, wie Syntaxin in die offene Konformation überführt wird, in der es mit den anderen SNARE-Proteinen den SNARE-Komplex bilden kann.

Um die Rolle des Syntaxins bei der Regulation des Fusionsprozesses besser zu verstehen, sollen im Rahmen dieser Studie sowohl die Struktur als auch eventuelle Dynamiken des Syntaxins mit Hilfe von FRET-Untersuchungen auf Einzelmolekülebene untersucht werden. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Interaktion zwischen der Habc- mit der H3-Domäne.

6.3 Die verschiedenen Mutanten des Syntaxins

Für die Untersuchungen wurde ausschließlich das artifizielle cytosolische (in Wasser lösliche) Syntaxin-1A verwendet, dem die Transmembranregion fehlt, und somit nicht in einer Membran integriert ist. Auch von SNAP-25 und Synaptobrevin wurden die entsprechenden wasserlöslichen Varianten verwendet.

Im Gegensatz zu den beiden DNA-Studien, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden, ist bei dieser Studie weder die Position der Fluorophore relativ zum Protein noch die Struktur des Syntaxin-1 von vornherein bekannt. Um dennoch gesicherte Aussagen aus den FRET-Untersuchungen zu gewinnen, wurden drei Serien von Doppelmutanten des Syntaxins hergestellt (vgl. Kap. 3.7.3). Die Positionen der Cysteine, an die die Fluorophore gebunden wurden, wurden so gewählt, daß letztlich für fast alle Markierungspositionen mindestens drei Abstände bestimmt werden können (vgl. Tabelle 6.1). Durch diese Vorgehensweise können die Positionen der betreffenden Cysteine im dreidimensionalen Raum mit Hilfe eines „molecular Modelling“-Verfahrens, das in der Gruppe von Dr. Helmut Grubmüller (MPIBPC, Göttingen) von Gunnar Schröder entwickelt wurde, bestimmt werden. Anhand dieser Daten läßt sich schließlich ein Modell für die Struktur des freien Syntaxins erstellen.

Neben diesem Kriterium für die Auswahl der Markierungspositionen wurde darauf geachtet, daß die Fluorophore die Interaktion zwischen H3- und Habc-Domäne nicht behindern. Abb. 6.4 zeigt die auf diese Weise ausgewählten Positionen in der Syntaxinstruktur.

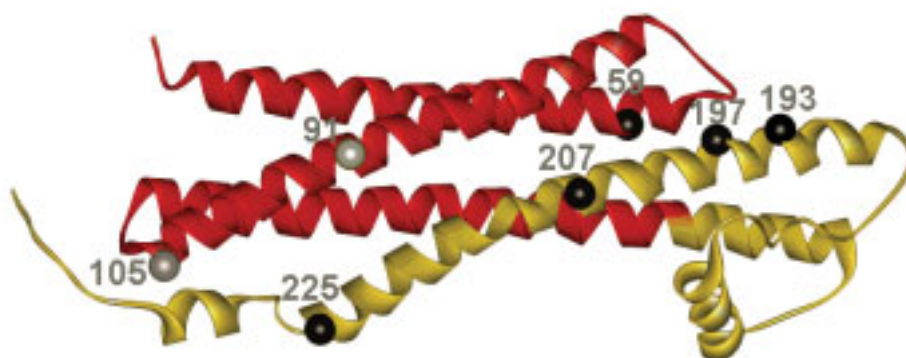


Abb. 6.4: Die Positionen der gegen Cystein ausgetauschten Aminosäuren.

Tabelle 6.1: Die verwendeten Doppelmutanten.

59er-Serie	91er-Serie	105er-Serie	weitere
Sx 59/91	(Sx 59/91)		
Sx 59/105		(Sx 59/105)	
Sx 59/167	Sx 91/167 Sx 91/193		Sx 167/197
Sx 59/197	Sx 91/197	Sx 105/197	
Sx 59/207	Sx 91/207	Sx 105/207	
Sx 59/225	Sx 91/225	Sx 105/225	Sx 151/225

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen H3- und Habc-Domäne sind die Mutanten, bei denen eine Markierungsposition in der Habc-Domäne (59, 91 oder 105) und die andere in der H3-Domäne (193, 197, 207 und 225) lokalisiert ist, besonders relevant. Als interne Kontrolle dienen die Konstrukte Sx 59/91 und Sx 59/105 bei denen sich beide Markierungspositionen in der durch die α -Helix-Struktur eher rigiden und gut charakterisierten Habc-Domäne befinden.

Aufgrund der besonderen Markierungsprozedur (vgl. Kap. 3.7.3), die im Rahmen dieser Studie angewendet wurde, ergeben sich für jede Doppelmutante, unter Vernachlässigung möglicher einfach markierter Moleküle, vier unterschiedlich markierte Moleküle; davon sind zwei FRET-aktiv. Für Sx 59/105 ergeben sich beispielsweise die FRET-aktiven Varianten Sx 59(D)/105(A) und Sx 59(A)/105(D). Diese sind beispielhaft in Abb. 6.5 gezeigt.

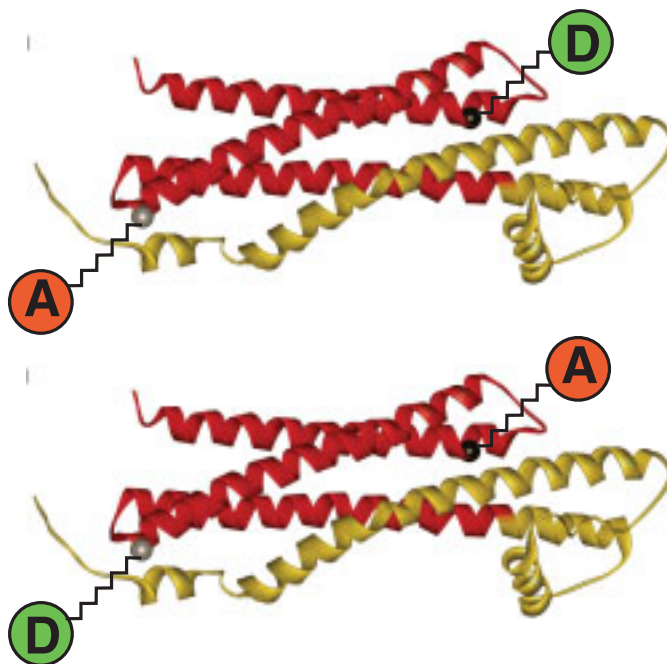


Abb. 6.5: Die zwei unterschiedlichen FRET-aktiven Moleküle der Syntrophinmutante Sx59/105.

Generell wird angenommen, daß sich beide bezüglich der FRET-Eigenschaften nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Wäre diese Annahme in dem einen oder anderen Fall nicht gewährleistet, würde sich dies in einer entsprechenden Abweichung von der sigmoiden Kurve im $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramm bemerkbar machen. Eine solche Abweichung wurde jedoch in keinem Fall beobachtet.

6.4 Die Eigenschaften des Donorfluorophors

6.4.1 Fluoreszenzlebensdauer

Neben den oben beschriebenen Doppelmutanten wurde eine Syntaxinmutante mit nur einem Cystein in der Position 225 hergestellt, das mit dem Maleinimid des Fluorophors Alexa 488 markiert wurde. Diese Mutante wurde im Rahmen einer Lebensdauerfluoreszenzanalyse dazu verwendet, mögliche Wechselwirkungen zwischen Alexa 488 und den Aminosäuren des Syntaxins zu erkennen und in den späteren FRET-Analysen zu berücksichtigen. Dabei wurde auf die einfachmarkierte Mutante Sx 225 zurückgegriffen, um Effekte, die durch einen zweiten im Molekül befindlichen Fluorophor verursacht werden (z.B. Homoenergietransfer), auszuschließen. Das Ergebnis der entsprechenden Einzelmolekülanalyse ist in Abb. 6.6 dargestellt.

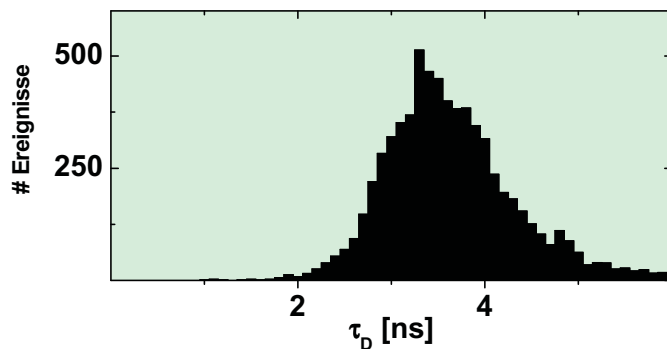


Abb. 6.6: Fluoreszenzlebensdauerverteilung für Alexa 488 gebunden an Syntaxin 1 (Cystein in Position 225). (Fluoreszenzlebensdauerachse nicht korrigiert)

Im Gegensatz zu der DNA-Strukturstudie zeigt Alexa 488 gebunden an Syntaxin keine zweite Fluoreszenzlebensdauerspezies. Aus den Photonen aller Ereignisse der Einzelmolekülmessung in Abb. 6.7 wurde eine Fluoreszenzabklingkurve kreiert (vgl. Kap. 3.2 und 3.3.5). Bei der anschließenden Anpassung waren zwei Exponenten zur Beschreibung des Abklingverhaltens erforderlich:

$$\tau_{D1}: 2.82 \text{ ns}$$

$$X_{D1}: 0.61$$

$$A_{D1}: 0.44$$

τ_{D2} : 5.64 ns X_{D2} : 0.39 A_{D2} : 0.56

Dabei fällt auf, daß die Fluoreszenzlebensdauer τ_{D2} im Vergleich zur Lebensdauer des freien Fluorophors, die etwa vier Nanosekunden beträgt, deutlich verlängert erscheint. Ein solches Phänomen deutet auf das Vorliegen einer Exciplexlöschung hin (vgl. Kap. 3.6). Dementsprechend muß die Lebensdauerachse in den entsprechenden Histogrammen der Einzelmolekülmessungen korrigiert werden. Nach dem Verfahren, das in Kap. 3.6 vorgestellt wurde, errechnet sich aus den oben angegebenen Werten ein Korrekturfaktor b für die in Einzelmolekülexperimenten bestimmte Fluoreszenzlebensdauer von 0.89. In Ermangelung weiterer einfachmarkierter Syntaxine wurde dieser Wert für die Korrektur aller Einzelmolekülmessungen dieser Studie verwendet. Es besteht die gerechtfertigte Annahme, daß der Wert sich für andere einfach markierte Konstrukte nicht wesentlich ändert.

6.4.2 Fluorophorbeweglichkeit

Um eventuelle Orientierungseffekte, die Fehler in der späteren Abstandsberechnung zur Folge hätten, auszuschließen, wurde zunächst die Fluorophorbeweglichkeit überprüft (vgl. Kap. 3.4.4). Abb. 6.7 zeigt als repräsentatives Beispiel die zweidimensionalen (τ_D , r_D)-Häufigkeitshistogramme für das freie Sx 105/225 sowie für die entsprechenden Komplexe. Die Ergebnisse aller weiteren Messungen sind in Tabelle 6.3 zu finden:

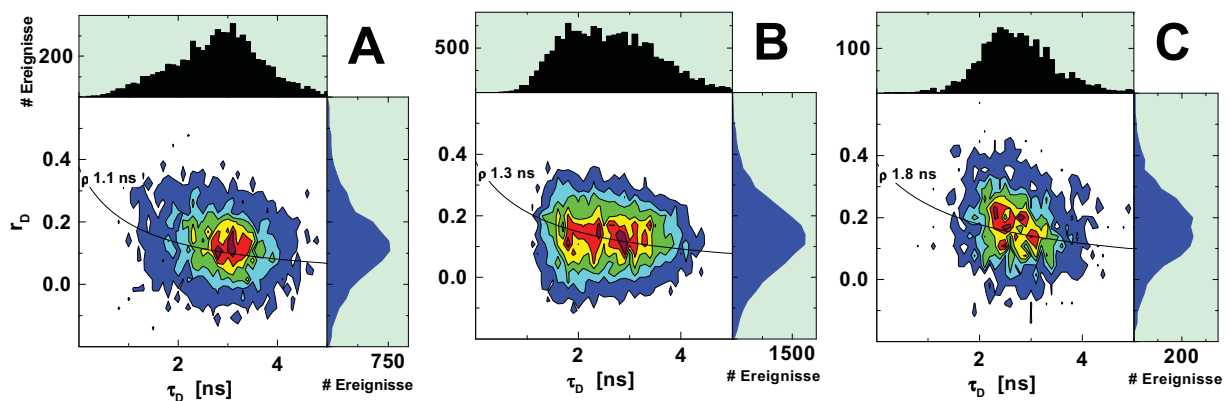


Abb. 6.7: (τ_D , r_D)-Histogramme für Sx 105/225. A) frei B) im Komplex mit Munc-18 und C) im ternären SNARE-Komplex ($r_0 = 0.375$, für alle)

Die Rotationskorrelationszeit nimmt mit steigendem Molekulargewicht von 1.1 ns für das freie Syntaxin bis auf 1.8 ns im SNARE-Komplex zu. Dieser Trend wird für alle gemessenen Konstrukte im wesentlichen bestätigt, wie Tabelle 6.1 zeigt. Diese Zunahme ist auf die

langsamere Bewegung der Komplexe zurückzuführen. Berücksichtigt man die langsame Rotation des gesamten Proteins, lassen die bestimmten Rotationskorrelationszeiten auf eine schnelle Bewegung des Donorfluorophors schließen (vgl. Kap. 4.3.4 und 3.4.4).

