

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anna Tabea Elbel

aus: Frankfurt am Main, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Untersuchungen zum Einfluss der DNA-Superhelizität
auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen
und die interne DNA-Dynamik

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski

Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon

Zusammenfassung:

Untersuchungen zum Einfluss der DNA-Superhelizität auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen und die interne DNA-Dynamik

Die DNA im Chromatin einer Zelle steht ständig unter Torsionsspannung, da ein großer Teil dieser DNA in negativ superhelikalen Windungen um Histonoktamere herum vorliegt. Positive wie auch negative Torsionsspannung wird auch z.B. während der Elongationsphase der Transkription aufgebaut. Sie steuert die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA, ändert die Struktur genregulatorischer Elemente und führt zu Änderungen der Segmentbeweglichkeit („interne Dynamik“) der DNA.

In dieser Dissertation wurde der Einfluss der Torsionsspannung der DNA auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen untersucht. Plasmide mit biochemisch eingestellter Torsionsspannung und auf ihnen rekonstituierte Nukleosomen, wurden hierfür als experimentelles Modellsystem verwendet. Damit kann einerseits die Struktur der Plasmide und Nukleosomen durch Bindung an eine Oberfläche und Bildgebung mittels Rasterkraftmikroskopie (SFM) untersucht werden. Andererseits lässt sich ihr Verhalten in Lösung mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) beobachten. Für die FCS-Messungen wurden einzelne Histonproteine fluoreszent markiert. Dies erlaubte es, mit Hilfe von salzinduzierter Destabilisierung, die Stabilität von Nukleosomen in Abhängigkeit der Torsionsspannung auf dem Plasmid zu untersuchen.

Hierbei zeigte sich, dass ein Übergang von negativer zu positiver Torsionsspannung die Nukleosomenintegrität schwächt. Mittels SFM-Bildgebung konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Nukleosomenstruktur mit abnehmender negativer Torsionsspannung und dem Auftreten von positiver Torsionsspannung öffnet.

In weiteren Experimenten wurden spezifische Stellen auf den Plasmiden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Hierdurch war es möglich die globale und interne Dynamik der Plasmide auf unterschiedlichen Zeitskalen zu beobachten. In dieser Arbeit wurde mit der beschriebenen Methode der Einfluss der Superhelizität selbst auf die interne und globale Dynamik, sowie der Einfluss der Ionenstärke der Lösung auf selbige untersucht. Die Ergebnisse erweitern ältere Messungen mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) und bestätigen einige Simulationsergebnisse experimentell.

Es werden außerdem zwei weitere biologisch relevante Effekte auf die interne DNA-Dynamik untersucht: das Verhalten der DNA in unterschiedlich viskosen Medien und bei der Verpackung in Nukleosomen. Die erhöhte Viskosität führte durch unterschiedliche Verlangsamung der internen DNA-Segmentbewegung und der Gesamtbewegung des Plasmids zu einer Trennung beider Bewegungsmodi mit steigender Viskosität. Mit ansteigender Zahl an Nukleosomen auf dem Plasmid wurde einerseits, durch die Kompaktierung der DNA, die translationale Diffusion beschleunigt. Andererseits kam es hier auf sehr kurzen Zeitskalen zu einer Beschleunigung der internen DNA-Segment-Bewegungen.

Abstract:

Experiments on the influence of DNA superhelicity on the structure and stability of nucleosomes and internal DNA-dynamics

The DNA in chromatin is constantly under torsional stress. Most of it is wound around histone octamers forming one negative supercoil per nucleosome. Positive and negative torsional strain is built up within the DNA during transcription elongation. It regulates the accessibility of nucleosomal DNA, changes the structure of gene-regulatory DNA-Elements, and changes the segmental motion within the DNA.

In this thesis, the impact of torsional strain on nucleosome structure and stability was assessed. Plasmids differing in their superhelical density and optionally carrying different numbers of nucleosomes were used as a model system. This way, changes in the structure of the plasmids and nucleosomes can be observed using scanning force microscopy (SFM). In addition, the behaviour of the plasmids in solutions can be observed by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Single histone proteins were labelled fluorescently for the FCS measurements. The influence of torsional strain on the stability of nucleosomes was assessed using salt-induced destabilisation in combination with FCS. The transition from negative to positive supercoiling resulted in a decrease of the nucleosome integrity. SFM imaging revealed an opening of the nucleosome structure with decreasing negative torsional strain and the occurrence of positive strain.

Specific sites on the plasmids were labelled fluorescently for additional experiments. This way it was possible to observe changes in the global and internal DNA dynamics of these plasmids for different timescales. This method was used to measure the influence of torsional strain and of the ionic strength of the solution on the DNA dynamics. The results presented in this thesis extend older measurements that were obtained with dynamic light scattering and experimentally confirm the data found in simulations.

Additionally two biologically relevant parameters were tested for their influence on the DNA dynamics: the influence of increasing solution viscosity and of nucleosome formation. The internal and global regimes of the DNA-dynamics were separated with increasing viscosity, due to their disproportionate deceleration. In the second set of the experiments, the translational diffusion was found to increase with higher nucleosome numbers per plasmid. An acceleration of the segmental mobility was observed for very short timescales.

Instruments register only those things they're designed to register.
Space still contains infinite unknowns.

(Lt. Cmdr. Spock in „Star Trek: The Naked Time“)

Diese Dissertation wurde zwischen Juni 2009 und Mai 2015 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) unter der Betreuung von Prof. Dr. Jörg Langowski und Prof. Dr. Harald Herrman-Lerdon erstellt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Grundlagen	3
1.1. Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	3
1.2. Superhelikale DNA	6
1.2.1. Torsionsspannung und Superhelixbildung	6
1.2.2. Torsions-induzierte DNA-Strukturen	8
1.2.3. DNA-Dynamik und Genregulation	11
1.3. Brownsche Molekularbewegung	11
1.4. Polymer-Dynamik	13
1.5. Torsionsspannung und Polymer-Dynamik	15
1.6. DNA-Verpackung: Vom Nukleosom zum Chromatin	16
1.6.1. Das Nukleosom	16
1.6.2. Posttranslationale Modifikation von Nukleosomen	17
1.6.3. Chromatinorganisation	18
1.6.4. Chromatinstruktur und Genexpression	19
1.7. Torsionsspannung im Zellkern	21
1.7.1. Aufbau und Umsatz von Torsionsspannung im Zellkern	21
1.7.2. Torsionsspannung und Transkription	21
1.8. Fragestellungen und Struktur dieser Arbeit	23
1.8.1. Einfluß von Chromatin/Verpackung der DNA auf interne Dynamik superhelikaler DNA	23
1.8.2. Einfluss der DNA-Torsionsspannung auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen	24
II. Material & Methoden	25

2. Material und Methoden	27
2.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	27
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2. Geräte	27
2.1.3. Plasmid-DNA	29
2.2. Mikrobiologische Verfahren	30
2.2.1. Bakterien	30
2.2.2. Transformation	30
2.3. Molekularbiologische und biochemische Verfahren	30
2.3.1. Plasmidfermentation	30
2.3.2. Minipräparation	31
2.3.3. Maxipräparation	31
2.3.4. HPLC-Aufreinigung	31
2.4. Herstellung von Plasmid-DNA Topoisomeren	32
2.4.1. Relaxierung negativ superhelikaler Plasmide	32
2.4.2. Herstellung und Aufreinigung negativ superhelikaler Topoisomere . . .	32
2.4.3. Herstellung und Aufreinigung positiv superhelikaler Topoisomere . . .	33
2.5. Elektrophoresen	34
2.5.1. Agarose-Gelelektrophorese	34
2.5.2. Chloroquingele	35
2.6. Sequenzspezifische Fluoreszenzmarkierung von superhelikaler DNA	36
2.6.1. Markierung mittels triplexbildenden Oligonukleotiden (TFOs)	36
2.6.2. Bau eines UV-Crosslinkers für die TFO-Markierung	37
2.6.3. Gelfiltration der fluoreszent markierten DNA	39
2.7. Herstellung fluoreszenzmarkierter Nukleosomen	40
2.7.1. Oktamerpräparation	40
2.7.2. Nukleosomenrekonstitution mittels Salzdialyse	40
2.8. Messmethodik und Grundlagen zur Messmethodik	42
2.9. Rasterkraftmikroskopie	42
2.9.1. Prinzip	42
2.9.2. Messmodi	43
2.9.2.1. Kontaktmodus	43
2.9.2.2. Nichtkontaktmodus	44
2.9.2.3. Intermittierender Modus oder Tapping-Modus	44
2.9.2.4. Auflösung	44

2.9.3.	Probenpräparation und Mikroskopie	45
2.9.3.1.	Glimmer als Messoberfläche	45
2.9.3.2.	Probenpräparation	46
2.9.3.3.	Durchführung der Messungen und Auswertung der SFM- Topographien	47
2.10.	Grundlagen der Fluoreszenz	49
2.10.1.	Licht	49
2.10.2.	Lichtabsorption	49
2.10.3.	Fluoreszenz	50
2.10.4.	Triplet-Übergang	52
2.10.5.	Chemische Fluorophore	52
2.11.	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	54
2.11.1.	Prinzip der FCS	54
2.11.2.	Theoretische FCS-Fitmodelle	55
2.11.2.1.	Transformation der FCS-Kurven in mittlere quadratische Ver- schiebungen (MSD)	57
2.11.2.2.	Triplettdynamik	58
2.11.3.	Datenauswertung	58
2.11.3.1.	FCS-Autokorrelation	58
2.11.3.2.	MSD	58
2.11.3.3.	Maximale Entropie-Verteilung (MaxEnt)	59
2.11.3.4.	Ausschluss von Messartefakten	60
2.11.4.	optischer Aufbau	60
2.11.5.	Gerätekalisierung	61
2.12.	Sequenz-spezifischen Plasmid-Markierung mittels Peptid-Nukleinsäuren (PNA)	62

III. Ergebnisse **67**

3. Interne Dynamik superhelikaler DNA **69**

3.1.	Einleitung	69
3.2.	Interne Dynamik unterschiedlicher Topoisomere mittels FCS	70
3.2.1.	Experimentdurchführung	70
3.2.2.	Ergebnisse der FCS Autokorrelationsfits	70
3.2.3.	Messung der internen Dynamik über MSD	74
3.2.4.	Vergleich der Messungen mit Simulationen von Wocjan et al.	78

3.3.	Einfluss der Ionenstärke auf die interne Dynamik superhelikaler DNA	79
3.3.1.	Experimentdurchführung	79
3.3.2.	FCS-Eichung bei variierender Salzkonzentration	79
3.3.3.	Ergebnisse der FCS-Fits	80
3.3.4.	Messung der internen Dynamik über MSD	83
3.4.	Interne Dynamik superhelikaler DNA in komplexen Medien (Ficoll400)	87
3.4.1.	Experimentdurchführung	87
3.4.2.	FCS-Eichung bei variierender Ficoll400-Konzentration	87
3.4.3.	Ergebnisse der FCS-Fits	90
3.4.4.	Messung der internen Dynamik über MSD	93
3.5.	Einfluss der Verpackung von DNA in Nukleosomen auf ihre interne Dynamik	96
3.5.1.	Einleitung	96
3.5.2.	Experimentdurchführung	96
3.5.3.	SFM und FCS Ergebnisse	97
3.5.4.	Messung der internen Dynamik über MSD	101
4.	Nukleosomenstruktur und Stabilität	105
4.1.	Einleitung	105
4.2.	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zum Einfluss der DNA Superspiralisierung auf den Nukleosomenöffnungswinkel	106
4.2.1.	Experimentdurchführung	106
4.2.2.	Ergebnisse der SFM-Messungen	107
4.3.	FCS-Messungen der Salz-induzierten Destabilisierung von fluoreszent-markierten Nukleosomen	110
4.3.1.	Experimentdurchführung	110
4.3.2.	FCS-Ergebnisse der Destabilisierung H2B-markierter Nukleosomen	111
4.3.3.	FCS-Ergebnisse der Destabilisierung H4-markierter Nukleosomen	112
IV.	Diskussion und Ausblick	119
5.	Abschließende Diskussion und Ausblick	121
5.1.	DNA-Struktur und Genregulation	121
5.2.	Torsionsspannung und interne DNA-Dynamik	122
5.3.	Torsionsspannung und Nukleosomen	126

Anhang	131
Abkürzungsverzeichnis	133
Abbildungsverzeichnis	137
Tabellenverzeichnis	141
Literaturverzeichnis	143
Danksagung	161

Teil I.

Einleitung

1. Grundlagen

1.1. Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

Alle lebenden Organismen speichern ihre genetische Informationen in Form von Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Dieser Informationsträger kodiert alle Bauanleitungen für die Synthese von Biomolekülen, wie Proteine und RNAs, in Form von Genen (kodierende DNA-Abschnitte). Sie kodieren z.B. Proteine, die für das Wachstum der Zellen, wie auch für die Ausbildung von speziellen Strukturen in höheren Organismen nötig sind. DNA ist allerdings kein reiner Informationsspeicher und besteht nicht nur aus Genen. Es gibt auch Bereiche die keine genetischen Information tragen, so genannte nicht-kodierende DNA-Abschnitte. Lange war nicht klar welche Aufgaben diese DNA-Bereiche haben, mittlerweile weiß man allerdings, dass sie, z.B. aufgrund von strukturellen Eigenschaften, regulatorische Aufgaben übernehmen können [1]. Vermutlich gibt es noch weitere, bislang unbekannte Funktionen für diese DNA-Abschnitte.