Tabelle 6.1: Rotationskorrelationszeiten für alle Konstrukte

Molekül	Freies Syntaxin	Syntaxin-1/Munc18	SNARE-Komplex
Sx 59/91	1.5 ns		
Sx 59/105	1.8 ns		
Sx 59/167	1.1 ns		
Sx 59/197	1.2 ns		2.1 ns
Sx 59/207	1.2 ns	1.5 ns	2.5 ns
Sx 59/225	1.8 ns		
Sx 91/167	1.1 ns		1.7 ns
Sx 91/193	1.8 ns		1.5 ns
Sx 91/197	1.6 ns		
Sx 91/207	1.6 ns		
Sx 91/225	1.8 ns	1.5 ns	3.3 ns
Sx 105/197	1.5 ns		3.7 ns
Sx 105/207	2.0 ns		3.7 ns
Sx 105/225	1.5 ns	1.8 ns	2.3 ns
Sx 151/225	2.3 ns		3.7 ns
Sx 167/197	1.3 ns		

Die Werte wurden aus den entsprechenden (r_D , τ_D)-Histogrammen bestimmt.

Aufgrund der langen Fluoreszenzlebensdauer des Alexa 594 reicht das zur Verfügung stehende Meßfenster von 12.5 ns für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer, bzw. der Fluoreszenzanisotropie, bei Anregung des Akzeptors via FRET nicht aus, so daß im Gegensatz zu anderen Studien diese Parameter für die Bestimmung der Mobilität beider Fluorophore nicht zur Verfügung stehen. Aufgrund der Tatsache, daß der Donorfluorophor relativ frei beweglich ist, können größere Fehler bei der Berechnung von R_{0r} infolge eines κ^2 , das signifikant von 2/3 abweicht, ausgeschlossen werden.

6.5 Die Bestimmung der Abstände im Syntaxin

Im Rahmen dieser Studie wurden die Abstände nach Gl. 3.27 direkt aus dem Intensitätsverhältnis F_D/F_A bestimmt. Der hierfür notwendige reduzierte Försterradius R_{0r} für Alexa 488 und Alexa 594 beträgt 59.1 Å und berechnet sich aus den Werten in Tabelle 3.3.

Die ebenfalls benötigte Akzeptorquantenausbeute wurde nach Gl. 3.16 bestimmt. Als Referenz diente dabei Rhodamin 6G mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 4.0 ns und einer Quantenausbeute von 0.95. Auf diese Weise errechnet sich für Alexa 594 (gebunden an Syntaxin-1a) eine Quantenausbeute von 0.7.

Bei der Berechnung des Intensitätsverhältnisses F_D/F_A muß die direkte Anregung (DE) des Akzeptorfluorophors in Betracht gezogen werden, die aus der Zählrate pro Molekül (cpm) im Rahmen einer FCS-Messung bestimmt wurde und unter den gegebenen experimentellen Bedingungen 2 bis 3 kHz betrug. Die Fluoreszenzintensität F_A berechnet sich dann nach Gl. 3.2.3.

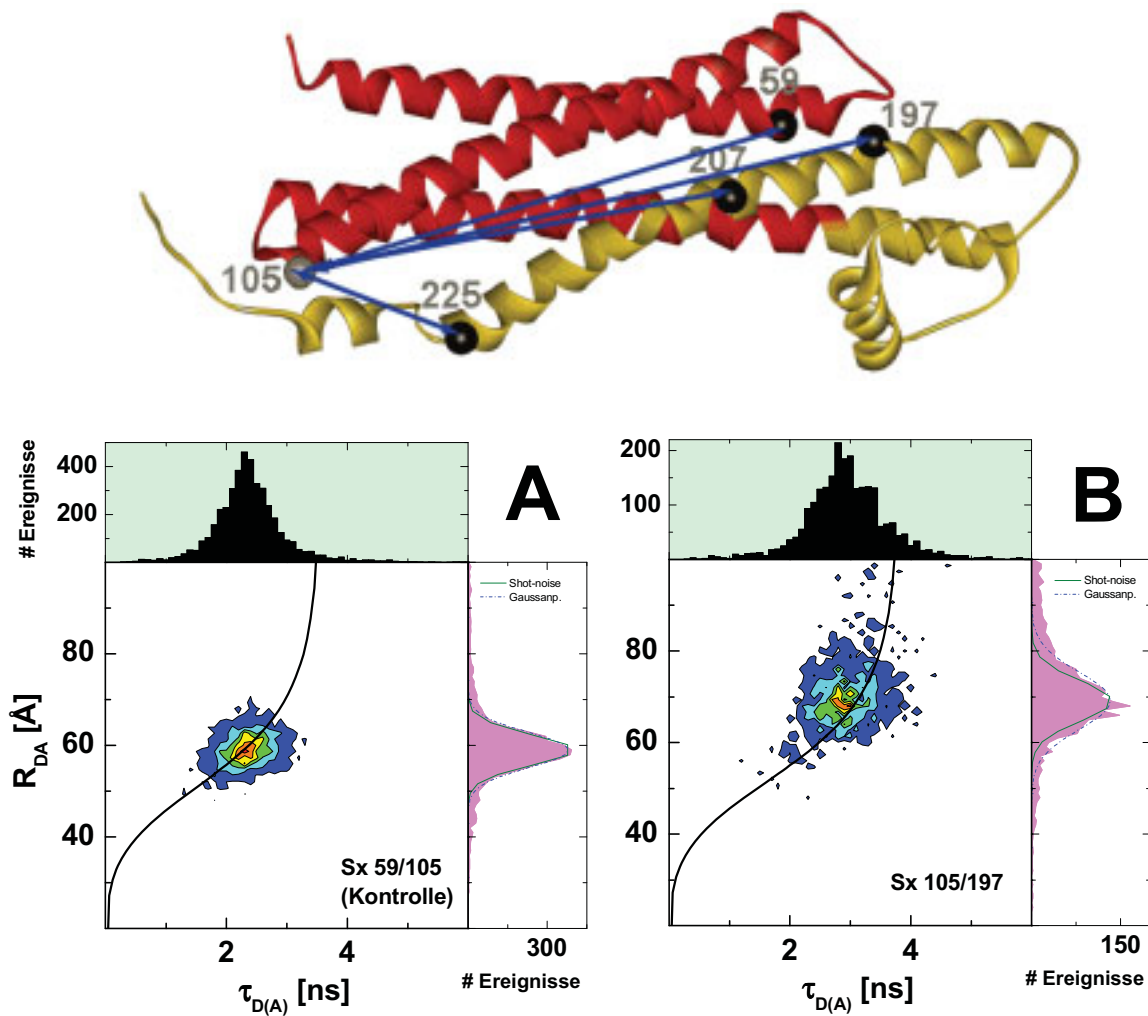
Bei den im Folgenden vorgestellten zweidimensionalen Häufigkeitshistogrammen ist stets aus Gründen der Anschaulichkeit das Intensitätsverhältnis F_D/F_A durch den Abstand R_{DA} ersetzt (Vgl. Kap. 3.4.3).

Weiterhin gilt es zu beachten, daß insbesondere durch die Korrektur des Signals S_R im roten Spektralbereich um die Hintergrundzählrate B_R , die direkte Anregung DE und den Crosstalk α in den dargestellten Histogrammen nur noch solche Moleküle erscheinen, die sowohl den Donor- als auch den Akzeptorfluorophor tragen (für Moleküle, die nur mit dem Donorfluorophor markiert sind, ergibt sich durch die Korrektur z. B. ein negatives F_A !). Man muß sich jedoch bewußt sein, daß die Proben, die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen verwendet wurden aufgrund der erforderlichen speziellen Markierungsprozedur, sehr heterogen sind (Vgl. Kap. 3.7.3) und nur auf Einzelmolekülniveau untersucht werden können.

6.5.1 Das freie Syntaxin

Die $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme der Abb. 6.9 A-D zeigen das Ergebnis der Einzelmolekül-FRET-Messungen der 105er-Serie nach "burstweiser" Analyse. Die Kontrollmutante Sx 59/105 zeigt aufgrund der rigiden Struktur der Habc-Domäne die erwartete schmale Abstandsverteilung, die im wesentlichen vom Shot-noise (olivfarbene Linie im R_{DA} -Histogramm) begrenzt wird. Folgt man der gängigen Vorstellung, daß das freie Syntaxin in der geschlossenen Konformation vorliegt, sollten die Messungen der anderen Konstrukte, bei denen sich jeweils eine Markierungsposition auf der H3-Domäne befindet, ähnlich schmale Verteilungen ergeben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Bereits die Abstands-

Verteilungen der Konstrukte Sx 105/197 und Sx 105/207 sind gegenüber dem berechneten Shot-noise verbreitert. Die signifikanteste Abweichung von der Vorstellung einer definierten geschlossenen Konformation wird jedoch für das Konstrukt Sx 105/225 beobachtet. Basierend auf den Daten der Kristallstrukturanalyse des Syntaxin/Munc-18-Komplexes wird für diese Markierungspositionen in der geschlossenen Konformation ein kurzer, definierter Abstand zwischen Donor und Akzeptor erwartet. Die Einzelmolekül-FRET-Messung zeigt jedoch eine extrem breite Abstandsverteilung, die sich beinahe über den gesamten meßbaren Abstandsbereich erstreckt. Diese breite Verteilung kann nur mit zwei Gaußfunktionen angepaßt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß das freie Syntaxin nicht ausschließlich in der geschlossenen Konformation vorliegt, sondern mindestens ein weiterer Zustand bevölkert wird, bei dem Donor- und Akzeptorfluorophor im Sx 105/225 weiter voneinander entfernt sind.



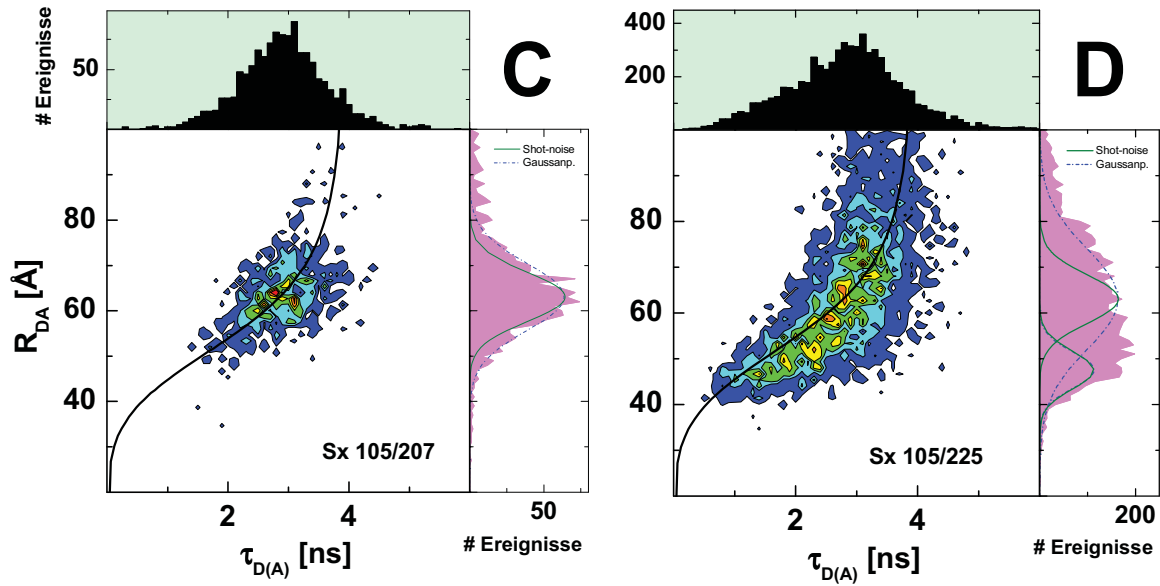


Abb. 6.8: Oben: Struktur des geschlossenen Syntaxin-1a. Die schwarzen Kugeln repräsentieren die Markierungspositionen und die Pfeile die gemessenen Abstände. Die Abbildungen A-D zeigen die $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme der Messungen (A: Sx 59/105; B: Sx 105/197; C: Sx 105/207 und D: Sx 105/225). In den eindimensionalen R_{DA} -Histogrammen (rechte Projektion) ist jeweils eine Gaußanpassung (blaue, gestrichelte Kurve) an die gemessene Verteilung und im Vergleich dazu das nach Gl. 3.31 berechnete Shot-noise (olivfarbene Kurve) gezeigt. (Die Lebensdauerachsen sind korrigiert ($b = 0.89$)). Die Abstände wurden mit $R_{0r} = 59.1 \text{ \AA}$ und $\Phi_{FA} = 0.70$ nach Gl. 3.28 berechnet. Die sigmoiden Kurven geben den Zusammenhang zwischen R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ nach Gl. 3.30 an, die zur Berechnung notwendigen Daten sind: $k_F = 0.16$, $\tau_D = 3.5 \text{ ns}$ für A bzw. $\tau_D = 3.8 \text{ ns}$ für B-D)

Das Resultat der 105er-Serie wird durch die 91er- und 59er-Serie bestätigt. Die bei diesen Serien besonders breiten Abstandsverteilungen von Sx59/207 und Sx91/225 sind in den Abb. 6.10 H und E dargestellt. Auch bei diesen Konstrukten läßt sich die gemessene Abstandsverteilung nicht mehr mit nur einer Gaußfunktion anpassen. Die gemessenen Abstände im freien Syntaxin für alle Konstrukte sind in der zweiten Spalte in Tabelle 6.3 dargestellt. Dabei sind neben dem Abstand jeweils die Halbwertsbreite w der Gaußanpassung an die Abstandsverteilung und zum Vergleich das nach Gl. 3.31 berechnete Shot-noise $\sigma(R_{DA})$ angegeben.

6.5.2 Syntaxin im Komplex

Es ist naheliegend zu vermuten, daß die breiten Abstandsverteilungen der Konstrukte Sx 105/225, Sx 91/225 und Sx 59/207, die nur mit Hilfe zweier Gaußfunktionen beschrieben werden können, auf das Vorliegen der beiden bekannten Konformationen des Syntaxins (offen

und geschlossen) zurückzuführen sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde für die Konstrukte, die im freien Syntaxin eine besonders breite Abstandsverteilung gezeigt hatten, der Syntaxin-1/Munc-18-Komplex als Referenz für die geschlossene Konformation gemessen. Als Referenz für den offenen Zustand wurde für einige Konstrukte der Abstand im SNARE-Komplex bestimmt.

Die resultierenden Abstände, sowie die Halbwertsbreite w der gemessenen Verteilungen und der berechnete Shot-noise sind in Tabelle 6.3 dargestellt. In Abb. 6.9 sind die $(\tau_{D(A)}, R_{DA})$ -Histogramme für die Komplexe (linke Spalte der Syntaxin-1/Munc-18-Komplex und rechte Spalte der SNARE-Komplex) der Konstrukte Sx 105/225, Sx 91/225 und Sx 59/207 dargestellt. Zum Vergleich ist in der mittleren Spalte in Abb. 6.9 jeweils das Resultat der Messung des freien Syntaxins angegeben. Bei diesen Mutanten treten durch die Komplexbildung signifikante Veränderungen der gemessenen Abstandsverteilungen auf. Die Bildung des Syntaxin-1/Munc-18-Komplexes hat jeweils eine deutliche Abnahme in der Breite der Verteilung zur Folge, so daß die gemessene Abstandsverteilung kaum breiter als der berechnete Shot-noise ist. Ferner ist das Maximum der Verteilung für den Syntaxin-1/Munc-18-Komplex im Vergleich zum freien Syntaxin zu kürzeren Abständen hin verschoben. Die in den Abbildungen 6.9 A, D und G verbleibende Subpopulation von Ereignissen mit langen Abständen ist auf eine nicht vollständige Komplexbildung zurückzuführen. Dies konnte durch eine gelelektrophoretische Untersuchung bestätigt werden (Persönliche Mitteilung M. Margittai). Beim SNARE-Komplex fehlt bei allen drei Konstrukten genau die kurze Abstandskomponente, die im Syntaxin-1/Munc-18-Komplex auftritt und ist insgesamt breiter.

Damit bestätigen die Meßergebnisse die oben genannte Hypothese: Im freien Syntaxin liegen offene und geschlossene Konformation nebeneinander vor. Bindet Munc-18 an das Syntaxin, geht dieses vollständig in die geschlossene Konformation über, während im ternären Komplex ausschließlich die offene Form vorliegt. In der offenen Form kann sich die Habc-Domäne, die nicht an der Komplexbildung beteiligt ist, relativ zur H3-Domäne (SNARE-Motiv) frei bewegen, so daß hier zahlreiche Subzustände die Abstandsverteilungen im Vergleich zum Syntaxin-1/Munc-18-Komplex verbreitern.

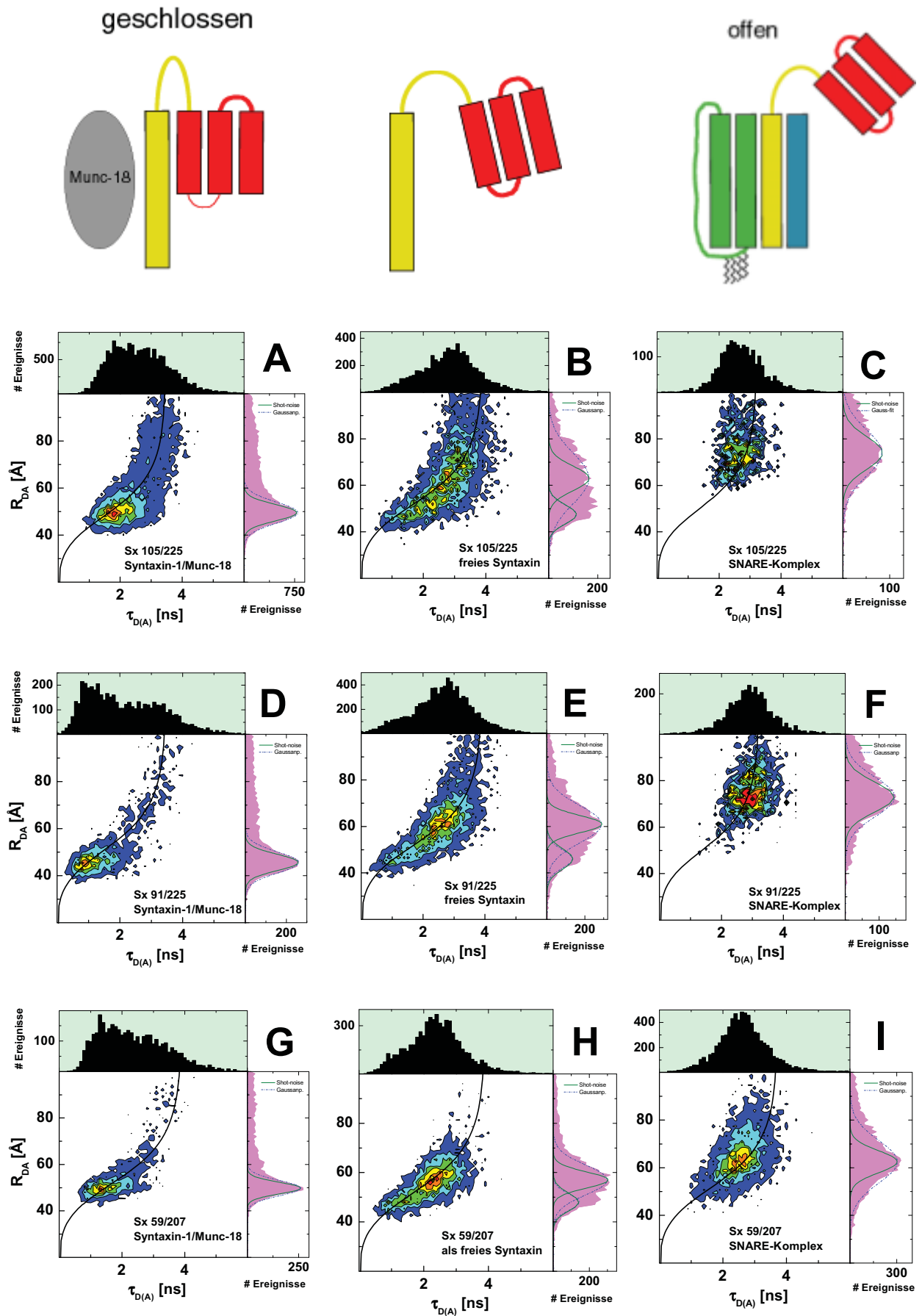


Abb. 6.9: Die Abbildungen in der linken Spalte zeigen jeweils die Meßergebnisse für den Syntaxin-1/Munc-18-Komplex, die Abbildungen der mittlere Spalte zeigen die Ergebnisse für das freie Syntaxin und in der rechten Spalte sind die Resultate für den SNARE-Komplex dargestellt. Jeweils in einer waagerechten Reihe sind die ($\tau_{D(A)}$, R_{DA})-Histogramme für ein Syntaxin-Konstrukt angegeben (A-C zeigen Sx 105/225; D-F zeigen Sx 91/225 und G-I zeigen Sx 59/207. In den eindimensionalen R_{DA} -Histogrammen (jeweilige rechte Projektion) ist jeweils eine Gaußanpassung (blaue, gestrichelte Kurve) an die gemessene Verteilung und im Vergleich dazu der nach Gl. 3.31 berechnete Shot-noise (olivfarbene Kurve) gezeigt. (Die Lebensdauerachsen sind korrigiert ($b = 0.89$). Die Abstände wurden mit $R_{0r} = 59.1 \text{ \AA}$ und $\Phi_{FA} = 0.70$ nach Gl. 3.28 berechnet. Die sigmoiden Kurven geben den Zusammenhang zwischen R_{DA} und $\tau_{D(A)}$ nach Gl. 3.30 an, die zur Berechnung notwendigen Daten sind: $k_F = 0.16$, $\tau_D = 3.5 \text{ ns} - 3.9 \text{ ns}$). Weitere Erläuterungen siehe Text.

Auf der Grundlage der Meßergebnisse für den Syntaxin/Munc-18-Komplex und den SNARE-Komplex kann nun für das freie Syntaxin aus den breiten Abstandsverteilungen der Mutanten Sx 59/207, Sx 91/225 und Sx 105/225 der Anteil der geschlossenen und der offenen Konformation abgeschätzt werden. Dazu wird die Abstandsverteilung des freien Syntaxins mit zwei Gaußverteilungen angepaßt; aus den entsprechenden Flächen kann der Anteil des jeweiligen Konformers berechnet werden.