Die DNA ist ein langes polymeres Molekül, das aus miteinander verknüpften Bausteinen, den Nukleotiden aufgebaut ist. Nukleotide bestehen aus einer aromatischen Base, die kovalent an eine Desoxyribose gebunden ist, welche wiederum an ihrem 5'C-Atom eine negativ geladene Phosphatgruppe trägt (siehe Abbildung 1.1). Diese Nukleotide werden nach ihrer Base unterteilt, von denen vier in der DNA vertreten sind: Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Die grobe Unterteilung der Basen geschieht aufgrund ihrer Ringsysteme (siehe Abbildung 1.1 a). Cytosin und Thymin (sowie die sich aus Thymin ableitende, in Ribonukleinsäuren vorkommende Base Uracil) basieren auf dem Grundgerüst eines Pyrimidins; Adenin und Guanin basieren auf dem eines Purins. Durch Phosphorsäurediester-Bindungen zwischen der 5'- und der 3'-Position der Desoxyribose werden die Nukleotide zu einem Polymer zusammengefügt (siehe Abbildung 1.1 b).

Zwei solcher Polymere lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gegenüber liegenden Basen in entgegengesetzter Polarität zu einem Doppelstrang zusammen. Die Basen sind hierbei nicht beliebig miteinander verbunden, sondern es kommt immer zu Paarungen zwischen einer Purin- und einer Pyrimidinbase. Jede Base verbindet sich nur spezifisch mit einer komplementären Base, wobei diese Paarungen durch die Stabilität der Wasserstoffbrücken

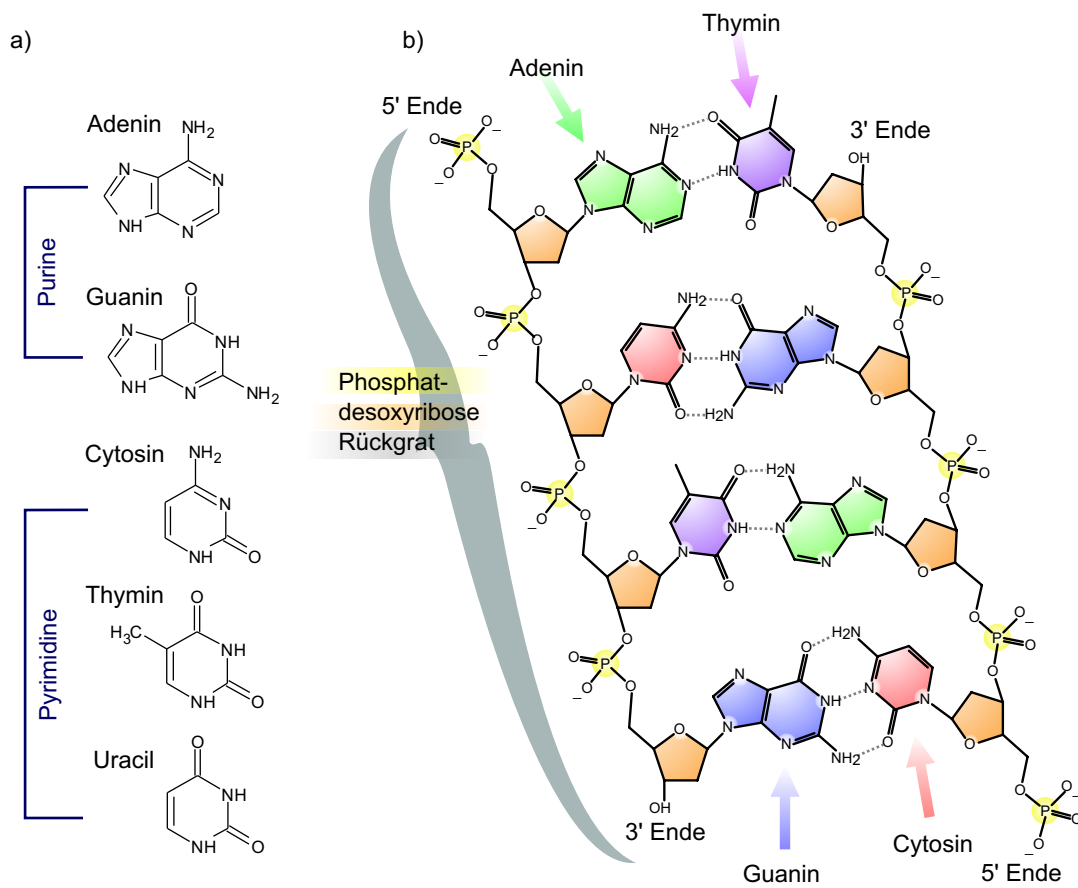


Abbildung 1.1.: DNA-Struktur: a) zeigt die Strukturformeln aller DNA Basen, wie auch die sich aus Thymin ableitende RNA-spezifische Base Uracil. Der rechte Bildabschnitt b) gibt eine Übersicht über die Basenpaarungen in der DNA und das dadurch entstehende Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat. Bildquelle für b): https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chemische_Struktur_der_DNA.svg, Wikipedia-Autoren: *Madeleine Price Ball*, *User:Madprime*, derivative work: *Matt*

zwischen den Basen festgelegt werden. Folgende komplementäre Basenpaarungen sind möglich: Adenin (A) bindet an Thymin (T) mit zwei stabilen Wasserstoffbrücken und Guanin (G) bindet an Cytosin (C) mit drei stabilen Wasserstoffbrücken (siehe Abbildung 1.1).

Durch die antiparallele Anlagerung zweier DNA-Einzelstränge bildet sich eine rechtsgängige Doppelhelix, in der beide DNA-Stränge umeinander gewunden vorliegen. Diese Struktur wird u.a. durch Stapelwechselwirkungen (base stacking) zwischen den Basen stabilisiert. Drei DNA-Helix-Strukturen sind bekannt: A-DNA, B-DNA und Z-DNA (siehe Abbildung 1.2). Die B-Form der DNA liegt unter physiologischen Bedingungen vor. Sie hat einen Durchmesser von 2 nm und die Basenpaare sind entlang der Helixachse in einem Abstand von 0,34 nm gestapelt, dies entspricht 10,5 Basenpaaren (Bp) pro Helixwindung. Die Z-DNA hat, im Gegensatz zur „glatten“ Rückgratstruktur der A- und B-Form, einen zickzack-artigen Verlauf des Zucker-Phosphat-

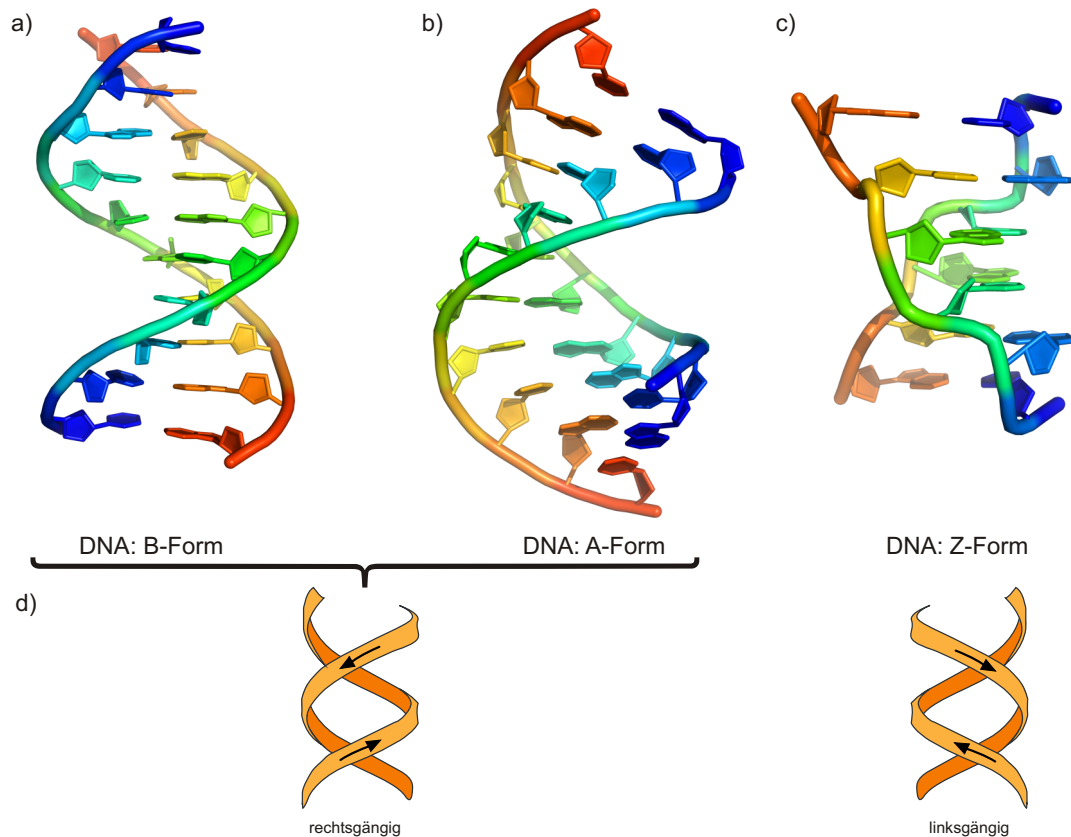


Abbildung 1.2.: Überblick über die Helixformen der DNA. In a) ist die Struktur eines kurzen B-DNA-Abschnitts gezeigt, in b) die Struktur der A-Form der DNA und in c) die Z-Form der DNA [3]. d) gibt eine Orientierung der Helixgängigkeit in den unterschiedlichen DNA-Formen wieder. Pdb-Dateien für Bild a) von: http://web.chem.ucsb.edu/~molvisual/nuc1_struct.html. Bildquelle der Windungsrichtung: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Levo_dextro-4.svg, Wikipedia-Autoren: Deneapol, Original uploader: Deneapol, derivative work: KES47, derivative work: Parzi.

Rückgrates und ist im Vergleich zu der rechtsgängigen B-DNA linksgängig. Diese Form der DNA hat eine metastabile Konformation, sie liegt nur unter speziellen Voraussetzungen vor, wie etwa einer alternierenden Abfolge von Purinen und Pyrimidinen. Hohe Salzkonzentrationen, oder hohe Torsionsspannungen in der DNA können ebenfalls zu dieser Z-Form der Helix führen. Die A-Form der DNA-Helix ist wie die B-Form auch rechtsgängig aber im Vergleich zu dieser kompakter. Die Nukleotide sind hier nicht orthogonal zur Helixachse ausgerichtet wie in der B-Form. Diese Form der Helix wurde bei getrockneten DNA-Proben gefunden [1]. Im biologischen Kontext nehmen Doppelhelices aus Ribonukleinsäuren (RNA) häufig eine solche Form an. Sie wurde ebenso für DNA-RNA-Hybridhelices vermutet [2].

Die genetische Information der DNA ist in ihrer Basenabfolge kodiert. Sie wird von RNA-

Polymerasen während der Transkription abgelesen. Hierbei entsteht eine Abschrift der DNA in RNA, einem einzelsträngigen Ribonukleinsäure-Polymer. Dieses Molekül dient als Informationsüberträger bei der Proteinsynthese (Translation), es kann aber auch strukturelle und katalytische Aufgaben übernehmen. Die genetische Information für die Translation in Proteine ist in Dreierblöcken organisiert, die jeweils für eine der 20 in Proteinen vorkommenden Aminosäuren kodieren. Ein RNA-Molekül wird von der Translations-Maschinerie in Blöcken von drei Basen gelesen, die dann jeweils zur spezifischen Ankopplung der kodierten Aminosäuren an das sich bildende neue Protein führen. Die Basenabfolge bestimmt somit auch die Reihenfolge der Aminosäuren in Proteinen.

1.2. Superhelikale DNA

1.2.1. Torsionsspannung und Superhelixbildung

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, besteht das DNA Molekül aus zwei Einzelsträngen, welche eine Helix bilden. Unter physiologischen Bedingungen hat ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül (ds-DNA) eine definierte Anzahl an Windungen pro Länge. Verschließt man nun die beiden Enden der linearen ds-DNA zu einem Ring (siehe Abbildung 1.3), so lassen sich enzymatisch weitere Windungen hinzufügen oder auch heraus nehmen. Die dadurch zusätzlich vorhandene Torsionsspannung kann die DNA ausgleichen, indem sie kompliziertere räumliche Strukturen als einen Ring bildet. Es entsteht eine superhelikale Struktur in der auch die DNA Doppelstränge umeinander gewickelt sind (siehe Abbildung 1.3 unten). Diese so genannte Superhelizität ist eine topologische Eigenschaft der DNA, die durch die Gesamtverwindungszahl Lk bestimmt. Betrachtet man ein ebenes, ringförmiges DNA-Molekül (Plasmid) so beschreibt Lk die Anzahl der Windungen der beiden Einzelstränge umeinander. Lk ist hierbei eine konstante Größe für ein Plasmid und kann nur geändert werden, wenn das Molekül enzymatisch geöffnet wird (Einzelstrangbruch) und so Windungen aus dem Molekül heraus genommen oder hinzugefügt werden. Enzyme, die dies vermögen, gehören zu den Gyrasen. Sie binden an die DNA und trennen das Rückgrat des Moleküls, wobei beide Enden des DNA-Moleküls im Enzym gebunden bleiben. Unter ATP-Verbrauch wird nun ein Strang um 360° um den zweiten Strang gedreht. So wird eine Helixwindung eingeführt oder entfernt. Schließlich wird das Rückgrat der DNA-Stränge wieder verschlossen [4].