Jedoch müssen die auf diese Weise bestimmten Flächen zunächst, aufgrund der unterschiedlichen Quantenausbeuten der Fluorophore und der unterschiedlichen Detektionseffizienzen im grünen und im roten Spektralbereich, korrigiert werden. Nach dem in Kap. 5.5.1 vorgestellten Verfahren ergibt sich eine Selektionseffizienz für den geschlossen Zustand, sel_{zu} , von 0.18 und für den offen Zustand von 0.22. Daraus errechnet sich ein Korrekturfaktor für die Fläche des geschlossenen Zustands von 1.22. Mit Hilfe der auf diese Weise korrigierten Flächen läßt sich schließlich das Verhältnis von geschlossenem zu offenem Syntaxin berechnen (vgl. Kap. 5.5.1). Demnach befinden sich ca. 15 - 30% (je nach Mutante) des freien Syntaxins im geschlossenen Zustand. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Kinetikstudie, (Margittai, 2001) die von Dr. Martin Margittai (MPIBPC, Goettingen) durchgeführt wurde. Dabei wurden die Bildungsgeschwindigkeiten des SNARE-Komplexes für verschiedene Syntaxin- bzw. Synaptobrevin-Konzentrationen anhand der Fluoreszenzanisotropiezunahme verfolgt. Und zwar einmal für Syntaxin mit Habc-Domäne und einmal für ein Syntaxin, dem diese Domäne fehlte. Aus der Differenz der Bildungsgeschwindigkeiten kann dann der Anteil der geschlossenen Konformation abgeschätzt werden. Nach diesem Verfahren errechnet sich ein Anteil von 16% für die geschlossene Konformation.

6.6 Analyse der Kinetik zwischen zwei Konformeren des Syntaxins

Mit Hilfe der bisher vorgestellten Analyse der Einzelmolekül-FRET-Messungen konnte nachgewiesen werden, daß das freie Syntaxin nicht, wie gemeinhin angenommen, ausschließlich in der geschlossenen Konformation vorliegt, sondern in einem Gleichgewicht zwischen dem geschlossenen und einem offenen Zustand existiert, wobei der offene Zustand dominiert. Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob jedes Molekül in seinem Zustand „gefangen“ ist, so daß die breiten Abstandsverteilungen letztlich auf eine statische Heterogenität zurückzuführen ist oder ob sich beide Zustände in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Sollte letzteres zutreffen, stellt sich automatisch die Frage, auf welcher Zeitskala diese Umwandlung stattfindet.

6.6.1 Schrittweise Zeitfensteranalyse

Um diese Fragen zu beantworten, wurde analog zur Holliday-Studie zunächst eine Zeitfensteranalyse der Einzelmolekül-FRET-Messungen (Vgl. Kap. 3.5.1) mit sukzessive kleiner werdenden Zeitfenstern (IG: von 4 bis 0.5 ms) für die Konstrukte Sx 105/225, Sx 91/225 und Sx 59/207 durchgeführt, die eine breite Abstandsverteilung zeigten. Für eine heterogene statische Abstandsverteilung wird dabei unabhängig von der Intervallgröße stets die gleiche breite Verteilung erwartet. (Dabei gilt zu beachten, daß „statisch“ ein relativer Begriff ist. Im Rahmen der verwendeten Technik bedeutet „statisch“, daß die Umwandlungszeit zwischen Zuständen viel länger ist als die entsprechende Diffusionszeit der Moleküle durch das Beobachtungsvolumen.)

Im Gegensatz dazu sollte sich für ein dynamisches Gleichgewicht bei zunehmend kleinerer Intervallgröße die Mittelung über zwei oder auch mehrere Zustände abnehmen. Ab einer ausreichend kleinen Intervallgröße, die sich im Bereich der Dynamik des Gleichgewichts bewegt, sollten sich die einzelnen Zustände schließlich separieren lassen (Vgl. Kap. 3.5.2).

In Abb. 6.10 ist das Ergebnis einer solchen Analyse für die Mutante Sx 91/225 als eindimensionales R_{DA} -Häufigkeitshistogramm dargestellt. Ab einer Zeitfenstergröße von 1 ms (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt) beginnt die nach der "burstweisen" Analyse noch breite Abstandsverteilung, in der sich beide Zustände des Syntaxins nur erahnen lassen, sich in zwei diskrete Verteilungen zu reorganisieren. Bei einer Intervallgröße von 0.5 ms sind schließlich deutlich zwei Subpopulationen zu erkennen, die der geschlossenen und der offenen Form des Syntaxins zugeordnet werden können.

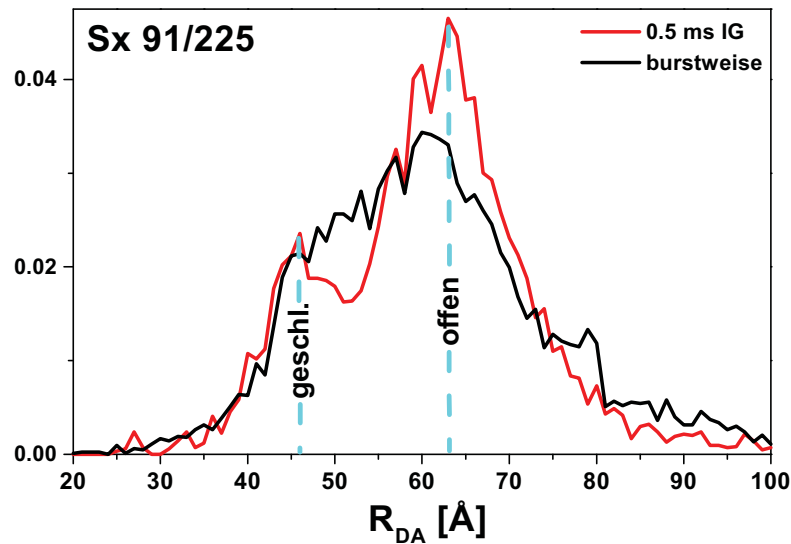


Abb. 6.10: Zeitfensteranalyse der Messung des Sx 91/225-Konstrukts (freies Syntaxin-1; Vgl. Abb. 6.10 E). Die Zeitintervallgröße IG beträgt für die gezeigte Analyse 0.5 ms. Zum Vergleich ist zusätzlich die Abstandsverteilung nach "burstweiser" Analyse dargestellt. Bei der Zeitfensteranalyse wurden nur solche Intervalle berücksichtigt, die mehr als 50 Photonen beinhalten. Die Verteilungen sind auf die Fläche normiert.

Dieses Resultat, das durch die Zeitfensteranalysen der Mutanten Sx 105/225 und Sx 59/207 bestätigt wird, beweist, daß das freie Syntaxin in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation hin und her wechselt. Weiterhin läßt sich aus dem Ergebnis dieser Zeifensteranalyse ableiten, daß sich die Dynamik des Gleichgewichts im Millisekunden-Bereich bewegt.

Eine weitere Folge der Zeitfensteranalyse ist die Verschiebung der mittleren Abstände der beiden Konformationen des Syntaxins (Abb. 6.10). Dabei bewegt sich der mittlere Abstand der geschlossenen Konformation bei kleiner werdenden Zeitintervallgrößen zu kürzeren Abständen, während sich der mittlere Abstand der offenen Konformation zu längeren Distanzen verschiebt. Dieser Effekt tritt solange auf, bis die Intervallgrößen schließlich so klein ist, daß die Mittelung der Zustände vollständig unterdrückt wird und daher die „wahren“ Abstände der Zustände gemessen werden. Dazu muß die Intervallgröße um einiges kleiner sein als die Dynamik des Moleküls. Aus statistischen Gründen war die Zeitfensteranalyse mit kleineren Intervallgrößen als 0.5 ms bei den Messungen dieser Studie nicht möglich. In Folge dessen wurde dieser Grenzfall nicht erreicht. Dennoch wurden für die spätere Berechnung des Strukturmodells für alle Konstrukte mit einer breiten Abstandsverteilung die Distanzen verwendet, die sich aus der Zeitfensteranalyse mit der kleinstmöglichen Intervallgröße ergeben.

6.6.2 Gleitende Zeitfensteranalyse

Für einzelne, besonders lange Einzelmolekülereignisse wurde eine gleitende Zeitfensteranalyse durchgeführt. Abb. 6.12 zeigt eine daraus resultierende 9 ms lange Parameterspur für ein Sx 91/225-Molekül. Deutlich ist das antikorrelierte Verhalten des Signals im grünen (Donor), S_G , und im roten (Akzeptor), S_R , Spektralbereich zu beobachten, das auf Abstandsfluktuationen zurückzuführen ist. Aus den Parametern S_G und S_R kann die R_{DA} -Spur berechnet werden, anhand derer der Wechsel zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation des freien Syntaxins direkt verfolgt werden kann.

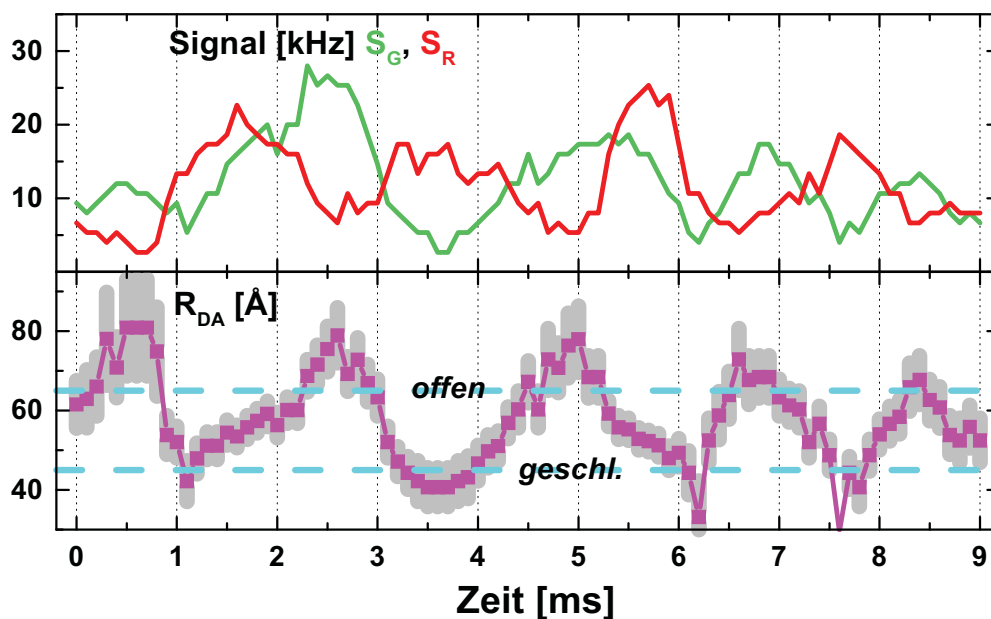


Abb. 6.12: Parameterspur eines Einzelmolekülereignisses von freiem Sx 91/225 mit einer Diffusionszeit durch des Beobachtungsvolumen von 9 ms. Die Intervallgröße IG ist hier 1.0 ms und die Schrittweite s beträgt 0.1 ms. Die Trajektorien des Signals im grünen (Donor), S_G , und im roten (Akzeptor), S_R , Spektralbereich sind antikorreliert. Die nach Glg. 3.31 aus S_G und S_R berechnete Abstands- (R_{DA})-Spur zeigt den mehrfachen Wechsel des Syntaxins zwischen der offenen und geschlossenen Konformation an. Zur Orientierung sind die Abstände für den offenen und den geschlossenen Zustand als cyanfarbene, gestrichelte Linien eingezeichnet (vgl. Abb. 6.10) (Fehlerbalken in grau, berechnet nach Gl. 3.31). (Parameter für die Berechnung von R_{DA} : $R_{of} = 59.1 \text{ \AA}$ und $\Phi_{FA} = 0.7$)

6.6.3 Die Fluoreszenz-Korrelations-Analyse

Für eine quantitative Analyse der Dynamik wurde eine speziesselbektive Korrelationsanalyse der Mutante Sx 91/225, die eine breite Abstandsverteilung der Einzelmolekül-FRET-Messung aufgewiesen hatte, durchgeführt. Da die breite Abstandsverteilung, wie bereits dargestellt, durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen

Konformation verursacht wird, sollte sich die Dynamik in den Korrelationsfunktionen ($G(t_C)_{DD}$, $G(t_C)_{AA}$ und $G(t_C)_{KK}$) widerspiegeln (vgl. Kap. 3.5.3). Als Referenz wurde das Sx 59/105-Konstrukt verwendet. Bei dieser Mutante befinden sich beide Markierungspositionen innerhalb der Habc-Domäne, so daß ein Wechsel in der Konformation hier keine Veränderung im Abstand zur Folge hat.