Ein DNA-Plasmid ohne Torsionsspannung wird als relaxiert bezeichnet. Für ein solches Molekül ergibt sich Lk (dann Lk_0 genannt) aus der Anzahl an Basen N und der mittleren Zahl

von Basen pro Helixwindung (10,5 bp für relaxierte B-DNA) [4, 5]:

$$Lk_0 = \frac{N}{10,5} \quad (1.2.1)$$

wobei N für die Anzahl der Basenpaare steht. Ein durch eine Gyrase verändertes Plasmid hat im Vergleich zum relaxierten Zustand Lk_0 , eine größere Verwindungszahl $Lk \geq Lk_0$ im Falle der positiven Verdrehung der DNA und eine kleinere Verwindungszahl im Falle einer negativen Verdrehung. Werden so z.B. bei einem DNA-Molekül mit einer Verwindungszahl von $Lk_0 = 20$ zwei Helix-Windungen aus der DNA genommen, so hat das Molekül nunmehr eine geringere Gesamt-Verwindungszahl von $Lk = 18$. Die Differenz zwischen Lk_0 und Lk wird als Verwindungsdifferenz ΔLk bezeichnet:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 \quad (1.2.2)$$

In Abbildung 1.3 ist das Verhältnis zwischen Lk und ΔLk schematisch dargestellt.

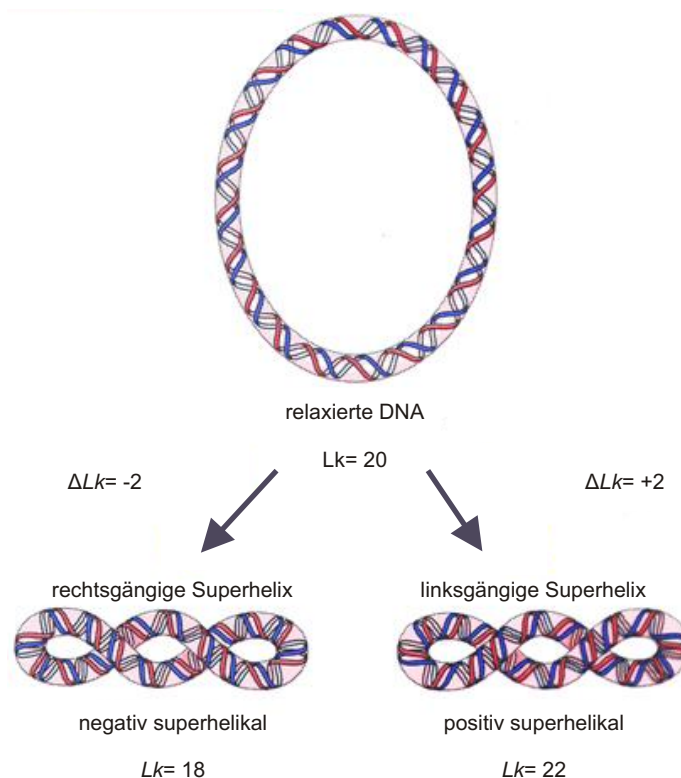


Abbildung 1.3.: Entstehung von Superhelikalität. Das Bild zeigt die Konformationsänderung eines relaxierten Plasmids, wenn Superhelixwindungen hinzugefügt oder entfernt werden. Bildquelle: adaptiert von <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc461/GRAPHICS/Chapter27/Slide24.JPG>.

Eine genaue Beschreibung der topologischen Struktur superhelikaler Plasmide ist über die zwei Parameter 'Twist' und 'Writhe' möglich, auf die sich die Gesamtverwindungszahl Lk aufteilt:

$$Lk = Tw + Wr \quad (1.2.3)$$

Die Windungszahl Tw (engl. twist) gibt die Zahl der Helixwindungen um den DNA-Strang wieder, während Writhe Wr zusätzliche Superhelixwindungen der Doppelstränge umeinander beschreibt. Weicht die Verwindungszahl Lk von der Norm Lk_0 ab, so ist dieser Zustand energetisch ungünstig. Das Molekül windet sich im Raum um sich selbst und es entstehen superhelikale Windungen, die die positive oder negative Verdrehung der DNA ausgleichen. Die Anzahl der Basenpaare pro helikaler DNA-Windung entspricht durch den Ausgleich der Torsionsspannung wieder ihrem Normzustand von 10,5 bp in relaxierter B-DNA.

Werden helikale Windungen aus dem DNA-Molekül genommen so bekommt ΔLk ein negatives Vorzeichen und man spricht dementsprechend von negativer Torsionsspannung, die zu negativen Superhelixwindungen führt. Die Superhelix ist in diesem Fall rechtsgängig (siehe Abbildung 1.3). Wird die DNA durch die Einführung von Helixwindungen positiv verdreht so hat sie auch ein positives Vorzeichen, die Superhelix ist hier linksgängig. Gleiche DNA-Moleküle mit unterschiedlichen Lk -Werten werden als Topoisomere bezeichnet. Twist und Writhe lassen sich ineinander umwandeln, die Torsionsspannung verteilt sich aber zwischen beiden Größen, wobei dem Writhe der größere Anteil zukommt [6–8].

Die Differenz ΔLk kann auch, normiert auf Lk_0 , durch die spezifische Superhelixdichte σ ausgedrückt werden:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \quad (1.2.4)$$

Die Verwindungsdifferenz ΔLk und damit auch die Superhelixdichte σ können experimentell bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.5.1).

1.2.2. Torsions-induzierte DNA-Strukturen

Die Einführung von Superhelixwindungen kompaktiert ein Plasmid. In Abbildung 1.4 sind Rasterkraft-mikroskopische Aufnahmen von zwei Topoisomeren eines ringförmigen DNA-Plasmids (pUC18) abgebildet. Abbildung 1.4 a) zeigt das Plasmid in seinem relaxierten Zustand ($\sigma = 0$) und b) in seinem nativ negativ superhelikalen Zustand ($\sigma \approx -0.046$). Wie aus den Aufnahmen deutlich wird, sind die in der Superhelix gegenüber liegenden DNA-Stränge eng

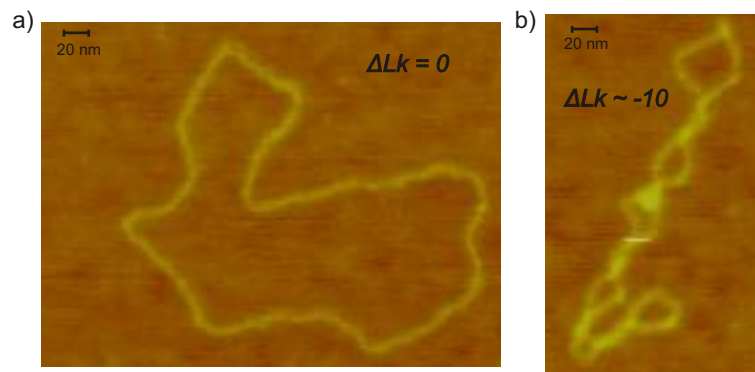


Abbildung 1.4.: Kompaktierung von Plasmiden durch die Ausbildung von Superhelixwindungen. Gezeigt sind zwei rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von pUC18 Plasmid-Topoisomeren. a) zeigt ein relaxiertes Plasmid mit $\sigma = 0$ und b) ein negativ superhelikales mit einer Superhelix-Dichte von $\sigma \approx -0.046$.

umeinander gewunden. Diese geflochtene Struktur der Superhelix wird als Plektonem bezeichnet. In Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) [9] und Neutronenstreuung [10] wurde gezeigt, dass diese plektonemische Struktur superhelikaler DNA in Lösung dominiert. Dies wurde ebenfalls mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraft-Mikroskopie [6, 11–14] nachgewiesen.

Aufgrund der Kompaktierung des Plasmids durch die Superhelixwindungen liegen genomisch entfernte Orte auf der ds-DNA nun mit einer größeren Wahrscheinlichkeit räumlich nahe beieinander, als im relaxierten oder linearisierten Zustand. Mit Monte-Carlo Simulationen konnte z.B. gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit der Annäherung zweier interagierender, entfernt voneinander liegenden DNA-Stellen, in eine Distanz, die Interaktionen zwischen ihnen erlaubt (Annahme: ≤ 50 nm), um zwei Größenordnungen steigt, wenn die superhelikale Dichte von σ von $\sigma = 0$ auf $\sigma = -0,06$ steigt [15]. Der Kontakt zwischen zwei Stellen auf der DNA wird nicht nur durch die Kompaktierung der Struktur ermöglicht, sondern vielmehr durch dynamische Konformationsänderungen der superhelikalen DNA-Struktur. Durch Simulationen der Brownschen Dynamik (BD) von Plasmiden, also ihrem zufälligem Bewegungsverhalten in Lösung (Diffusion), konnten solche Konformationsänderungen nachvollzogen werden Abbildung 1.5.

Abbildung 1.5 zeigt beispielhaft einige aufeinander folgenden Konformationen aus einer solchen Simulation [16]. Dort erkennt man auch, dass sich immer wieder Nebenäste aus dem Hauptast der Struktur bilden, die später wieder absorbiert werden. Verzweigungen dieser Art konnten auch experimentell, durch die Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesen werden [8]. Dort wurde ebenfalls gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit der Verzweigung mit der Länge der DNA und der zunehmenden Superhelixdichte ansteigt. Der gleiche Effekt zeigte sich auch in Monte Carlo-Simulationen [15, 17]. Außerdem wurde in Simulationen auch eine 1-dimensionale Bewegung der DNA entlang ihrer eigenen Achse beobachtet [15, 18],

die als Reptation bezeichnet wird. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Bewegung durch die Strukturänderungen im Plasmid und Auf- sowie Abbau der Verzweigungen entsteht [19–21].

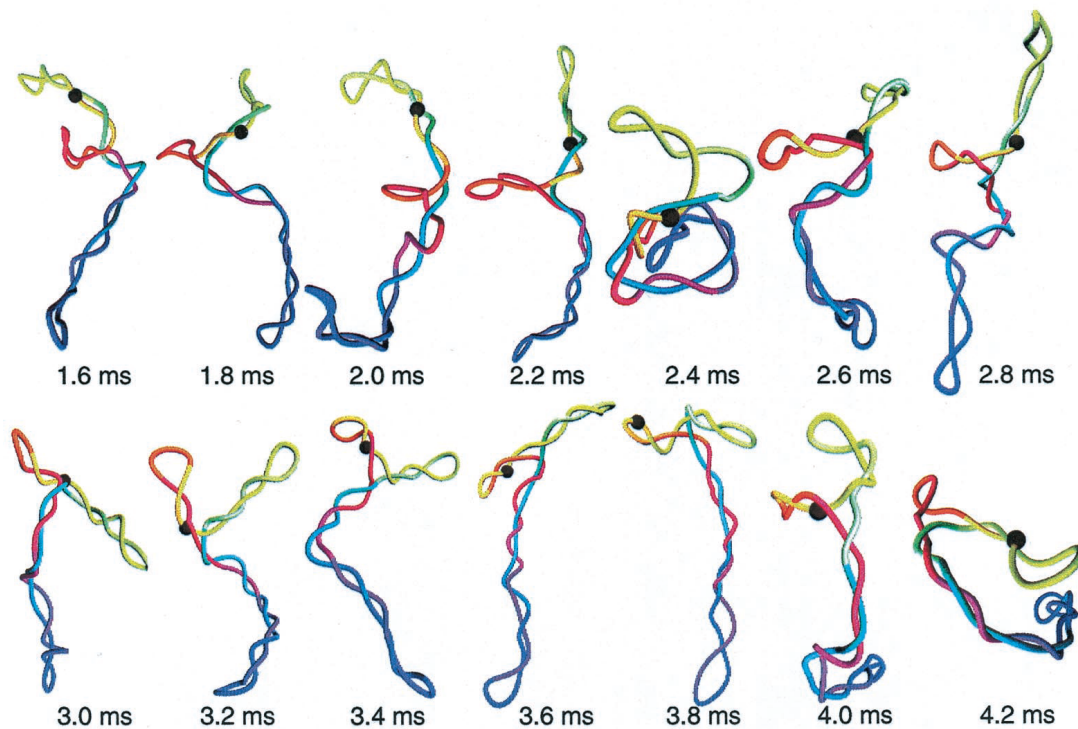


Abbildung 1.5.: BD-Simulation eines 3.000 bp großen negativ superhelikalen Plasmid. Dargestellt sind die Änderungen der Plasmidstruktur, hervorgerufen durch ihre zufälligen Bewegungen in Lösung. Zwischen jeder Konformationen liegen 0,2 ms. Die schwarze Kugel markiert eine DNA-Stelle, deren Position sich, aufgrund der Umlagerungen der Plasmid-Struktur entlang der DNA-Kontur bewegt. Bild entnommen aus [16].

1.2.3. DNA-Dynamik und Genregulation

Die eben beschriebene DNA-Dynamik scheint bei der Genregulation eine wichtige Rolle zu spielen. Für die Genregulation ist es essentiell, dass weit voneinander liegende Stellen auf der DNA zu einem bestimmten Zeitpunkt schnell zu einander finden. In der Transkription wird die Ablese rate eines Gens z.B. über die Kontaktfrequenz zwischen Enhancer- oder Repressor-Sequenzen und dem Promotor eines Gens beeinflusst. Diese regulatorischen Sequenzen können mehrere tausend Basenpaare von der Promotersequenz entfernt liegen.

Die RNA-Polymerase bindet bei der Transkription zuerst an eine Promotorsequenz, die dem zu transkribierendem Gen vorgelagert ist. Die Bindung erfolgt in der inaktiven Form des Proteins. Durch die Bindung eines σ -Faktors an die RNA-Polymerase entsteht der so genannte Holoenzym-Komplex. Der σ -Faktor interagiert mit weiteren Proteinen, die an oben genannte Enhancer-Sequenzen binden. Zu diesen Enhancer bindenden Proteinen (EBP, enhancer binding proteins) gehört auch NtrC (nitrogen regulatory protein C), welches in *E. coli* die Expression des Enzyms Nitrogenase reguliert. Erst durch die Interaktion zwischen NtrC und dem σ -Faktor 54 geht der Polymerase-Komplex in die aktive Form über und die Transkription wird gestartet. Dazu müssen diese Proteine aber zunächst in räumliche Nähe kommen. So konnte in einigen Simulationen und Experimenten gezeigt werden, dass die Aktivierungsraten des RNA-Polymerase Holoenzymen, (komplexiert mit σ -Faktor 54) in superhelikalen Plasmiden deutlich höher waren als in relaxierten Plasmiden [22–25].

1.3. Brownsche Molekularbewegung

Ein großer Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Bewegung von DNA-Plasmiden und Nukleosomen in Lösung. Deren zufällige, diffusive Bewegungen beruhen auf thermisch getriebenen Brownschen Molekularbewegung in Flüssigkeiten und Gasen (siehe Abbildung 1.6) [26]. Durch Zusammenstöße mit Molekülen des Lösungsmittels verteilen sie sich und bewegen sich statistisch in der Lösung. Mathematische Modelle, welche diese Zufallsbewegungen beschreiben werden als Random-Walk-Modelle bezeichnet. Die Bewegung einzelner Moleküle kann durch ihre mittlere quadratische Verschiebung (MSD) beschrieben werden. Diese misst nur den quadrierten Abstand, den ein Molekül während einer gewissen Zeit τ zurücklegt und mittelt so die zufällige Bewegung heraus. Für eine (3-dimensionale) Trajektorie $\vec{x}(t)$ lässt sich das MSD wie folgt mathematisch definieren:

$$\langle r^2 \rangle(\tau) = \left\langle \left[\vec{x}(t) - \vec{x}(t + \tau) \right]^2 \right\rangle \quad (1.3.1)$$

Wobei $\vec{x}(t)$ der Startpunkt zur Zeit t und $\vec{x}(t + \tau)$ der Endpunkt nach einer Zeitspanne τ sind. Die $\langle \cdot \rangle$ -Klammern bedeuten entweder eine Mittelung über viele Teilchen oder über verschiedene Zeitspannen τ während der Bewegung eines einzelnen Teilchens.

Albert Einstein hat aus einer statistischen Betrachtung der normalen Diffusion deren MSD berechnet [27]:

$$\langle r^2 \rangle(\tau) = 6 \cdot D \cdot \tau. \quad (1.3.2)$$

Das MSD steigt linear mit der Zeit und der Proportionalitätsfaktor wird Diffusionskoeffizient genannt. Dieser beschreibt damit wie weit sich das Teilchen im Mittel in einer gegebenen Zeit τ bewegt und ist in dieser Arbeit ein wichtiger Parameter. Umgekehrt kann aus der zurückgelegten quadrierten Wegstrecke eines Teilchens der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Der Diffusionskoeffizient eines Teilchens steigt mit der absoluten Temperatur T (in Kelvin K) an, das Teilchen bewegt sich also schneller. Mit steigender Viskosität des Mediums η bewegt es sich dagegen langsamer. Auch die Größe und Form des Teilchens, beschrieben durch seinen hydrodynamischen Radius R_h , beeinflusst die Bewegung. Albert Einstein leitete eine Beziehung her, die diese Abhängigkeiten mathematisch fasst (Stokes-Einstein-Gleichung) [27]:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_h}. \quad (1.3.3)$$

Hierbei ist k_B die Boltzmann-Konstante, die eine Temperatur T mit der mittleren thermischen Energie von Teilchen dieser Temperatur in Beziehung setzt.

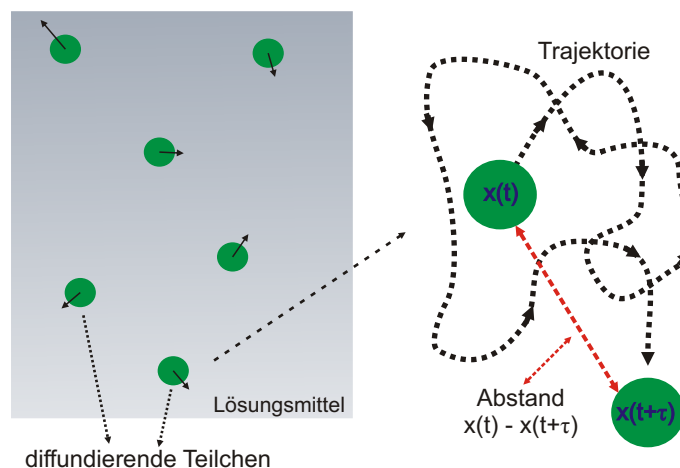


Abbildung 1.6.: Mittlere quadratische Verschiebung eines diffundierenden Teilchens. Betrachtet wird der Abstand zwischen einem Startpunkt des Teilchens und dem Aufenthaltsort nach einer gewissen Diffusionszeit.

1.4. Polymer-Dynamik

Um den zeitlichen Ablauf vitaler Zellprozesse auf DNA-Ebene zu verstehen ist es wichtig sich mit der Dynamik von Chromatin bzw. in erster Instanz mit der Dynamik von DNA zu befassen. Der Begriff der Dynamik wird hier im Zusammenhang mit der physikalischen Betrachtung der DNA als Polymer genutzt, es wird also die Bewegung der Segmente eines langen DNA-Stranges (oder Rings) betrachtet [28].

Die DNA-Dynamik befasst sich mit Bewegungen und Fluktuationen der Konformation des helikal gewundenen Polymers auf unterschiedlichen Zeitskalen. Diese Bewegungen sind abhängig von den Eigenschaften des Polymers, wie z.B. der Biegesteifigkeit, der Elastizität, sowie den hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den DNA Segmenten [28]. Diese mechanischen Eigenschaften des DNA-Polymers werden *in vivo* wiederum beeinflusst durch seine lokale Sequenz und die Umgebung (Ionenstärke und Viskosität des Mediums) des Moleküls, sowie seine Interaktion mit Proteinen, wie z.B. der Transkriptionsmaschinerie.

Für die Darstellung der DNA-Dynamik wurde in dieser Arbeit das MSD einzelner DNA-Segmente beobachtet. Abbildung 1.7 b) zeigt die Skizze einer MSD-Kurve, wie sie dabei typischerweise auftritt. Die normale Diffusion des Schwerpunkts eines DNA-Molekül wird durch die bereits eingeführte Einstein-Relation (Gleichung (1.3.2)) beschrieben (gestrichelte rote Linie). Auf kurzen Zeitskalen kommen nur die Bewegungen der DNA-Segmente des Polymers zum tra-

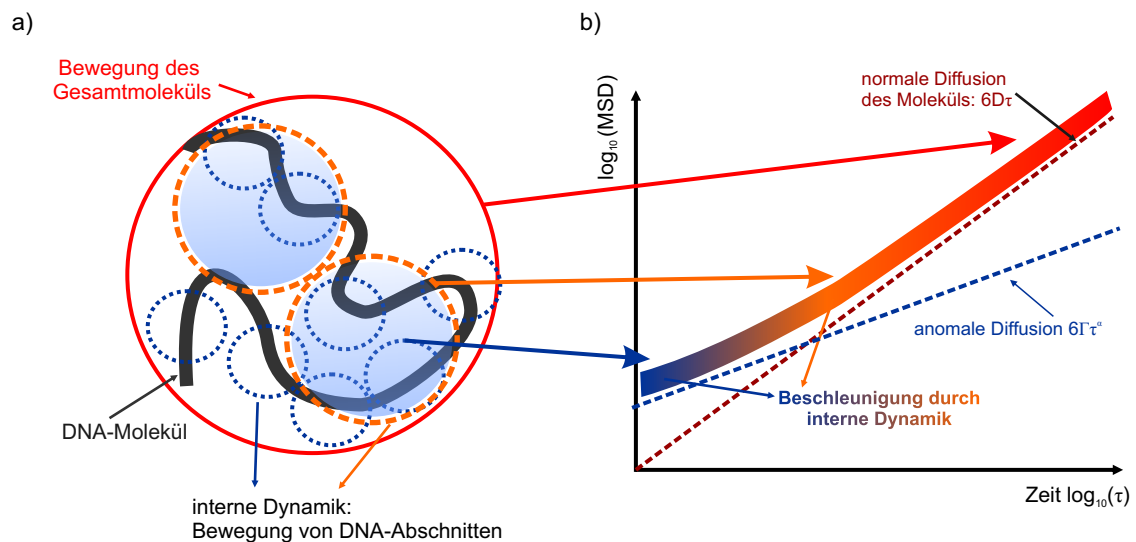


Abbildung 1.7.: DNA-Dynamik betrachtet auf unterschiedlichen Zeitskalen. a) Auf unterschiedlichen Zeitskalen werden die Bewegungen unterschiedlich großer DNA-Abschnitte betrachtet. In b) ist die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) gegen die Zeit aufgetragen. Auf kurzen Zeitskalen werden die internen DNA-Polymerbewegungen sichtbar. Bei größeren Zeiten überwiegt die Schwerpunktsbewegung des gesamten Moleküls.

gen, da sich die langsamere Bewegung des Gesamtmoleküls noch nicht so stark auswirkt. Hierbei gilt, je kürzer die Zeit τ desto kürzer ist das beobachtete Segment (verdeutlicht über gestrichelte Kreise in Abbildung 1.7a) und desto weniger weit bewegt sich das Segment. Die Steigung der MSD Kurve folgt in diesem Bereich nicht mehr der normalen Diffusion (Gleichung (1.3.2)), sondern einem anomalen Diffusionsgesetz [29]:

$$\langle r^2 \rangle(\tau) = 6 \cdot \Gamma \cdot \tau^\alpha. \quad (1.4.1)$$

Hierbei ist Γ der verallgemeinerte anomale Diffusionskoeffizient und α (Steigung im doppel-logarithmischen Plot) der Anomaliekoeffizient. Für den Spezialfall $\alpha = 1$ und $\Gamma = D$ ergibt sich wieder die Einstein-Relation.

Für die anomale Diffusion der Polymer-Segmente gibt es mehrere vereinfachte analytische Modelle. Für das so genannte „Rouse“-Modell nimmt man eine ideale Gauß-Kette an, in der das Polymer in Kugeln aufgeteilt ist, die durch Federn mit der Ruhelänge l frei drehbar verbunden sind (siehe Abbildung 1.8 a). In diesem Modell lässt sich das MSD eines Einzelsegments (im Modell als Kugel) analytisch berechnen und man erhält [29]:

$$\langle r^2 \rangle_{\text{Rouse}}(\tau) \propto \tau^{1/2}. \quad (1.4.2)$$

Um dieses Modell realistischer zu gestalten kann man die hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen den Kugeln berücksichtigen. Die hydrodynamischen Wechselwirkungen beschreiben

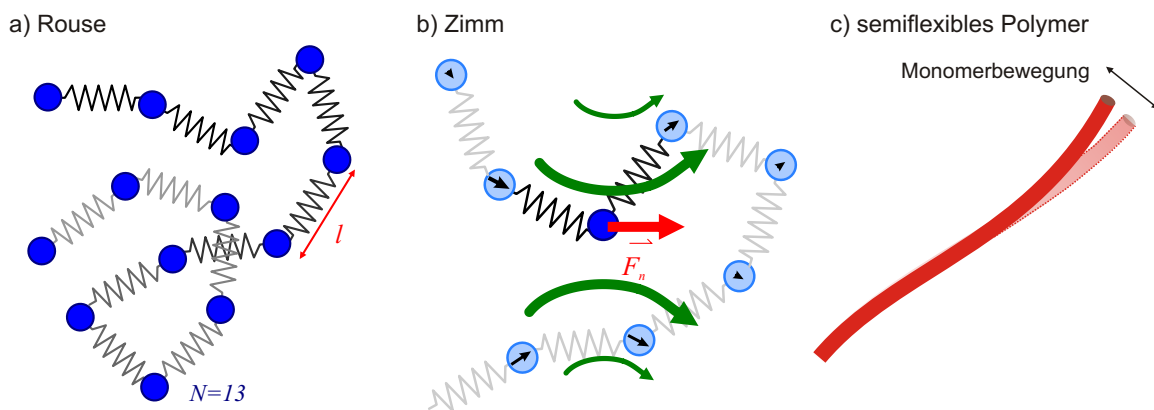


Abbildung 1.8.: Theoretische Modelle für die Berechnung der Polymerdynamik von DNA.