Für die Berechnung der Korrelationsfunktionen $G(t_C)_{DD}$, $G(t_C)_{AA}$ und $G(t_C)_{KK}$ wurden aus den Einzelmolekül-FRET-Messungen die Daten selektiert, die durch Ereignisse FRET-aktiver Moleküle generiert wurden (vgl. Kap.3.3.5). Dieses Verfahren ist notwendig, da die Proben aufgrund der besonderen Markierungsprozedur bei dieser Studie sehr heterogen sind und die durch FRET-Fluktuationen erzeugten Effekte bei einer Korrelationsanalyse der gesamten Daten nicht mehr erkennbar wären.

Die auf diese Weise erzeugten Korrelationsfunktionen sind in Abb. 6.12 dargestellt. Bei dem Konstrukt Sx 91/225 zeigt sich ein deutlicher Unterschied in den Korrelationsfunktionen im Bereich der Diffusion (≈ 1 ms). Und zwar klingt die Kreuzkorrelationsfunktion $G(t_C)_{KK}$ deutlich später ab als die beiden Autokorrelationsfunktionen für den Donor, $G(t_C)_{DD}$, und den Akzeptor, $G(t_C)_{AA}$. Diese Differenz wird durch die FRET-Fluktuationen hervorgerufen, die ihrerseits durch die Konformationsdynamik des Syntaxins verursacht werden. Bei der Kreuzkorrelation führen diese Fluktuationen zu einer Antikorrelation, die die Diffusionszeit scheinbar verlängert, während die Fluktuationen bei den Autokorrelationsfunktionen $G(t_C)_{DD}$ und $G(t_C)_{AA}$ ein schnelleres Abklingen zur Folge haben (vgl. Kap. 3.5.3). Für die Konstrukte Sx 105/225 und Sx 59/207, bei denen sich die geschlossene und die offene Konformation des Syntaxins ebenfalls anhand der Abstände zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor unterscheiden lassen, wird analog zur obigen Beschreibung eine Antikorrelation beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu klingen die Korrelationsfunktionen bei dem Kontrollkonstrukt Sx 59/105 annähernd gleichzeitig ab (Abb. 6.12 B). Der Unterschied in den Korrelationsfunktionen $G(t_C)_{DD}$ und $G(t_C)_{AA}$ ist auf unterschiedlich große Detektionsvolumina der beiden Spektralbereiche zurückzuführen.

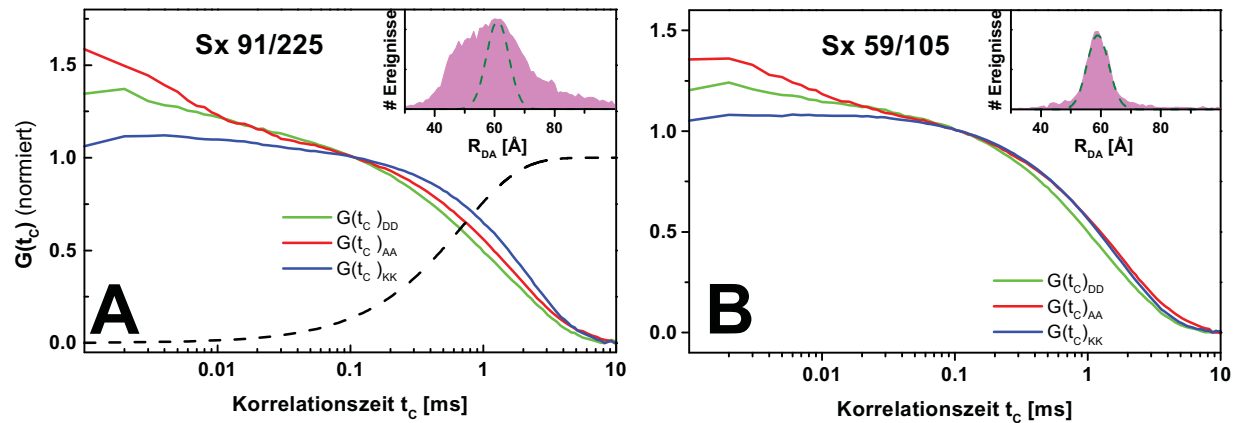


Abb. 6.13: Normierte Autokorrelationskurven für den Donor ($G(t_c)_{DD}$) und den Akzeptor ($G(t_c)_{AA}$) sowie die normierte Kreuzkorrelationskurve ($G(t_c)_{KK}$) für das A) Sx 91/225-Konstrukt und B) Sx 59/105-Konstrukt. Die R_{DA} -Histogramme (jeweils als Einsatz oben rechts) zeigen jeweils die Abstandsverteilungen der Einzelmolekül-FRET-Messungen. Die gestrichelte schwarze Linie repräsentiert die Antikorrelation, die bei der Kreuzkorrelationsfunktion des Sx 91/225-Konstrukts auftritt (Die zur Berechnung notwendigen Werte t_{FRET} und A_{FRET} sind der Tabelle 6.2 zu entnehmen.). Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bereits diese qualitative Betrachtung der Korrelationsfunktionen zeigt, daß sich die Dynamik des Gleichgewichts zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation im Bereich der Diffusionszeit des Syntaxins durch das Beobachtungsvolumen bewegt. Nach dem Verfahren, das im Detail in Kap. 3.5.3 (vgl. auch Kap. 5.7.2) vorgestellt wurde, läßt sich die Relaxationszeit der FRET-Dynamik t_{FRET} aus einer globalen Anpassung der Gl. 3.35 an die Kreuzkorrelationsfunktionen $G(t_c)_{KK}$ des Konstrukts Sx 91/225 und der Referenz Sx 59/105 bestimmen. Prinzipiell wird dabei die Diffusionszeit aus der Kreuzkorrelation der Referenz bestimmt, so daß sich die Relaxationszeit t_{FRET} sowie die entsprechende Amplitude A_{FRET} aus der Kreuzkorrelation des Konstrukts Sx 91/225 extrahieren läßt. Die auf diese Weisen aus den Kreuzkorrelationsfunktionen ermittelten Parameter sind in Tabelle 6.2 zusammengefaßt.

Tabelle 6.2: Ergebnisse der Korrelationsanalyse

	N	z_0/ω_0	t_d [ms]	T_{eq}	t_T [μ s]	A_{FRET}	t_{FRET} [ms]
Sx 91/225	0.8 ± 0.1	$8.0^{2)}$	$1.62 \pm 0.01^{1)}$	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	-0.21 ± 0.01	0.59 ± 0.04
Sx 59/105	0.6 ± 0.1	$8.0^{2)}$	$1.62 \pm 0.01^{1)}$	$0.0^{2)}$	$0.0^{2)}$		

¹⁾ Diese Parameter wurden global angepaßt. ²⁾ diese Parameter wurden festgehalten

N ist die Anzahl der Fluorophore, die sich in einem der Singletzustände befinden; z_0 und ω_0 entsprechen den $1/e$ -Radien in axialer und radialer Richtung; t_d ist die Diffusionszeit; T_{eq} die relative Besetzungswahrscheinlichkeit des Tripletzustandes; t_T die charakteristische Tripletzerfallszeit. A_{FRET} ist die Amplitude für die FRET-Dynamik, t_{FRET} die entsprechende Relaxationszeit. .

Aus der Anpassung ergibt sich für das dynamische Gleichgewicht zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation beim freien Syntaxin-1 eine Relaxationszeit von $t_{FRET} = 0.59 \pm 0.04$ ms mit einer Amplitude von $A_{FRET} = -0.21 \pm 0.01$. Mit Hilfe dieser Werte läßt sich die Funktion der Antikorrelation berechnen, die in Abb. 6.13 A als schwarze, gestrichelte Linie eingezeichnet ist.

Schließlich bleibt festzuhalten, daß der quantitativ bestimmte Wert aus der Korrelationsanalyse in guter Übereinstimmung mit dem Wert ist, der aus der Zeitfensteranalyse für die Dynamik des freien Syntaxins abgeschätzt wurde.

6.7 Das Strukturmodell

Sämtliche im Rahmen der Syntaxin-Studie gemessene Abstände, die Halbwertesbreiten, w , der entsprechenden Gaußanpassungen sowie die nach Gl. 3.31 bestimmten Standardabweichungen, $\sigma_{R_{DA}}$, sind in Tabelle 6.3 zusammengefaßt.

Mit Hilfe dieser Daten wurde im Rahmen einer Molecular-Modelling-Studie (durchgeführt von Gunnar Schröder, MPIBPC, Göttingen) ein kompletter Satz von Strukturen für Syntaxin in der offenen bzw. in der geschlossenen Konformation berechnet. Diese Strukturen werden beschrieben durch die Positionen von sieben C_α -Atomen (der Aminosäuren 59, 91, 105, 167, 197, 207 und 225), an die die Fluorophore gebunden sind. Die Positionen 193 sowie 151 wurden aufgrund fehlender Bezugspunkte bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Bei der Simulation wurde die Flexibilität der Linker zwischen Protein und Fluorophor in Betracht gezogen. Weiterhin wurde neben den mittleren Abständen R_{DA} für die Konformationen auch die Form und Breite der Verteilungen der Abstände bei der Berechnung berücksichtigt.

Tabelle 6.3: Im Rahmen der Studie aus Einzelmolekül-FRET-Messungen bestimmte Abstände.

Molekül	Freies Syntaxin			Syntaxin/Munc18			Syntaxin im ternären		
	R _{DA} [Å]	w [Å]	σ(R _{DA})	R _{DA}	w [Å]	σ(R _{DA})	R _{DA}	w [Å]	σ(R _D)
Sx 59/91	52.2	±3.5	3.8						
Sx 59/105	58.9	±3.9	3.3						
Sx 59/167	46.0	±3.8	4.1						
Sx 59/197	55.5	±7.1	3.9				62.3	±5.0	3.5
Sx 59/207 ¹⁾	58.8	±6.7	3.3				62.5	±9.0	4.6
	46.2	±3.5	3.6	49.8	±3.3	2.5			
Sx 59/225 ¹⁾	60.8	±6.8	5.4				72.0	±10.0	5.4
	50.5	±3.5	3.4						
Sx 91/167	55.7	±4.3	3.2						
Sx 91/193	57.8	±4.5	4.6				66.3	±6.0	6.3
Sx 91/197	61.5	±5.5	4.1	52.5	±3.8	3.9	71.7	±7.5	5.5
Sx 91/207	65.6	±6.0	4.4				72.4	±7.5	6.2
Sx 91/225 ¹⁾	62.6	±7.7	4.0				73.0	±8.5	6.5
	44.8	±3.6	3.9	45.6	±4.5	3.5			
Sx 105/197	69.1	±6.3	4.5	69.7	±6.5	6.3	76.7	±9.8	8.2
Sx 105/207	63.1	±7.4	5.4	55.9	±4.0	4.0	72.5	±13.6	7.2
Sx 105/225¹⁾	65.2	±8.8	4.2				74.0	±10.0	7.0
	45.8	±4.5	4.0	49.5	±4.5	3.4			
Sx 151/225	62.7	±8.9	5.3				74.4	±13.1	9.0
Sx 167/197	50.2	±4.9	3.5						

w: Halbwertsbreite der Gaußanpassung für die Abstandsverteilung der Einzelmolekül-FRET-Messungen

¹⁾ aufgrund der sehr breiten Abstandsverteilung mußten zwei Gaußfunktionen angepaßt werde. Ferner wurden die Abstände aus den entsprechenden Zeitfensteranalysen (IG: 0.5ms) bestimmt.

Aus der Simulation ergeben sich eine Reihe von Strukturen, die die Randbedingungen, die durch die gemessenen Abstände bzw. Abstandsverteilungen vorgegeben werden, erfüllen. Abb. 6.14 zeigt Modelle jeweils der Struktur entsprechend, die am wenigsten abweicht von der durch Röntgenstrukturanalyse bestimmten Struktur der geschlossenen Konformation im Munc-18-Komplex.