Das Rouse-Modell a) ist das einfachste Modell, es ist aufgebaut aus Kugeln, die über Federn verbunden sind. Das Zimm-Modell b) ist im Vergleich zum Rouse Modell um hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen den Kugeln erweitert. In c) ist ein drittes Modell dargestellt, welches die DNA als semiflexiblen Polymerstrang betrachtet. Bilder a) und b) zur Verfügung gestellt von J. Krieger

eine Kopplung der Bewegungen der einzelnen Polymer-Segmente miteinander. Diese Kopplung erfolgt durch die Lösungsmittel-Moleküle um das Polymer, die durch die Bewegung der Kugeln mitgezogen werden (siehe Abbildung 1.8 b). Dadurch wird eine Bewegung auf räumlich benachbarte Segmente übertragen (grüne Pfeile im Bild), die nicht unbedingt direkt durch Federn verbunden sind. Es ergibt sich das so genannte „Zimm“-Modell, mit dem wiederum ein MSD für einzelne Segmente abgeschätzt werden kann [29]:

$$\langle r^2 \rangle_{\text{Zimm}}(\tau) \propto \tau^{2/3}. \quad (1.4.3)$$

Ein weiteres Modell beschreibt die Segment-Dynamik eines linearen, semiflexiblen Polymers auf Längenskalen unterhalb dessen Persistenzlänge [30, 31]. Die Persistenzlänge gibt an auf welcher Längenskala ein Polymer im Mittel gestreckt vorliegt (siehe Abbildung 1.8 d). Für doppelsträngige DNA liegt dieser Wert bei 50 nm (dies entspricht 150 bp). Für dieses Modell ergibt sich:

$$\langle r^2 \rangle_{\text{semiflex}}(\tau) \propto \tau^{3/4}. \quad (1.4.4)$$

Alle diese Modelle sind streng genommen nur für lineare Polymere gültig und vernachlässigen viele weitere Effekte. Um ein realistischeres Bild der DNA-Dynamik zu bekommen, insbesondere von superhelikalen Plasmiden, sind daher numerische Simulationen notwendig. Solche Simulationen können auch Effekte wie z.B. eine Torsionsspannung des Moleküls berücksichtigen.

1.5. Torsionsspannung und Polymer-Dynamik

Der Einfluss der Torsionsspannung auf die Schwerpunktsbewegungen (translationale Diffusion auf langen Zeitskalen) und Stressantwort der DNA sind bekannt und mit Hilfe von Experimenten und Simulationen gut erforscht [17–19, 32–36]. Der Einfluss der Torsionsspannung auf die interne Dynamik ist noch nicht im Detail geklärt. Die dazu vorhandenen Informationen stammen aus Computersimulationen [36], Experimenten mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) [35], sowie aktuell in den letzten Jahren aus Experimenten mit FCS [32]. Die DLS-Experimente mit superhelikalen DNA-Plasmiden lieferten Informationen über die Rotationsdiffusion und translationale Diffusion des Gesamtmoleküls, wie auch Informationen über schnellere Bewegungen welche als interne Dynamik interpretiert wurden. Diese schnellen Bewegungen wurden als interner Diffusionskoeffizient D_i beschrieben, allerdings konnte kein genaueres Bild über sie gezeichnet werden [17, 18, 35].

Simulationen haben gezeigt, dass Änderungen in der Torsionsspannung die Geschwindigkeit

der DNA Bewegungen beeinflussen. Mit steigender Torsionsspannung werden DNA Bewegungen auf allen Zeitskalen beschleunigt [32, 36]. BD-Simulationen von superhelikalen Plasmiden haben einen Anomaliekoeffizienten zwischen $\alpha = 0,7$ und $\alpha = 0,8$ für die interne Dynamik (kurze Zeitskalen τ im MSD) ergeben [36]. Umlagerungsprozesse der DNA die durch intrinsische Krümmungen eine Ausrichtung erfahren, können durch Torsionsspannung ebenfalls beschleunigt werden. Dies kann dann die Kontaktfrequenz zweier DNA-Stellen erhöhen. Um die Rolle der Chromatindynamik in vitalen Prozessen, wie z.B der Transkription, oder der Replikation zu verstehen, hilft es die Dynamik der DNA selbst zu untersuchen. In einem weiteren Schritt kann dann auch der Einfluss DNA-bindender Proteine, wie etwa von Histonen, auf diese Dynamik zu untersucht werden.

1.6. DNA-Verpackung: Vom Nukleosom zum Chromatin

1.6.1. Das Nukleosom

Eukaryotische Zellen sind in membranbegrenzte funktionelle Einheiten kompartimentiert. Die DNA ist dabei vor und nach der Zellteilung (Interphase) im Zellkern lokalisiert. Durch eine hierarchisch organisierte Verpackung der DNA werden die 2 m DNA, eines haploiden, humanem Chromosomensatz in den verhältnismäßig kleinen Zellkern ($\sim 10 \mu\text{m}$ im Durchmesser) verpackt. Die dabei entstehende Struktur, ein Großkomplex der DNA mit zahlreichen Proteinen, wird Chromatin genannt. Die erste Stufe der Chromatin-Packung der DNA sind die Nukleosomen. In einem Nukleosom sind $\sim 150 \text{ bp}$ DNA in etwa zwei Windungen um einen Proteinkern gewunden.

Der Proteinkern selbst besteht aus Histonen. Diese sind stark basische Proteine, die im Zellkern Komplexe mit der DNA bilden und damit zur Ausbildung der typischen Chromatinstruktur beitragen. Evolutionär betrachtet sind Histone sehr alt und ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich nur marginal zwischen verschiedenen eukaryotischen Organismen. Man spricht in einem solchen Fall von hoch konservierten Proteinsequenz. Histone haben im Vergleich zu anderen Proteinen einen erhöhten Anteil an den Aminosäuren Lysin und Arginin. Die dadurch unter physiologischen Bedingungen gegebene positive Grundladung der Histone prädestiniert sie für Interaktionen mit der negativ geladenen DNA.

Es gibt fünf Histon-Proteinen: H1, H2a, H2b, H3 und H4 (H: Histon). Jeweils zwei Moleküle von H2a, H2b, H3 und H4 lagern sich zu einem achteiligen Komplex (Histonoktamer) zusammen. Oktamer und DNA bilden den so genannten Kernkörper (engl. core particle) des Nukleosoms, der 14 unabhängige DNA-Bindestellen auf seiner Oberfläche aufweist. Sie geben einen spiralförmigen Pfad vor, um den sich die DNA ~ 1.65 Mal windet. Die Bindungen zwischen Histonoktamer und DNA setzen sich zusammen aus Wasserstoffbrückenbindungen

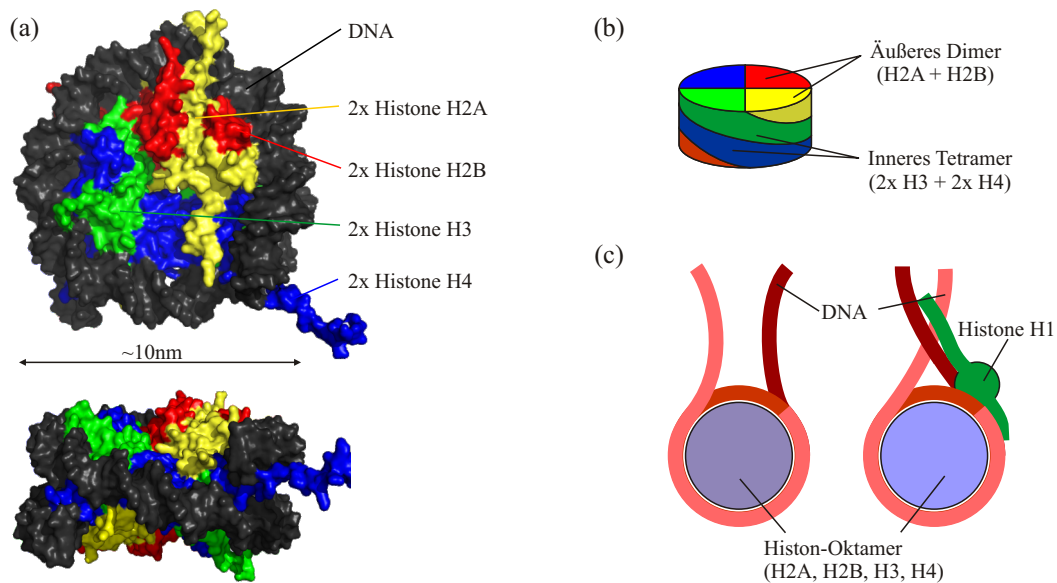


Abbildung 1.9.: Struktur und Organisation eines Nukleosoms. Die in a) gezeigte Struktur eines Nukleosoms basiert auf der Kristallstruktur in [37]. Die Organisation der funktionellen Histon-Oligomere im Histon-Oktamer ist in b) schematisch dargestellt, und c) gibt einen groben Überblick über die Gesamtorganisation eines Nukleosoms. Die Skizze zeigt auch das Histone H1, das die Gesamtstruktur verschließt. Abbildung: zur Verfügung gestellt von J.Krieger [38]

zwischen den Amidgruppen der Proteinkette und den Phosphaten des DNA-Rückgrats, sowie ionischen Bindungen zwischen den positiv geladenen Seitenketten der Histonproteine und der DNA. Durch die Anlagerung der DNA an den Histonkomplex entsteht eine negative Superhelixwindung der DNA [39, 40].

Die Histonproteine bilden im Nukleosom oligomere funktionelle Untereinheiten. Die Histone H2A und H2B lagern sich zu einem äußeren Dimer zusammen und jeweils zwei H3- und H4-Proteine bilden ein im Zentrum des Oktamers liegendes Tetramer ((H3 – H4)₂). Dieses Tetramer bindet die zentralen 60 bp der DNA, die um den Kern gewunden vorliegt. Die zwei Histon-dimere im Komplex (H2A-H2B) binden jeweils 30 bp der äußeren nukleosomalen DNA. Weitere 10 bp binden an den unstrukturierten N-Terminus des Histons H3, welcher über das (H3 – H4)₂ Tetramer hinausragt. Ein weiteres Protein, das Linker-Histon H1, bindet an die in ihrer Länge variablen DNA-Abschnitte (Linker-DNA) zwischen zwei Kernbereichen und bringen sie so räumlich zusammen (Abbildung 1.9 c). Auf diese Weise wird die DNA weiter komprimiert.

1.6.2. Posttranslationale Modifikation von Nukleosomen

Jedes der Kernhistone besitzt zwei funktionelle Domänen. Ein Histonfaltungsmotiv, welches Histon-Histon, sowie Histon-DNA Interaktionen vermittelt, und N- oder C-terminale unstrukturierte

rierte Histondomänen. Diese terminalen Histondomänen der Histone ragen aus dem Nukleosom heraus und interagieren mit der im Nukleosom gebundenen DNA, der Linker-DNA sowie mit angrenzenden Nukleosomen. Sie können posttranslational auf unterschiedliche Weise chemisch modifiziert werden. Diese Modifikationen beinhalten Acetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen sowie Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung. Bis jetzt wurden über dreißig Histonestellen identifiziert, die Ziel chemischer Modifikationen sein können [41]. Die Art und Position der Modifikationen bildet einen "Histon-Code", den David Allis von der University of Virginia postulierte [42]. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifizierungen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben können und somit, z.B. im Rahmen der Genexpression, Einfluss auf die DNA-Zugänglichkeit nehmen [41–44].

1.6.3. Chromatinorganisation

Die Komprimierung der DNA in Nukleosomen und die weitere Komprimierung der Struktur durch das Linkerhiston H1 resultiert in einer Struktur, bei der die Histone nacheinander auf dem DNA-Molekül aufgereiht sind (siehe Abbildung 1.10 a). Nach ihrem Aussehen in Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen von Zellkern-Extrakten spricht man hier von einer Perlenkettenstruktur (engl. beads on a string). Durch diese Packung der DNA wird sie um den Faktor 7 komprimiert [45]. Die Perlenketten-Struktur bildet unter physiologischen Bedingungen eine Sekundärstruktur aus. Dazu windet sie sich um sich selbst und formt eine Art Faser, die aufgrund ihres Durchmessers 30 nm-Faser bezeichnet wird [46]. Ob die 30 nm-Faser allerdings auch *in vivo* als solche vorliegt, ist bisher nicht abschließend geklärt [47, 48].

Über die weitere Bildung von Sekundärstrukturen aus der 30 nm-Faser ist bislang nicht allzu viel bekannt. Für den Phänotyp dieses Kompaktierungsgrades gibt es einige Modelle, von denen sich wiederum auch einige widersprechen (siehe Abbildung 1.10).

Im Solenoidmodell, liegen die benachbarten Nukleosomen aufeinander, die Linker-DNA wird dabei stark gekrümmt. In diesem Fall ist der Nukleosomen-Strang spiralförmig aufgewickelt [51], wobei jede Windung 6 Nukleosomen enthält. Das helikale Schleifenmodell beschreibt eine Struktur des Nukleosomen-Stranges, in der die Linker-DNA zwischen benachbarten Nukleosomen in einer Ebene mit diesen liegt. Die Linker-DNA bildet hier eine Art Fuge zwischen den Nukleosomen, wodurch die Struktur etwas weniger dicht gepackt ist als im Solenoidmodell. Im so genannten Zickzack-Modell überkreuzen sich in der Mitte der Faserstruktur die Linker-DNA-Bereiche zwischen benachbarten Nukleosomen. Auf der DNA benachbarte Nukleosomen sitzen jeweils an gegenüber liegenden Rändern der Faser. Einige experimentelle Befunde bestärken die Existenz des Zickzack-Modells, wobei im Zellkern selbst wahrscheinlich eine Mischung verschiedener Sekundärstrukturen vorliegt [52–54]. Durch die Bildung der 30 nm-Faser wird die

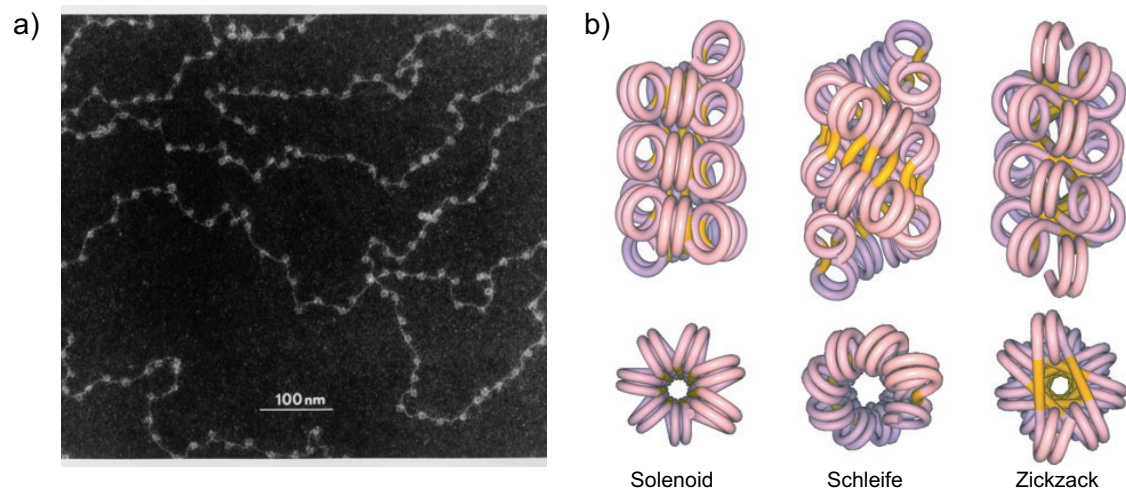


Abbildung 1.10.: Perlenketten-Struktur der Nukleosomen und Chromatin-Modelle der 30 nm-Faser Die Elektronen-mikroskopische Aufnahme in a) zeigt Nukleosomen, die auf einem ds-DNA-Strang gebunden sind und wirken wie aufgereihe Perlen. Diese „Perlenkettenstruktur“ windet sich unter physiologischen Bedingungen um sich selbst und formt eine 30 nm-Faser, für deren Struktur es mehrere Modelle gibt. Bildquelle: Bild a) [49], Bild b) adaptiert von [50].

DNA etwa um den Faktor 40 verkürzt [45].

Die weitere Kompaktierung der DNA geschieht durch DNA-bindende Proteine, die die 30 nm-Faser in Schleifen organisiert, die 20.000-80.000 bp DNA umfassen können [55, 56]. Die genauen Prozesse der weiteren Chromatin-Kompaktierung, sind bis heute nicht im Detail geklärt. Aktuell gibt es Hinweise aus Untersuchungen der räumlichen Organisation des Genoms, die 3-dimensionale funktionelle Domänen weit entfernter Genloci im Chromatin vorschlagen (TAD: topologically associating domains) [57]. Abbildung 1.11 zeigt die verschiedenen Packungsstufen der DNA und den jeweiligen Durchmesser der entsprechenden Struktur.

1.6.4. Chromatinstruktur und Genexpression

In einem Zellkern liegt die DNA zumeist in einer Mischung unterschiedlicher Packungsdichten und -Formen vor. Dies hat wiederum einen Einfluss auf die Genexpression [1]. In der Elektronenmikroskopie lassen sich durch Anfärben des Chromatins hellere weniger dicht gepackte Bereiche (Euchromatin) und dunklere dicht gepackte Bereiche des Chromatins (Heterochromatin) ausmachen. Eine Unterscheidung zwischen den Chromatin-Arten ist auch mit anderen Mikroskopiemethoden möglich. So wurde hierzu z.B. die räumliche Verteilung der Mobilität und der Fluoreszenz-Intensität des Heterochromatin-bindenden Proteins HP1 α untersucht [59]. Das Euchromatin ist die aktivere Form des Chromatins, es wird, im Gegensatz zum Hetero-

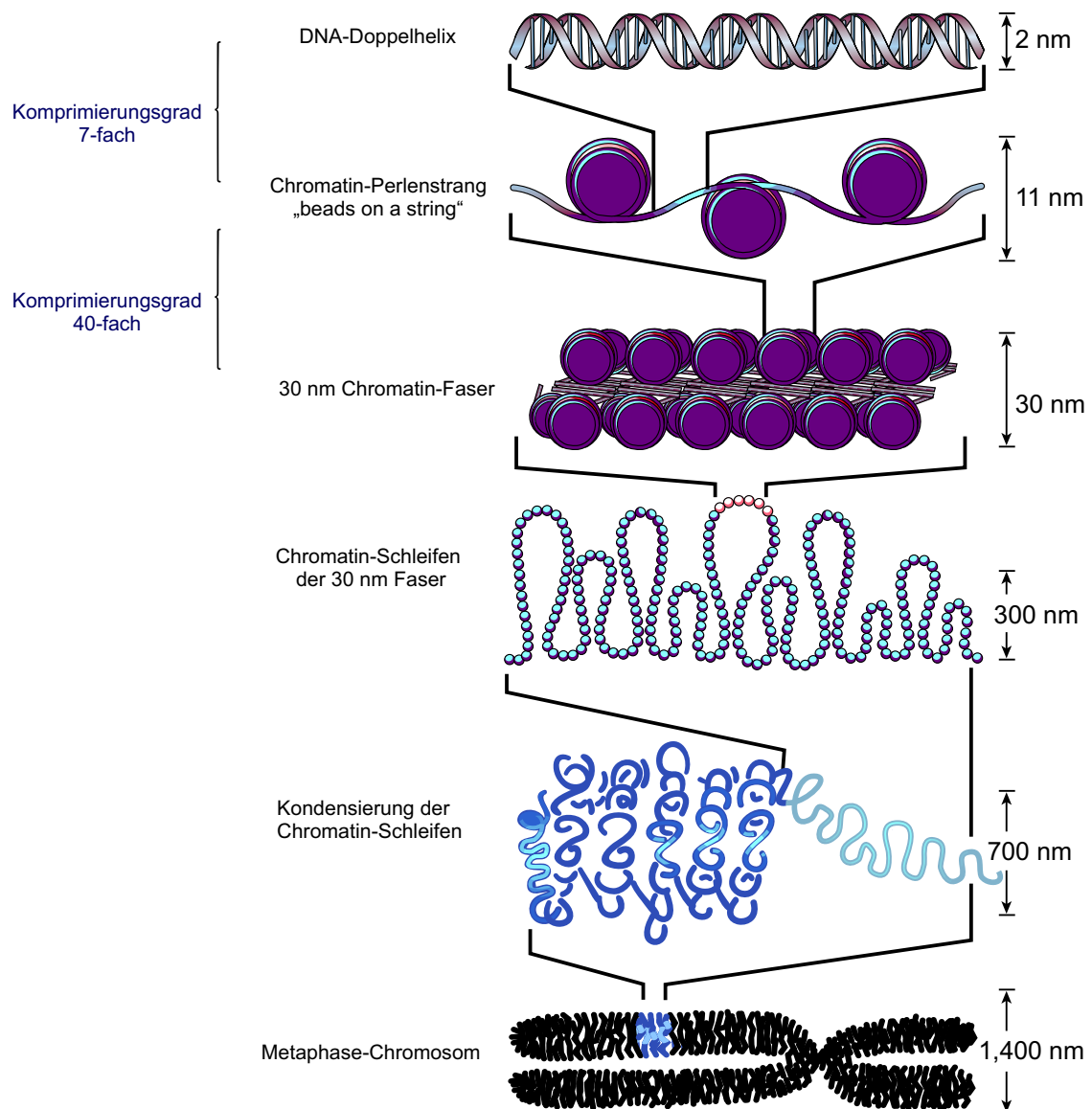


Abbildung 1.11.: Kompaktierungsstufen der DNA in Chromatin. Bild adaptiert aus [58].

chromatin, stark transkribiert. Die Zugänglichkeit der genetischen Information in der DNA für RNA-Polymerasen ist von zentraler Bedeutung für die Lebensfähigkeit einer Zelle. Sie bestimmt welche Informationen zu bestimmten Zeitpunkten freigegeben werden und daher welche Proteine vorliegen. Die Verpackung der DNA kann den Zugang dieser Polymerasen zu gewissen DNA-Abschnitten erschweren oder sogar verhindern und trägt damit auch zur Genregulation bei. Auf kleinerer Ebene müssen zur Transkription auch Histone abgelöst oder verschoben werden um den Zugang zur DNA zu ermöglichen.

1.7. Torsionsspannung im Zellkern

1.7.1. Aufbau und Umsatz von Torsionsspannung im Zellkern

Neben der Verpackung der DNA spielt auch die Torsionsspannung auf dem DNA-Strang eine Rolle in den vielen vitalen Prozessen der Zelle. Torsionsspannung kann in eukaryotischen DNA-Molekülen aufgebaut werden, da sie in funktionelle topologische Untereinheiten aufgeteilt sind. Durch die Verpackung der DNA in Nukleosomen und Interaktionen mit anderen Zellkomponenten, kann entstehende Torsionsspannung nicht wie bei linearer DNA über Drehung des DNA-Moleküls ausgeglichen werden, sondern führt zu superhelikalen Strukturen der DNA. Zwei nebeneinander liegende Nukleosomen bilden hierbei eine gewisse Barriere für etwaige Änderungen des *Writhe* (Wr). Torsionsspannung wird im Zellkern z.B. durch die Verpackung der DNA in Nukleosome aufgebaut. In jedem Nukleosom ist durch die Windung um den Histonkern negative Torsionsspannung gespeichert. Wird das Nukleosom herausgelöst, so hinterlässt es eine negativ superhelikale Windung. Diese Tatsache wird auch Verwindungszahl-Paradoxon [60] genannt (engl. „linking number paradox“). Der Aufbau von Torsionsspannung im DNA Molekül ist in der Zelle stark reguliert, da eine zu starke Torsionsspannung die DNA beschädigen würde. Diese Aufgaben übernehmen vornehmlich Topoisomerasen. Diese Enzyme binden an negativ superhelikale DNA und öffnen das Rückgrat an einem DNA-Einzelstrang des Moleküls. Die Torsionsspannung kann so im DNA Molekül abgebaut werden, da der geöffnete Strang um den noch intakten Strang frei rotieren kann. Die DNA wird dann vom Enzym wieder verschlossen.

1.7.2. Torsionsspannung und Transkription

DNA, die in Nukleosomen verpackt vorliegt, muss z.B. während der Elongationsphase der Transkription, für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden [61, 62]. Hierfür gibt es eine Anzahl an Möglichkeiten im Zellkern. Unterteilen lassen sich diese Mechanismen in proteinvermittelte und solche, die auf den mechanischen Eigenschaften der DNA beruhen. In die erste Kategorie fallen alle Prozesse, in denen Proteine aktiv den Abbau von Nukleosomen fördern, oder ihre Position auf dem DNA-Strang verändern. Hierzu gehören z.B. die Histonchaperone, die am Auf- und Abbau der Nukleosomen beteiligt sind. Hier ist z.B. das Histonchaperon Asf1p zu nennen dessen Rolle in dem Abbau von Nukleosomen nachgewiesen werden konnte [63]. Eine weitere Gruppe von Proteinen, die die Chromatin-Struktur ändern, sind Chromatin-Remodellierungskomplexe. Sie werden unterteilt in Histon-modifizierende Komplexe und ATP-getriebene Komplexe. Die erste Klasse bringt kovalente Modifizierungen an Histonen an, hierzu gehören z.B. die Acetylierung oder Methylierung der N-terminalen Histonreste. Hierdurch

wird die Bindungsaffinität zwischen den Histonen verändert [42, 64]. Die Zweite Klasse der Remodellierungsfaktoren verschiebt ganze Nukleosomen und repositioniert sie an anderer Stelle. Sie bauen Nukleosomen auch ab oder restrukturieren sie, z.B. durch den Austausch einzelner Histone [65].

Ihre mechanischen Eigenschaften haben ebenfalls Einfluss auf die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA. So kommt es durch die thermisch getriebenen Fluktuationen der Linker-DNA, dem so genannten „Atmen“ (engl. DNA-breathing), zu einer spontanen Zugänglichkeit der Nukleosomen-flankierenden DNA [66–70]. Auch mechanische Kräfte wie die Torsionsspannung können die Struktur und Stabilität von Nukleosomen beeinflussen und somit die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA beeinflussen [71–73].