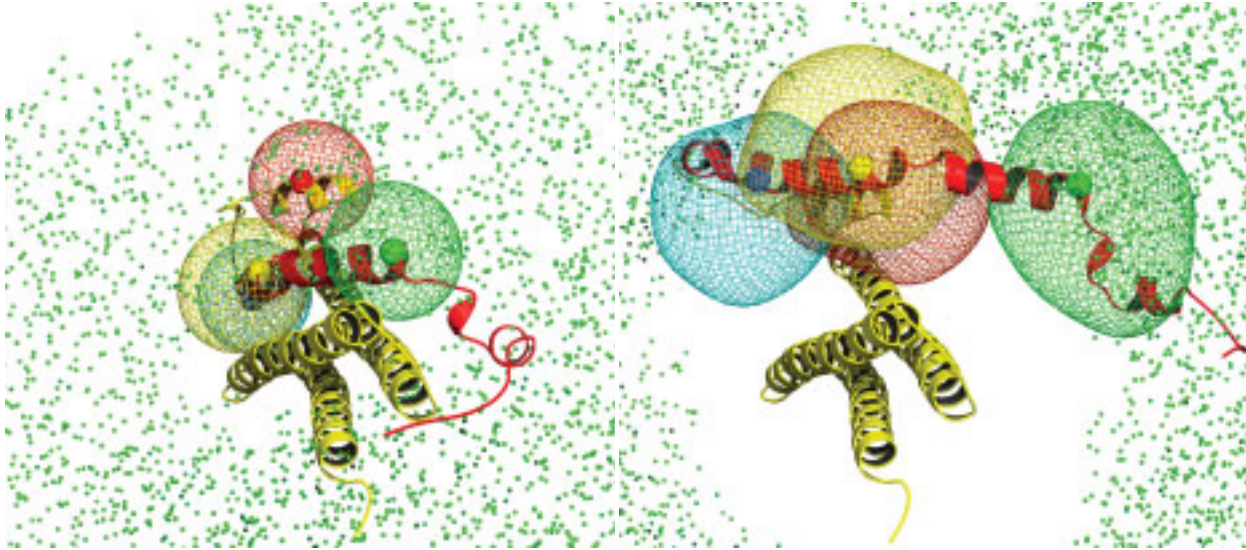


Abb. 6.14: Strukturen der geschlossenen (links) und offenen (rechts) Konformation des Syntaxins. Die Strukturen wurden anhand der Daten aus Tabelle 6.3 im Rahmen einer Molecular-Modelling-Studie berechnet. Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit dargestellten Strukturen von Syntaxin-1a sind die Farben der H3-Domäne (hier rot) und der Habc-Domäne (hier gelb) vertauscht. Die farbigen Kugeln repräsentieren jeweils die C α -Positionen der Aminosäuren 167 (rot); 197 (blau) und 225 (grün). Die Wolke aus grünen Punkten zeigt den kompletten Satz der C α -225-Positionen, die kompatibel zu den gemessenen Abständen sind. Dabei sind die möglichen C α -Positionen über einen weiten Bereich gestreut, weil zum einen aus den FRET-Messungen nur der Abstand zwischen den Fluorophoren hervorgeht, aber die Messungen keinerlei Informationen über die Orientierung des Linkers liefert. Zum Anderen liegt die Ungenauigkeit in der langgestreckten Form des Syntaxins begründet. Diese Form bedingt, daß alle Markierungspositionen sich relativ nahe an der Achse der Habc-Domäne und somit fast in einer Linie befinden.

Diese Analyse der gemessenen Daten liefert nur ein sehr grobes Bild der beiden Konformere, das auf keinen Fall mit der Auflösung von NMR- und Röntgenstrukturaufnahmen verglichen werden darf. Dennoch kann diese Studie zeigen, daß bei der offenen Konformation (rechts) die H3-Domäne nicht auf die Habc-Domäne zurückgefaltet ist und somit mit Synaptobrevin und SNAP-25 interagieren kann. Damit könnten Proteine wie Munc-18 die „Reaktivität“ des Syntaxins regulieren, indem solche Proteine das Syntaxin in der geschlossenen Konformation arretieren.

6.8 Fazit

Im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichten NMR-Studie konnte die hier vorgestellte Einzelmolekül-FRET-Studie zeigen, daß das freie Syntaxin neben der geschlossenen auch in einer offenen Konformation vorliegt, in der kein Kontakt zwischen der H3- und der Habc-Domäne existiert. Dabei ergaben die Messungen, daß die offene Konformation zu 70-85% und die geschlossene entsprechend zu 15-30% bevölkert wird.

Im Rahmen einer Zeitfensteranalyse der Einzelmolekül-daten konnte gezeigt werden, daß zwischen beiden Formen ein dynamisches Gleichgewicht besteht. Eine weitergehende kinetische Analyse mit Hilfe der speziesselktiven-FCS ergab, daß konformationelle Fluktuationen auf einer Zeitskala von 0.5 ms stattfinden.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern eine Grundlage zum Verständnis der Regulationsmechanismen bei der Bildung des SNARE-Komplexes in den Nervenendigungen: Offenbar liegt das freie Syntaxin überwiegend in der „reaktiven“, offenen Konformation vor. Um eine unkontrollierte Bildung des SNARE-Komplexes und damit eine nicht regulierte Neurotransmitterausschüttung zu verhindern, sind Proteine wie etwa Munc-18 nötig, die Syntaxin im geschlossenen Zustand arretieren.

Schließlich konnte aus den gemessenen Abständen von 16 verschiedenen Syntaxin-Konstrukten im Rahmen einer Molecular-Modelling-Studie jeweils ein Strukturvorschlag für die offene und die geschlossene Konformation ausgearbeitet werden.

Somit beweist diese Studie, daß mit Hilfe von FRET-Messungen auf Einzelmolekülbasis sowohl Strukturuntersuchungen als auch kinetische Studien eines dynamischen Gleichgewichts an relativ komplexen Biomolekülen wie dem Syntaxin möglich sind. Damit ist diese Technik auf eine Reihe weiterer Fragestellungen bzgl. Konformationsdynamiken von Proteinen anwendbar.

7 Literaturverzeichnis

Altona, C., "Classification of nucleic acid junctions." 1996, *J.Mol.Biol.*, 263, 568-581.

Bevington, P.R., 1969, in *Data reduction and error analysis for the physical sciences*, MacGraw-Hill, New York.

Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., und Brose, N., "Direct interaction of the rat munc-13 homologue Munc13-1 with the N-terminus of syntaxin." 1997, *J.Biol.Chem.*, 272, 2520-2526.

Birks, J.B., 1975, "The photophysics of aromatic excimers." in *International Exciplex Conference*, (Gordon, M. und Ware, W.R., Eds.) 39-73, Academic Press, London.

Brand, L., "Zeitaufgelöster Nachweis einzelner Moleküle in Lösung" 1998, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Brunger, A.T., "Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle-membrane fusion." 2001, *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 11, 163-173.

Carruthers, W., 1987, in *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, Cambridge University Press, Cambridge.

Clegg, R.M., "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids." 1992, *Methods Enzymol.*, 211, 353-388.

Clegg, R.M., Murchie, A.I.H., Zechel, A., und Lilley, D.M., "Observing the helical geometry of double-strand DNA in solution by fluorescence energy transfer." 1993, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90, 2294-2298.

Dale, R.E. und Eisinger, J., "Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor." 1974, *Biopolymers*, 13, 1573-1605.

Dale, R.E. und Eisinger, J., 1975, "Polarized Excitation Energy Transfer." in *Biochemical Fluorescence: Concepts Vol. 1*, (Chen, R.F. und Edelhoch, H., Eds.) 115-284, Marcel Dekker, Inc., New York.

Duckett,D.R. und Lilley,D.M., "The tree-way DNA junction is a Y-shaped molecule which there is no helix-helix stacking." 1990, *EMBO J.*, 9, 1659-1664.

Duckett,D.R., Murchie,A.I.H., Diekmann,S., von Kitzing,E., Kemper,B., und Lilley,D.M., "The structure of the Holliday junction and its resolution." 1988, *Cell*, 55, 79-89.

Dulubova,I., Sugita,S., Hill,S., Hosaka,M., Fernandez,I., Südhof,T.C., und Rizo,J., "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." 1999, *EMBO J.*, 18(16), 4372-4382.

Eggeling,C., Berger,S., Brand,L., Fries,J.R., Schaffer,J., Volkmer,A., und Seidel,C.A.M., "Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection." 2001, *J.Biotechnol.*, 86(3), 163-180.

Eggeling,C., "Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie" 1999, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Eggeling,C., Fries,J.R., Brand,L., Günther,R., und Seidel,C.A.M., "Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy." 1998, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 1556-1561.

Eichman,B.F., Vargason,J.M., Mooers,B.M., und Ho,P.S., "The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: Sequence effects on the structure of four-way junctions." 2000, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97(8), 3971-3976.

Enderlein,J., Robbins,D.L., Ambrose,W.P., Goodwin,P.M., und Keller,R.A., "The statistics of single molecule detection: an overview." 1997, *Bioimaging*, 5, 88-98.

Epe,B., Steinhauser,K.G., und Woolley,P., "Theory of measurement of Forster-type energy transfer in macromolecules." 1983, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80(9), 2579-2583.

Enderlein,J. und Sauer,M., "Optimal Algorithm for Single-Molecule Identification with Time-Correlated Single-Photon Counting." 2001, *J.Phys.Chem.A*, 105, 48-53.

Fasshauer,D., Antonin,W., Margittai,M., Pabst,S., und Jahn,R., "Mixed and non-cognate SNARE complexes - Characterization of assembly and biophysical properties." 1999, *J.Biol.Chem.*, 274(22), 15440-15446.

Fernandez,I., Ubach,J., Dulubova,I., Zhang,X.Y., Südhof,T.C., und Rizo,J., "Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N- terminal domain of syntaxin 1A." 1998, *Cell*, 94(6), 841-849.

Förster,T., "Zwischenmolekular Energiewanderung und Fluoreszenz." 1948, *Ann.Phys.*, 2, 55-75.

Fries,J.R., Brand,L., Eggeling,C., Köllner,M. und Seidel,C.A.M., "Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy." 1998, *J.Phys.Chem.A*, 102, 6601-6613.

Gaiko,N., Hillisch,A., Berger,S., Seidel,C.A.M., Diekmann,S., und Griesinger,C., "Location of rhodamine dyes on DNA helix ends used for fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments." 2002, *in preparation*.

Goodwin,P.M., Ambrose,W.P., und Keller,R.A., "Single-molecule detection in liquids by laser-induced fluorescence (Review)." 1996, *Acc.Chem.Res.*, 29(12), 607-613.

Ha,T., Enderle,T., Chemla,D.S., und Weiss,S., "Dual-molecule spectroscopy - molecular rulers for the study of biological macromolecules." 1996a, *IEEE J.Selected Topics Quantum Electron.*, 2(4), 1115-1128.

Ha,T., Enderle,T., Ogletree,D.F., Chemla,D.S., Selvin,P.R., und Weiss,S., "Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor." 1996b, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93, 6264-6268.

Ha,T., Laurence,T.A., Chemla,D.S., und Weiss,S., "Polarization Spectroscopy of Single Fluorescent Molecules." 1999a, *J.Phys.Chem.B*, 103(33), 6839-6850.

Ha,T., Ting,A.Y., Liang,J., Caldwell,W.B., Deniz,A.A., Chemla,D.S., Schultz,P.G., und Weiss,S., "Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism." 1999b, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96(3), 893-898.

Haas,E., Katchalski-Katzir,E., und Steinberg,I.Z., "Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization." 1978, *Biochemistry*, 17(23), 5064-5070.

-
- Hata, Y., Slaughter, C.A., und Südhof, T.C., "Synaptic vesicle fusion complex contains munc-18 homologue bound to syntaxin." 1993, *Nature*, 366, 347-351.
- Higuchi, M., Wong, C., Kochhan, L., Olek, K., Aronis, S., Kasper, C.K., Kazazian, H.H., Jr., und Antonarakis, S.E., "Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA." 1990, *Genomics*, 6(1), 65-71.
- Hirschfeld, T., "Quantum efficiency independence of the time integrated emission from a fluorescent molecule." 1976, *Appl. Opt.*, 15(12), 3135-3139.
- Holliday, R., "A new mechanism of gene conversion in fungi." 1964, *Genet. Res.*, 5, 282-304.
- Hughson, F.M., "Membrane fusion: structure snared at last." 1999, *Curr. Biol.*, 9, R49-R52.
- Jahn, R. und Südhof, T.C., "Membrane fusion an exocytosis." 1999, *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 863-911.
- Jares-Erijman, E.A. und Jovin, T.M., "Determination of DNA Helical Handedness by Fluorescence Resonance Energy Transfer." 1996, *J. Mol. Biol.*, 257, 597-617.
- Kee, Y., Lin, R.C., Hsu, S.C., und Scheller, R.H., "Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesicle fusion complex formation and dissociation." 1995, *Neuron*, 14, 991-998.
- Khimenko, V., Chibisov, A.K., und Gorner, H., "Effects of alkyl substituents in the polymethine chain on the photoprocesses in thiocarbocyanine dyes." 1997, *J. Phys. Chem.*, 101(39), 7304-7310.
- Köllner, M., "How to find the sensitivity limit for DNA sequencing based on laser-induced fluorescence." 1993, *Appl. Opt.*, 32(6), 806-820.
- Koshioka, M., Sasaki, K., und Masuhara, H., "Time-Dependent Fluorescence Depolarization Analysis in Three Dimensional Microscopy." 1995, *Appl. Spectrosc.*, 49(2), 224-228.
- Kuhn, H., 1949, *J. Chem. Phys.*, 17, 1198.
- Lakowicz, J.R., Gryczynski, I., Laczko, G., und Gloyna, D., "Picosecond Fluorescence Lifetime Standards for Frequency- and Time-Domain Fluorescence." 1991, *J. Fluoresc.*, 1(2), 87-93.