Torsionsspannung entsteht z.B. während der Elongationsphase der Transkription. Hier bildet sich vor dem RNA-Polymerase-Komplex positive Torsionsspannung. Der Polymerase-Komplex schiebt die DNA-Windungen vor sich her, dies führt zu einer positiven Verdrehung des DNA-Strangs (siehe Abbildung 1.12). Die DNA hinter dem Polymerase-Komplex wird durch die Elongationsbewegung negativ verdreht, dadurch sind weniger helikale Windungen im DNA-

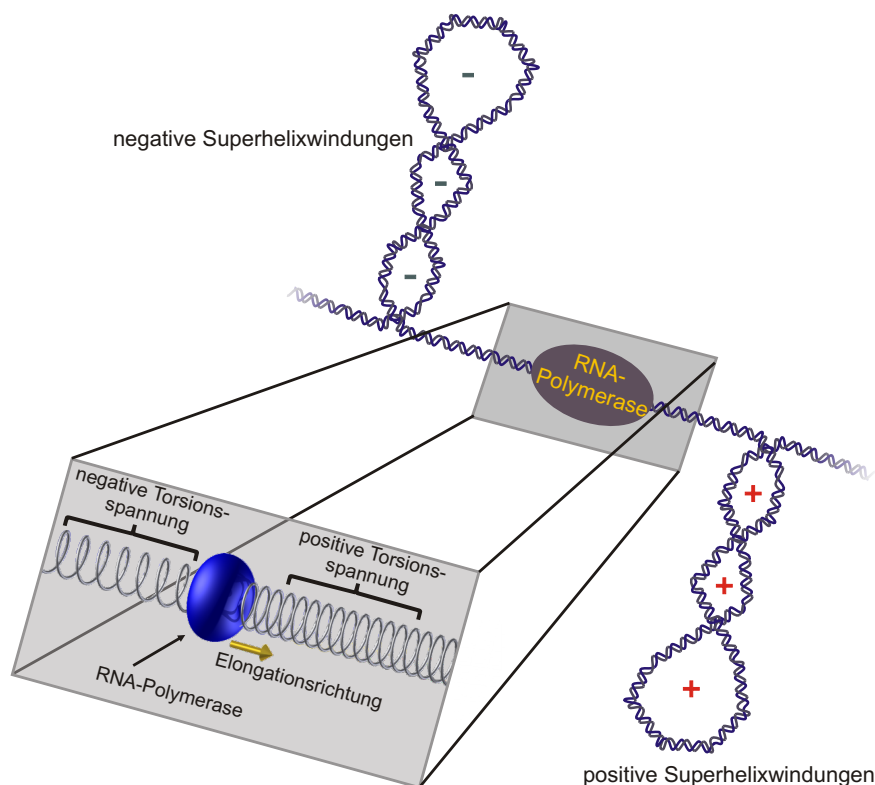


Abbildung 1.12.: Zwillings-Helix-Modell: Änderungen der DNA-Torsionsspannung während der Transkription. Durch die Bewegung der RNA-Polymerase durch die DNA während der Elongationsphase entstehen vor unter hinter dem Enzymkomplex Änderungen der DNA-Torsionsspannung.

Strang als bei relaxierter DNA. Auf diese Art und Weise entsteht um den Polymerase-Komplex ein Bereich entgegengesetzter DNA-Torsionsspannung („twin-helix“-Modell), der sich mit dem Komplex durch die DNA bewegt [74]. Dem Aufbau von transkriptionsinduzierter Torsionsspannung steht dessen Abbau durch Topoisomerasen entgegen. Lange war unklar, ob der Aufbau der Torsionsspannung während der Transkription schneller geschieht als ihr Abbau, oder umgekehrt. Hierzu gibt es einige Studien, die die Existenz von uneingeschränkter, Transkriptions-abhängiger Torsionsspannung in eukaryotischen Zellen nachweisen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass der RNA-Polymerase-Komplex sich schnell genug auf der DNA entlang bewegt um positive Torsionsspannung vor sich aufzubauen, die von den Topoisomerasen der Zelle nicht vollständig ausgeglichen werden kann [75–78]. Im Bezug auf die Stabilität der Nukleosomen in Abhängigkeit der Änderungen der DNA-Torsionsspannung während der Transkription konnte gezeigt werden, dass die Nukleosomen vor der Polymerase verdrängt werden und sich hinter der Polymerase wieder neu bilden [79–81]. Kürzlich veröffentlichte Kraftspektroskopie-Experimente von Sheinin et al. (2013) [82] haben Hinweise auf eine Destabilisierung von Nukleosomen durch positive Torsionsspannung gegeben. In diesen Messungen konnten allerdings keine direkten Informationen über den Zustand bzw. einem möglichen Zerfall des Histonoktamers gewonnen werden, da hier nur das Abrollen der DNA vom Nukleosom beobachtbar ist.

1.8. Fragestellungen und Struktur dieser Arbeit

In dieser Dissertation wurde der Einfluss der Superhelizität von DNA auf zwei unterschiedliche Prozesse untersucht: zum einen auf die interne Dynamik von DNA, also die Mobilität von Segmenten im Polymer und zum anderen auf die Stabilität von Nukleosomen, die auf DNA mit unterschiedlicher Superhelizität rekonstituiert wurden. Grob gliedert sich die Arbeit in drei Hauptblöcke. Im Kapitel 2 werden alle verwendeten Methoden und Materialien detailliert erklärt. Danach fassen die Kapitel 3 und 4 die Ergebnisse zu den erwähnten zwei untersuchten Prozessen zusammen. In Kapitel 5 werden die Ergebnisse schließlich nochmals zusammengefasst, diskutiert und mit anderen Studien verglichen.

1.8.1. Einfluß von Chromatin/Verpackung der DNA auf interne Dynamik superhelikaler DNA

Um den zeitlichen Ablauf vitaler Zellprozesse auf DNA-Ebene zu verstehen, ist es wichtig sich mit der Dynamik von Chromatin bzw. der DNA als Polymer zu befassen. In dieser Arbeit wurden dazu die Bewegungen und Fluktuationen der Konformation eines helikal gewundenen Plasmids

auf unterschiedlichen Zeitskalen untersucht.

Für das Verständnis der Rolle der Chromatindynamik in vitalen Prozessen, wie z.B. der Transkription, oder der Replikation, ist es weiterhin wichtig die Dynamik der DNA unter Einfluss DNA-bindender Proteine, wie etwa von Histonen, zu untersuchen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Dynamik superhelikaler DNA-Plasmide untersucht. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Plasmide (siehe Abschnitt 2.6) verwendet, die mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (siehe Abschnitt 2.11) untersucht wurden. Neben dem Einfluss der Torsionsspannung (siehe Abschnitt 3.2), wurden äußere Einflüsse wie Ionenstärke (siehe Abschnitt 3.3) und Viskosität des Mediums (siehe Abschnitt 3.4) auf die interne DNA-Dynamik vermessen. Schließlich wurde der Einfluss von Nukleosomen auf die interne DNA-Dynamik verfolgt (siehe Abschnitt 3.5).

1.8.2. Einfluss der DNA-Torsionsspannung auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen

Die in Nukleosomen verpackte DNA muss z.B. während der Elongationsphase der Transkription, für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden (siehe Abschnitt 1.7.2). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss die Torsionsspannung der DNA auf die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA hat. Hierzu wurden Änderungen in der Struktur (siehe Abschnitt 4.2) und der Stabilität von Nukleosomen (siehe Abschnitt 4.3) in Abhängigkeit der Torsionsspannung untersucht. Als Modell wurden Plasmide genutzt, deren Torsionsspannung variiert (siehe Abschnitt 2.4) und auf denen Histonoktamere zu Nukleosomen rekonstituiert wurden (siehe Abschnitt 2.7.2). Der Einfluss der Torsionsspannung auf die Nukleosomenstruktur wurde mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht (siehe Abschnitt 2.9). Hierbei konnte die Nukleosomenstruktur direkt abgebildet werden. Die Stabilität der Nukleosomen wurde später mit fluoreszenzmarkierten Histonen (siehe Abschnitt 2.7.1) mittels FCS gemessen (siehe Abschnitt 2.11). Mit unterschiedlich markierten Histonoktameren (H2A-markierte Oktamere und H4-markierte Oktamere) sollte der Ablauf des Zerfalls der Nukleosome beobachtet werden. Hierbei wurde die Bindung der DNA um die Histonoktamere durch gezielte Erhöhung der Salzkonzentration destabilisiert.

Teil II.

Material & Methoden

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Der Reinheitsgrad der Chemikalien war mit p.A. angegeben. Für das Herstellen von Puffern und anderen Lösungen wurde Wasser verwendet, welches zuvor durch eine Reinstwasser-Anlage (Seralpur PRO 90-CN, Seral, Ransbach-Baumbach) aufbereitet und gefiltert wurde. Alle Puffer die für die Rasterkraft-Mikroskopie oder die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie verwendet wurden, waren zuvor mit einem Filter mit einer Porengröße von 0,02 μm (Anotop 10, Whatman International Ltd., Maidstone, England) gefiltert um eventuell verbleibende Verunreinigungen zu eliminieren. Um die Adsorption der fluoreszent markierten Proben an Gefäßoberflächen zu reduzieren, wurden Silikon-beschichteten Mikro-Reaktionsgefäßen (low-binding Reaktionsgefäße, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) und Pipettenspitzen (TipOne RPT, Starlab GmbH, Ahrensburg) verwendet.

2.1.2. Geräte

Soweit in dieser Arbeit nicht anders angegeben wurden folgende Labor- und Messgeräte verwendet:

- **Absorptionsspektrometer:**
Cary 4E UV-Visible Spektrometer, Varian, Mulgrave, Australien
- **Fluoreszenzspektrometer:**
SLM-AMINCO 8100 Fluoreszenzspektrometer, SLM, Urbana, USA
- **Küvetten für die Spektrometrie:**
SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten, Hellma, Mülheim

- **Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie (FPLC):**
Amersham GP250, Pharmacia, Uppsala, Sweden
- **Fraktionssammler für die FPLC:**
FRAC-100, Pharmacia, Uppsala, Sweden
- **Trennsäule für die FPLC:**
Superdex 200, GE Healthcare, Uppsala, Schweden
- **Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC):**
Crystal 200 High Pressure Systems, Unicam, Cambridge, UK
- **Trennsäule für die Aufreinigung der Plasmide:**
RP 18 HPLC column, Sigma-Aldrich, Steinheim
- **PCR-Block:**
Thermocycler PTC-200, MJ Research, Waltham, USA
- **Gelelektrophorese:**
Gelkammer TV21, CTI GmbH, Idstein
- **Spannungsquelle für Gel-Elektrophoresen:**
E400, Consort, Turnhout, Belgien
- **Geldokumentation der Fluoreszenzgele:**
Typhoon Gel Scanner, Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare, Freiburg
- **Tischzentrifuge:**
Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
- **Varifuge:**
3.OR, Heraeus, Buckinghamshire, England
- **Großzentrifuge:**
Sorvall RC-5C, Dupont, Newton, USA
- **Rasterkraftmikroskop (SFM):**
Nanoscope IIIa, Digital Instruments Inc., Santa Barbara, USA
- **SFM-Siliziumspitzen:**
PPP-NCH, Nanosensors, Nanoworld Holding AG, Neuchatel, Schweiz

- **Viskositätsmessungen:**

Ubbelohde Kapillarviskosimeter (Kapillardurchmesser: 0.47 mm, Umrechnungsfaktor $K = 0.002931 \text{ mPa} \cdot \text{s/s}$) mit VisoClock zur automatisierten Zeitmessung, Beides: Schott Instruments (heute SI Analytics)

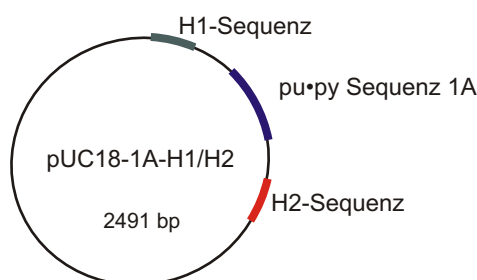
2.1.3. Plasmid-DNA

Für die Experimente wurden zwei unterschiedliche Plasmide verwendet, der Standardvektor pUC18 [83], sowie das modifizierte pUC18-Plasmid pUC18-1A-H1/H2-E (siehe Abbildung 2.1). Die Bezeichnung 1A bezieht sich auf eine Insertion in der ClaI-Restriktionstelle. Dieses Plasmid stammt aus einer Reihe von Plasmiden, die von Pfannschmidt und Langowski [84] und Bussiek *et al.* [85] für Studien zum Einfluss intrinsischer Krümmungen auf DNA-Dynamik und Struktur hergestellt und untersucht wurden [84, 85]. Das Plasmid pUC18-1A-H1/H2-E wurde in dieser Arbeit verwendet, da es zwei einklonierte Purin-Pyrimidin-Sequenzen (*pu•py*) enthielt (H1, H2), über die fluoreszente Markierungen mittels Triplex-bildender Oligonukleotide (TFO: triple helix forming oligonucleotide) (TFO-Markierung siehe Abschnitt 2.6) möglich sind (siehe Abbildung 2.1). Die Sequenz 1A bezeichnet eine 92 bp lange Insertion aus repetitiven Blöcken der Basenabfolge 5′ GACAGGACT 3′.

Eine genaue Beschreibung der TFO-Sequenzen und ihren Eigenschaften, sowie die Charakterisierung der Plasmide sind in folgenden Arbeiten beschrieben: [84–87].

H1-Sequenz: Basenabfolge

5′-CATATAAGGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAGGG- 3′
3′-GTATATT CCTCC TTCCTT CCTT CCTT CCTCCC- 5′



H2-Sequenz: Basenabfolge

5′-CTATAGAGAAGAGAGAGGAGAGAGAGGGAAG- 3′
3′-GATATCTC TT CTCTCTCC TCTC TCT CCCTTC- 5′

Abbildung 2.1.: Plasmid pUC18-1A-H1/H2: markiert ist die *pu•py*-Sequenz (blau), sowie die TFO-Bindestellen H1 (grün) und H2 (rot).

2.2. Mikrobiologische Verfahren

2.2.1. Bakterien

Um die benötigte Plasmid-DNA zu vermehren wurden kompetente *Escherichia coli* Bakterien der Sorte NovaBlue (DE3) verwendet. Durch eine Mutation im Bakterien-eigenen DNA-Reparaturprotein *recA* ist in diesem Bakterienstamm die homologe Rekombination verhindert, wodurch die Bildung von Konkatalamern verhindert wird (ein Polymer aus Wiederholungen der Plasmidsequenz).