Lakowicz, J.R., 1999, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Lerman, J.C., Robblee, J., Fairman, R., und Hughson, F.M., "Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A." 2000, *Biochemistry*, 39(29), 8470-8479.

Mao, C., Sun, W., und Seeman, N.C., "Designed two-dimensional DNA holliday junction arrays visualized by atomic force microscopy." 1999, *J.Am.Chem.Soc.*, 121, 5437-5443.

Margittai, M., Fasshauer, D., Pabst, S., Jahn, R., und Langen, R., "Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site-directed spin labeling." 2001, *J.Biol.Chem.*, 276(16), 13169-13177.

Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schröder, G., Fasshauer, D., Felekyan, S., Hausteiner, E., König, M., Grubmüller, H., Jahn, R., und Seidel, C.A.M., "Single molecule FRET dynamics reveals an equilibrium between a closed and an open conformation of Syntaxin-1." 2002, *in preparation*.

Misura, K.M.S., Scheller, R.H., und Weis, W.I., "Three-dimensional structure of the neuronal Sec1-syntaxin 1a complex." 2000, *Nature*, 404(6776), 355-362.

Moerner, W.E., "Examining nanoenvironments in solids on the scale of a single, isolated impurity molecule." 1994, *Science*, 265(5168), 46-53.

Moerner, W.E. und Kador, L., "Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid." 1989, *Phys.Rev.Lett.*, 62(21), 2535-2538.

Moerner, W.E. und Orrit, M., "Illuminating Single Molecules in Condensed Matter [Review]." 1999, *Science*, 283(5408), 1670-1676.

Munson, M., Chen, X., Cocina, A.E., Schultz, S.M., und Hughson, F.M., "Interactions within the yeast t-SNARE Sso1p that control SNARE complex assembly." 2000, *Nat.Struct.Biol.*, 7, 894-902.

Murchie, A.I.H., Clegg, R.M., von Kitzing, E., Duckett, D.R., Diekmann, S., und Lilley, D.M.J., "Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules." 1989, *Nature*, 341, 763-766.

Nicholson,K.L., Munson,M., Miller,R.B., Filip,R.J., Fairman,R., und Hughson,F.M., "Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p." 1998, *Nat.Struct.Biol.*, 5, 793-802.

Orrit,M. und Bernard,J., "Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a p-Terphenyl Crystal." 1990, *Phys.Rev.Lett.*, 65(21), 2716-2719.

Ortiz-Lombardia,M., Gonzalez,A., Eritja,R., Aymami,J., Azorin,F., und Coll,M., "Crystal structure of a DNA holliday junction." 1999, *Nat.Struct.Biol.*, 6, 913-917.

Overmars,F.J.J. und Altona,C., "NMR study of the exchange rate between two stacked conformers of a model Holliday junction." 1997, *J.Mol.Biol.*, 273, 519-524.

Panyutin,I.G. und Hsieh,P., "Formation of a single base mismatch impedes spontaneous DNA branch migration." 1993, *J.Mol.Biol.*, 230, 413-424.

Pawley,J.B., 1995, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, (Pawley,J.B., Ed.) , Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Rothman,J.E., "Mechanisms of intracellular protein transport." 1994, *Nature*, 372, 55-63.

Rothwell,P.J., Berger,S., Kensch,O., Felekyan,S., Antonik,M., Wohrl,B.M., Restle,T., Goody,R.S., und Seidel,C.A.M., "Multi-Parameter Single-molecule Fluorescence Spectroscopy reveals Heterogeneity of HIV-1 Reverse Transcriptase:primer/template Complexes." 2001, *in preparation*.

Schäfer,F.P., 1973, in *Dye lasers*, (Schäfer,F.P., Ed.) , Springer-Verlag, Heidelberg.

Schaffer,J., "Charakterisierung von Einzelmolekülen durch selektive Fluoreszenzspektroskopie" 2000, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Schaffer,J., Volkmer,A., Eggeling,C., Subramaniam,V., Striker,G., und Seidel,C.A.M., "Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence spectroscopy." 1999, *J.Phys.Chem.A*, 103(3), 331-336.

Selvin,P.R., "Fluorescence Resonance Energy Transfer." 1995, *Methods Enzymol.*, 246, 301-335.

Sinha,N.D., Biernat,J., McManus,J., und Köster,H., "Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholinophosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product." 1984, *Nucleic Acids Res.*, 12(11), 4539-4557.

Steinberg,I.Z., "Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides." 1971, *Annual Review of Biochemistry*, 40, 83-114.

Stryer,L. und Haugland,R.P., "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler." 1967, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 58, 719-726.

Sutton,R.B., Fasshauer,D., Jahn,R., und Brunger,A.T., "Crystal structure of a snare complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Angstrom resolution." 1998, *Nature*, 395(6700), 347-353.

Torbet,J., "Solution behaviour of DNA studied with magnetically induced birefringence." 1992, *Methods Enzymol.*, 211, 518-532.

van der Meer,B.W., Cooker,G., und Chen,S.Y., 1994, in *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, VCH Publishers, New York.

von Frese,C.M., "Molekulare Aspekte der intermolekularen Fluoreszenzlöschung von Nukleobasen" 1997, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

von Kitzing,E., Lilley,D.M.J., und Diekmann,S., "The stereochemistry of a four-way DNA junction: a theoretical study." 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 2671-2683.

Wahl,Ph., "Analysis of fluorescence anisotropy by a least square method." 1979, *Biophys.Chem.*, 10, 91-104.

Watson,J.D. und Crick,F.H.C., "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." 1953, *Nature*, 171, 737.

Weiss,S., "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules." 1999, *Science*, 283(5408), 1676-1683.

Welch,J.B., Duckett,D.R., und Lilley,D.M.J., "Structures of bulged three-way DNA junctions." 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 4548-4555.

Widengren,J., Schweinberger,E., Berger,S., und Seidel,C.A.M., "Two new concepts to measure fluorescence resonance energy transfer via fluorescence correlation spectroscopy: Theory and experimental realizations." 2001, *J.Phys.Chem.A*, 105(28), 6851-6866.

Xie,X.S. und Trautman,J.K., "Optical studies of single molecules at room temperature." 1998, *Annu.Rev.Phys.Chem.*, 49, 441-480.

Ying,L.M., Wallace,M.I., und Klenerman,D., "Two-state model of conformational fluctuation in a DNA hairpin-loop." 2001, *Chem.Phys.Lett.*, 334(1-3), 145-150.

Anhang

Die im folgenden dargestellten Berechnungen sollen die beiden Verfahren zur Korrektur der Fluoreszenzlebensdauern, die in den Kap. 3.6.1 und 3.6.2 theoretisch vorgestellt wurden, jeweils an einem praktischen Beispiel veranschaulichen.

A1 Die Korrektur der Fluoreszenzlebensdauer für den Fall einer irreversiblen dynamischen Löschung am Beispiel der Λ -Species des D-13-Konstrukts (Vgl. Kap. 4)

Schritt 1) Meßwerte: Zunächst werden die Fluoreszenzlebensdauern (τ_{D1} und τ_{D2}) und die entsprechenden fluoreszenz- sowie speziesgewichteten Amplituden (A_{D1} , A_{D2} , X_{D1} und X_{D2}) der beiden Subzustände mit Hilfe einer biexponentiellen Anpassung an die Fluoreszenzabklingkurve des Λ -Zustands im D-13-Molekül (nur mit dem Donorfluorophor markiert) bestimmt:

Tabelle A1: Meßwerte D-13-Konstrukt (Λ -Zustand)

τ_{D1} [s]	X_{D1}	A_{D1}	τ_{D2} [s]	X_{D2}	A_{D2}
1.8×10^{-9}	0.21	0.11	3.8×10^{-9}	0.79	0.89

Vgl. Tabelle 4.1

Schritt 2) Berechnung der Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$: Zu diesem Zweck wird willkürlich ein k_{FRET} angenommen, z.B. $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Nach den Gleichungen 3.36 A bzw. B ergibt sich daraus:

$$\tau_{D(A)1} = 1.74 \times 10^{-9} \text{ s} \quad \text{und} \quad \tau_{D(A)2} = 3.53 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Schritt 3) Berechnung der entsprechenden fluoreszenzgewichteten Amplituden $A_{D(A)1}$ und $A_{D(A)2}$: Dazu werden die speziesgewichteten Amplituden X_{D1} und X_{D2} aus Tabelle A1 und die in Schritt 2) berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$ benutzt. Nach den Gleichungen 3.37 A und B ergibt sich dann:

$$A_{D(A)1} = 0.12 \quad \text{und} \quad A_{D(A)2} = 0.88$$

Schritt 4) Berechnung der gemittelten, fluoreszenzgewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A),av}^A$: Diese wird aus den in Schritt 2) berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$ sowie den in Schritt 3) berechneten Amplituden $A_{D(A)1}$ und $A_{D(A)2}$ nach Gl. 3.38 bestimmt:

$$\tau_{D(A),av}^A = 3.32 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Schritt 5) Berechnung der gemittelten, speziesgewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A),av}^X$: Diese wird aus den in Schritt 2) berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$ sowie den speziesgewichteten Amplituden X_{D1} und X_{D2} aus Tabelle A1 nach Gl. 3.39 bestimmt:

$$\tau_{D(A),av}^X = 3.15 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Schritt 6) Rücksprung zu Schritt 2): Diese Prozedur wird jetzt für den nächsten Wert von k_{FRET} wiederholt (z.B. $2.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$)

Das Verfahren wird auf eine ganze Reihe verschiedener k_{FRET} angewendet. Die Werte können in einer Tabelle dargestellt werden:

Tabelle A2: Aus den Schritten zwei bis fünf berechnete Daten für verschieden k_{FRET} .

k_{FRET}	$\tau_{\text{D(A)1}}$	$\tau_{\text{D(A)2}}$	$A_{\text{D(A)1}}$	$A_{\text{D(A)2}}$	$\tau_{\text{D(A),av}}^A$	$\tau_{\text{D(A),av}}^X$
$[\text{s}^{-1}]$	[s]	[s]			[s]	[s]
1.0×10^6	1.80×10^{-9}	3.79×10^{-9}	0.11	0.89	3.56×10^{-9}	3.37×10^{-9}
5.0×10^6	1.78×10^{-9}	3.73×10^{-9}	0.11	0.89	3.51×10^{-9}	3.32×10^{-9}
1.0×10^7	1.77×10^{-9}	3.66×10^{-9}	0.11	0.89	3.45×10^{-9}	3.26×10^{-9}
1.5×10^7	1.75×10^{-9}	3.60×10^{-9}	0.11	0.89	3.38×10^{-9}	3.21×10^{-9}
2.0×10^7	1.74×10^{-9}	3.53×10^{-9}	0.12	0.88	3.32×10^{-9}	3.15×10^{-9}
2.5×10^7	1.72×10^{-9}	3.47×10^{-9}	0.12	0.88	3.27×10^{-9}	3.10×10^{-9}
3.0×10^7	1.71×10^{-9}	3.41×10^{-9}	0.12	0.88	3.21×10^{-9}	3.05×10^{-9}
3.5×10^7	1.69×10^{-9}	3.35×10^{-9}	0.12	0.88	3.16×10^{-9}	3.01×10^{-9}

Schritt 7) Auftragung der simulierten Daten. Die auf diese Weise berechneten $\tau_{\text{D(A),av}}^X$ und $\tau_{\text{D(A),av}}^A$ (letzte und vorletzte Spalte in Tabelle 4.2) in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen:

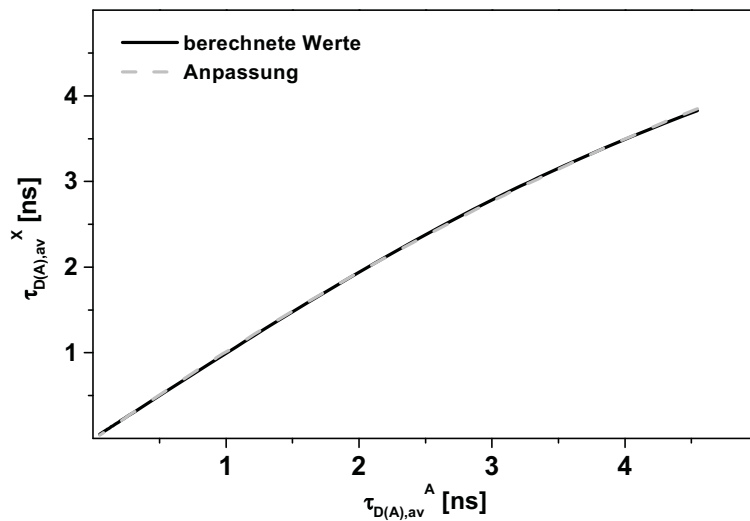


Abb. A1: $\tau_{D(A),av}^X$ und $\tau_{D(A),av}^A$.

Schritt 8) Anpassung eines Polynoms. Der Verlauf der Kurve kann in guter Näherung mit einem Polynom zweiter Ordnung, $ax^2 + bx + c$, formell beschrieben werden. Für dieses Beispiel erhält man:

$$\tau_{D(A),av}^X = -0.0176 \left(\tau_{D(A),av}^A \right)^2 + 1.0077 \tau_{D(A),av}^A + 0.006 \quad \text{Gl. A1}$$

Aus dem Vergleich dieser Gleichung mit Gl. 3.40 erhält man die Koeffizienten zur Korrektur der Fluoreszenzlebensdauern aus den Einzelmolekülexperimenten: a: -0.0176; b: 1.0077 und c: 0.006.

A2 Die Korrektur der Fluoreszenzlebensdauer für den Fall einer Reversiblen Löschung (Exciplex-Gleichgewicht) am Beispiel des Sx 225 markiert mit Alexa 488 (Vgl. Kap. 6)

Schritt 1) Meßwerte: Zunächst werden die Fluoreszenzlebensdauern (τ_{D1} und τ_{D2}) und die entsprechenden speziesgewichteten Amplituden (X_{D1} und X_{D2}) der beiden Subzutände mit Hilfe einer biexponentiellen Anpassung an die Fluoreszenzabklingkurve des Sx-225 (nur mit dem Donorfluorophor markiert) bestimmt:

Tabelle A3: Meßwerte Sx-225 (mit Alexa 488 markiert)

τ_{D1} [s]	X_{D1}	τ_{D2} [s]	X_{D2}
2.82×10^{-9}	0.61	5.64×10^{-9}	0.39

Vgl. Kap. 6.4.1

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_0 ($= k_0^{-1}$) des freien (ungebundenen) Alexa 488 beträgt 4.0×10^{-9} s ($k_0 = 2.5 \times 10^8$ s⁻¹) (Vgl. Kap. 4.3.1).

Schritt 2) Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{am} , k_d und der Exciplex Zerfallrate τ_e (ohne FRET): Mit $k_{D1} = \tau_{D1}^{-1}$ und $k_{D2} = \tau_{D2}^{-1}$ und den Amplituden aus Tabelle A3 können k_{am} , k_d und τ_e für den Donor in Abwesenheit des Akzeptors nach den Gleichungen 3.49 bis 3.51 berechnet werden:

$$k_{am} = 3.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \quad (\text{Aus Gl. 3.49})$$

$$k_d = 2.14 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \quad (\text{Aus Gl. 3.50})$$

$$\tau_e = 3.0 \times 10^{-8} \text{ s} \quad (\text{Aus Gl. 3.51})$$

Schritt 3) Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer der Zerfallsrate $\tau_{0,DA}$ ($\equiv \tau_0$ unter Berücksichtigung von FRET): Zu diesem Zweck wird willkürlich ein k_{FRET} angenommen, z.B. $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Mit $\tau_0 = 4 \times 10^{-9} \text{ s}$ ergibt sich nach Gl. 3.52:

$$\tau_{0,D(A)} = 3.70 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Schritt 4) Simulation der Werte $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$. Mit Hilfe der Werte aus Schritt 2) und Schritt 3). Werden die Zerfallsraten $k_{D(A)1}$ ($= 1/\tau_{D(A)1}$) und $k_{D(A)2}$ ($= 1/\tau_{D(A)2}$) berechnet (Diese Werte würden in einer Fluoreszenzlebensdauerexperiment gemessen werden, wenn FRET und Exciplex-Löschung nebeneinander vorliegen). Dazu werden die stark vereinfachenden Annahmen gemacht, daß die Geschwindigkeitskonstanten k_{am} und k_{d} nicht durch FRET beeinflußt werden. Dementsprechend berechnen sich die $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$, dann nach den Gleichungen 3.53 A und B:

$$k_{D(A)1} = 3.68 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \quad \tau_{D(A)1} = 2.72 \times 10^{-9} \text{ s}$$

$$k_{D(A)2} = 1.85 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \quad \tau_{D(A)2} = 5.42 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Schritt 5) Berechnung der speziesgewichteten Amplituden $X_{D(A)1}$ und $X_{D(A)2}$ nach den Gleichungen 3.54 A und B:

$$X_{D(A)1} = 0.66 \quad \text{und} \quad X_{D(A)2} = 0.34$$

Schritt 6) Berechnen der fluoreszenzgewichteten Amplituden $A_{D(A)1}$ und $A_{D(A)2}$. Die fluoreszenzgewichteten Amplituden können nach Gl. 3.6 aus den speziesgewichteten Amplituden (siehe Schritt 5) berechnet werden:

$$A_{D(A)1} = 0.49 \quad \text{und} \quad A_{D(A)2} = 0.51$$

Schritt 7) Berechnung der gemittelten, fluoreszenzgewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A),av}^A$:

Diese wird aus den in Schritt 4) berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)1}$ und $\tau_{D(A)2}$ sowie den in Schritt 6) bestimmten fluoreszenzgewichteten Amplituden X_{D1} und X_{D2} aus Tabelle A1 nach Gl. 3.39 bestimmt:

$$\tau_{D(A),av}^A = 3.15 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Schritt 8) Rücksprung zu Schritt 3): Diese Prozedur wird jetzt für den nächsten Wert von k_{FRET} wiederholt (z.B. $2.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$)

Das Verfahren wird für eine ganze Reihe verschiedener k_{FRET} simuliert. Die Werte können in einer Tabelle dargestellt werden:

Tabelle A4: Aus den Schritten drei bis sieben berechnete Daten für verschiedene k_{FRET} .

k_{FRET}	$\tau_{0,D(A)}$	$\tau_{D(A)1}$	$\tau_{D(A)2}$	$A_{D(A)1}$	$A_{D(A)1}$	$\tau_{D(A),av}^A$
$[\text{s}^{-1}]$		$[\text{s}]$	$[\text{s}]$			
1.0×10^6	3.98×10^{-9}	2.81×10^{-9}	5.63×10^{-9}	0.44	0.56	4.39×10^{-9}
5.0×10^6	3.92×10^{-9}	2.79×10^{-9}	5.58×10^{-9}	0.45	0.55	4.33×10^{-9}
1.0×10^7	3.85×10^{-9}	2.77×10^{-9}	5.53×10^{-9}	0.46	0.54	4.24×10^{-9}
1.5×10^7	3.77×10^{-9}	2.74×10^{-9}	5.47×10^{-9}	0.48	0.52	4.17×10^{-9}
2.0×10^7	3.70×10^{-9}	2.72×10^{-9}	5.42×10^{-9}	0.49	0.51	4.09×10^{-9}
2.5×10^7	3.64×10^{-9}	2.69×10^{-9}	5.37×10^{-9}	0.51	0.49	4.02×10^{-9}
3.0×10^7	3.57×10^{-9}	2.67×10^{-9}	5.33×10^{-9}	0.52	0.48	3.95×10^{-9}
3.5×10^7	3.51×10^{-9}	2.65×10^{-9}	5.28×10^{-9}	0.53	0.47	3.88×10^{-9}
4.0×10^7	3.45×10^{-9}	2.62×10^{-9}	5.24×10^{-9}	0.55	0.45	3.81×10^{-9}

Schritt 9) Auftragung der simulierten Daten. Die auf diese Weise berechneten $\tau_{0,D(A)}$ und $\tau_{D(A),av}^A$ (zweite und letzte Spalte in Tabelle 4.4) werden in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen:

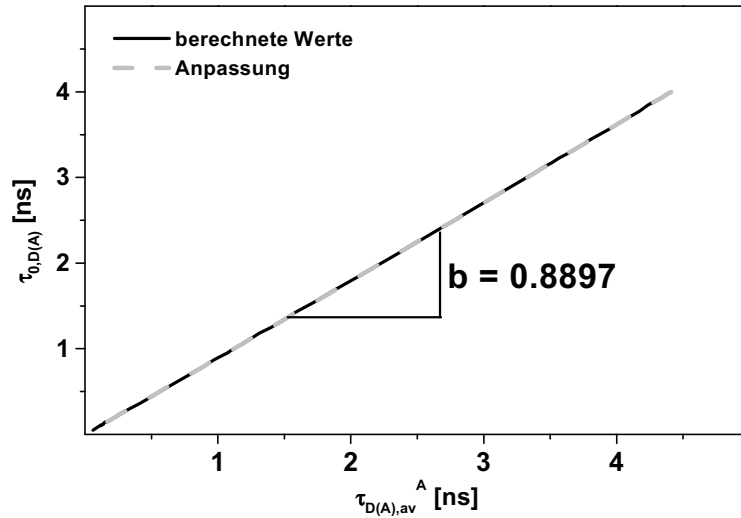


Abb. A2: $\tau_{D(A),av}^X$ und $\tau_{D(A),av}^A$.

Schritt 10) Anpassung einer Ausgleichsgeraden. Man approximiert den Zusammenhang zwischen $\tau_{0,D(A)}$ und $\tau_{D(A),av}^A$ durch eine Gerade, aus deren Steigung der Korrekturfaktor b bestimmt wird:

$$\tau_{0,D(A)} = 0.8897 \tau_{D(A),av}^A \quad \Rightarrow \quad b = 0.8897$$

Mit Hilfe des Korrekturfaktors b können schließlich die in den Einzelmolekülexperimenten bestimmten Fluoreszenzlebensdauern korrigiert werden.

Lebenslauf

Name: Enno Schweinberger
Geburtsdatum (Ort): 05.03.71 (Helmarshausen)
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Werdegang

1977 - 1981 Grundschule Gieselwerder
1981 - 1987 Integrierte Gesamtschule Bad Karlshafen
1987 - 1990 Gymnasium-Albert-Schweitzer-Schule
Abitur im Juni 1990

1990 - 1991 Grundwehrdienst

1991 - 1995 Studium an der Fachhochschule Ostfriesland
Studiengang: Chemietechnik/Biotechnologie
Abschluß des Studiums als Dipl.-Ing (FH)
Thema der Diplomarbeit: „Entwicklung eines Produktionsverfahrens für die Herstellung von Coenzym Q 10 mit *Saccharomyces boulardii*“

1996 - 1998 Studium der Chemie (Ergänzungstudiengang)
an der Universität Osnabrück
Abschluß des Studiums als Dipl.-Chem.
Thema der Diplomarbeit: „1,N⁶-Etheno-7-desaza-2'-desoxyadenosin: Synthese eines fluoreszierenden DNA-Bausteins und Untersuchungen zur Struktur von 2'-Desoxyribonucleotiden“
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. F. Seela

seit 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, Abteilung Spektroskopie und Kinetik (Prof. Dr. J. Troe) in der Arbeitsgruppe von Piv.-Doz. Dr. Claus Seidel