2.2.2. Transformation

Für die Vermehrung der verwendeten Plasmide musste zunächst eine Transformation der kompetenten *E. coli* Bakterien vorgenommen werden. Die Transformation dient der Einschleusung des zu vermehrenden Plasmids in das Wirtsbakterium. Sofern die eingeschleusten Plasmide einen Replikationsstartpunkt haben, der vom Wirt erkannt wird, werden sie von ihm repliziert.

Für die Transformation von kompetenten NovaBlue-Bakterien wurde ein Aliquot Zellen (50 µl) auf Eis aufgetaut. 1 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde mit den aufgetauten Zellen vermischt. Diese Suspension wurde 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend für 90 s auf 42°C im Wasserbad erhitzt. Dieser Hitzeschock fördert die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zelle. Die Probe wird sofort danach für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 750 µl SOC-Medium zugegeben und die Probe wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Inkubationsphase, werden die Antibiotikaresistenzen aufgebaut und die Zellwand repariert. Etwa 100 µl der Suspension wurde auf Selektivagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3. Molekularbiologische und biochemische Verfahren

2.3.1. Plasmidfermentation

Um die transformierten Bakterien zu vermehren wurden Plasmidfermentationen durchgeführt. Hierzu wurden 10 ml eines LB-Mediums mit der entsprechenden Menge an Ampizillin verstetzt und mit einem Klon der transformierten Bakterien von einer Selektivagarplatte inokuliert und für ca. 8 – 10 h bei 37°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Die optische Dichte der Bakteriensuspension betrug ca. $OD_{600} = 1$. Diese Vorkultur wurde entweder für die Analyse der Transformanten oder aber für die Herstellung größerer Mengen an Plasmid-DNA verwendet. Hierzu wurden 500 – 1000 ml LB-Medium mit einer Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C

auf einem Rundschtüttler inkubiert. Die Bakterien wurden dann in einer Zentrifuge für 15 min bei $6000 \times g$ pelletiert.

2.3.2. Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation diente der Aufreinigung kleiner Plasmidmengen zur Analyse ihrer Sequenz. Generell wurden dazu Kits der Firma Qiagen benutzt, die Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Zellpellett aus der Fermentation der Bakterien, wird in einem Natriumhydrogen-Puffer (NaOH) resuspendiert, der Natriumdodecylsulfat (SDS) und RNase A enthält. Dieser Puffer bewirkt die Lyse der Zellen, sowie die Denaturierung der genomischen DNA, der Proteine und der Plasmide. Der pH-Wert des Lysats wird neutralisiert. Im nächsten Schritt werden Proteine, chromosomale DNA sowie Zellwandbestandteile ausgesalzen, sie präzipitieren und lassen sich abzentrifugieren. Die renaturierte Plasmid-DNA verbleibt im Überstand und wird bei pH7,5 und unter der Wirkung chaotroper Salze an eine Kieselgelmatrix gebunden (QIAprep-Filter). Die gebundene DNA wird schließlich bei geringer Salzkonzentration und durch Zentrifugation mit TE-Puffer eluiert.

2.3.3. Maxipräparation

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurden Maxipräparationen durchgeführt. Hierzu wurden 500 ml oder 1 l Bakterienkulturen, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, hochgezüchtet. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde das QIAfilter Maxi Kit der Firma QIAGEN verwendet. Die ersten Schritte der Isolation verlaufen wie in Abschnitt 2.3.2 bereits beschrieben. Im Unterschied zur Minipräparation von Plasmid-DNA, wird der erhaltene Überstand mit der Plasmid-DNA auf eine Anionen-Austausch-Säule gegeben. Bei geringer Salzkonzentration und geeignetem pH-Wert bindet die Plasmid-DNA an die Säule und wird dann bei einer mittleren Salzkonzentration gewaschen, um verbleibende Proteine und RNA-Moleküle zu entfernen. Die Eluation der Plasmid-DNA erfolgt unter hohen Salzkonzentrationen. Die Plasmid-DNA wird nach der Aufreinigung mittels Isopropanolfällung gefällt und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

2.3.4. HPLC-Aufreinigung

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie HPLC (high performance liquid chromatography). Durch diese Methode lassen sich Plasmide unterschiedlicher Größe oder Topologie voneinander trennen und isolieren. Verwendet wurde hier die Umkehrphasen-Chromatographie-Methode nach Kapp und Langowski [88]. Hierzu wurde

die Umkehrphasen-Säule RP18 (RP: reverse phase) der Firma Merck verwendet. Diese wurde zunächst mit einem Puffer (Puffer A) äquilibriert. Dieser Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,2 M NH_4 -Acetat (pH 6,6), 10% DMSO, 0,1 mM EDTA. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte über einen Gradienten von Puffer B (40% (v/v) Acetonitril, 10% (v/v) DMSO, 0,1 mM EDTA). Der Gradient wurde über 100 min von 0% bis 40% (Fließrate 1 ml/min) Puffer B aufgebaut. Die Fraktionen des Eluates wurden über diesen Zeitraum jeweils über 2 min gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden Gel-elektrophoretisch untersucht (siehe Abschnitt 2.5.1) und nur diejenigen mit den gewünschte DNA-Topologien wurden unter Zugabe von 5 mM MgCl_2 sowie einem Volumen Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde mittels Zentrifugation pelletiert und mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen um Salzreste zu entfernen. Die DNA wurde nach der Evaporation des restlichen Alkohols in TE-Puffer aufgenommen. Größere Mengen an DNA wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die hier verwendeten Plasmidtopoisomere mit negativen Torsionsspannungen, wurden von Frau Maria Mildenerberger hergestellt und aufgereinigt.

2.4. Herstellung von Plasmid-DNA Topoisomeren

2.4.1. Relaxierung negativ superhelikaler Plasmide

Um größere Mengen an relaxierten Plasmiden herzustellen wurden native (negativ superhelikale) Plasmide mit Topoisomerase I versetzt. Um eine vollständige Relaxierung der Probe auch in einem größeren Probenvolumen zu gewährleisten, wurden 10 U Topoisomerase I pro 1 μg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Relaxierung erfolgte über Nacht bei 37°C . Die Proben wurde vor der weiteren Aufreinigung (durch Phenolfällung), mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre vollständige Relaxierung kontrolliert. Nach der Phenolfällung wurde die DNA nochmals mit einem Volumen Isopropanol und 5 mM MgCl_2 gefällt, durch Zentrifugation pelletiert und anschließend mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen um Phenolreste zu entfernen. Nach der Evaporation des restlichen Ethanols wurden die Proben in TE-Puffer aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.4.2. Herstellung und Aufreinigung negativ superhelikaler Topoisomere

Um eine mittlere negative Torsionsspannung auf den untersuchten Plasmiden zu erzeugen wurde die Topoisomer-Herstellung und Auftrennung nach Kapp und Langowski [89] durchgeführt. Hierbei wird die Torsionsspannung verändert, indem native (negativ superhelikale) Plasmide mit bestimmten Mengen des Interkalators Ethidium-Bromid (EtBr) versetzt und mit Topoisomerase I relaxiert werden. Der Interkalator lagert sich aufgrund seiner planaren Struktur zwischen den

Basen ein und führt so zu einer Vergrößerung der Distanz benachbarter Basen. Dies führt zu einer Unterwindung der DNA, die bei der Relaxierung des Plasmid-Moleküls erhalten bleibt. Die anschließende Deaktivierung der Topoisomerase und die Entfernung des Ethidium-Bromid (EtBr) durch die Aufreinigung der DNA führt zu der Bildung von Plasmid-Topoisomeren mit negativer Torsionsspannung, deren Stärke von der Menge des verwendeten Interkalators abhängt. Die Plasmid-DNA wurde mit Ethidium-Bromid in einem Gewichtsverhältnis von 0,035 (Ethidium-Bromid:DNA) versetzt. Der dabei verwendete Puffer war aus folgenden Komponenten zusammengesetzt: 50 mM Tris · HCl (pH 8), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM EDTA und 60 µg/ml BSA (bovines Serumalbumin). Zu diesem Probenansatz wurde Topoisomerase I in einer Konzentration von 1 U für jeweils 10 µg Plasmid-DNA zugesetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurde zunächst eine Phenolysierung durchgeführt, dies führt zur Deaktivierung des Enzyms und zur Ausfällung des Proteinanteils und der Anreicherung im phenolischen Teil des Ansatzes. Durch anschließende Zentrifugation wird die DNA im wässrigen Anteil der Probe angereichert und lässt sich sauber von dem Proteinanteil trennen. Um eine möglichst saubere DNA-Probe zu erhalten, wurde die Phenolysierung des wässrigen Anteils dreimal durchgeführt. Mittels Isopropanol-Prezipitation des wässrigen Anteils wurde die DNA gefällt, zentrifugiert (pelletiert) und anschließend durch Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol von Phenol- und Salzresten befreit. Für die Resuspension der DNA wurde TE-Puffer verwendet. Die DNA-Topoisomere wurden mittels HPLC aufgetrennt (siehe hierzu Abschnitt 2.3.4). Die Topoisomere wurden mittels Methanolgradient aufgetrennt.

2.4.3. Herstellung und Aufreinigung positiv superhelikaler Topoisomere

Die positive Superspiralisierung wurde auf nativen Plasmiden (negativ superhelikalen PUC 18 Plasmiden) induziert, indem die Plasmide unter DNA-Helix-überwindenden Bedingungen enzymatisch relaxiert wurden. Für die Überwindung der DNA-Moleküle wurde 50 mM CaCl₂ verwendet. Die Überwindung der DNA-Helix erfolgt durch die Bindung der divalenten Kationen an das positiv geladene Phosphatrückgrat. Die Distanz zwischen den benachbarten Phosphatgruppen wird durch die Anlagerung der divalenten Kationen verringert, wodurch die Helix überwunden und kompaktiert wird. Die Relaxierung der so überwundenen DNA-Plasmide wird wieder durch den Zusatz von Topoisomeras I erreicht. Nach dem Entfernen des CaCl₂ Überschusses durch Dialyse wird die Überwindung des Moleküls in positive Superspiralisierung überführt. Die dabei maximal erreichbare Anzahl superhelikaler Windungen ist abhängig von der Größe und Überwindung des Ausgangs-Plasmids und entsprechend auch von der Konzentration divalenter Kationen [90]. Für einen Plasmidansatz von 30 µg wurden 20 U Topoisomerase I

(Weizenkeim-Topoisomerase I, M2851, Promega, Mannheim) eingesetzt. Der Probenansatz hatte ein Endvolumen von 500 μl . Hierzu wurden 250 μl einer 100 mM CaCl_2 Lösung (in TE-Puffer), zu der entsprechenden Plasmidlösungsmenge gegeben und eventuell fehlendes Volumen vor der Zugabe der Topoisomerase I mit TE-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden 36 h bei etwa 0 °C (auf Eis) relaxiert. Die Topoisomerase wurde durch Phenolfällung deaktiviert und aus der Probe entfernt. Eine anschließende Isopropanolfällung des wässrigen Überstands und anschließendem Waschen des DNA-Pellets mit 70%igem Ethanol entfernte Phenol- und Salzreste. Das trockene DNA Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen. Mit einem anschließendem Gel-Shift-Assay in Agarosegelen mit und ohne Zusatz von Chloroquin wurde die Stärke der positiven Superspiralisierung bestimmt.

2.5. Elektrophoresen

2.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe oder auch unterschiedliche Topoisomere eines Plasmid-Moleküls auftrennen. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld durch ein Agarosegel. Die Gelform der Agarose, die durch Erhitzung und Abkühlung der Agarose/Puffer-Lösung entsteht bildet eine vernetzte Matrix mit bestimmter Porengröße. Letzteres lässt sich durch die verwendete Menge an Agarose verändern.

Für die Plasmid-Analysen wurden 1%ige (Gewichtsprozent) Agarosegele verwendet. Hierzu wurden die entsprechende Menge an Agarosepulver in einfachen TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA pH 8) eingewogen. Die aufgetragenen DNA-Proben enthielten mindestens 100 ng Plasmid-DNA und 3 μl fünffach konzentrierten Ladepuffer (25 mM Tris/HCl (pH 7), 150 mM EDTA, 0,05% Bromophenolblau (w/v), 25% Glycerin). Die elektrische Feldstärke während der Auftrennung betrug 7 – 9 V/cm.

Superhelikale Plasmide, die sich in ihrer Superspiralisierung unterscheiden, also Topoisomere ein und desselben Plasmids sind, lassen sich im Agarosegel voneinander trennen. Jede superhelikale Überwindung der DNA führt zu einer leichten Kompaktierung des gesamten Moleküls. Im Agarosegel spalten sich die Topoisomere stufenweise mit steigenden Superhelixwindungen auf, je kompakter das Plasmid, desto schneller läuft es im Gel [91].

2.5.2. Chloroquingele

Die Auftrennung hoher superhelikaler Dichten oder die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Torsionsspannung ist im normalen Agarosegel nicht möglich. Um zwischen den beiden Arten von Torsionsspannung zu unterscheiden wird der Interkalator Chloroquin in variablen Mengen dem Gel und auch dem Laufpuffer zugesetzt. Chloroquin bindet aufgrund seiner planaren Struktur zwischen den DNA-Basen und entwindet so die DNA-Doppelhelix leicht. Die Superhelixdichte wird auf diese Art proportional zur eingesetzten Chloroquinmenge herabgesetzt, die Verwindungszahl δLK wird aber nicht verändert. Die Auftrennung der Topoisomere erfolgt meist im Vergleich mit einem Standard aus Topoisomeren bekannter Verwindungszahl. Positive

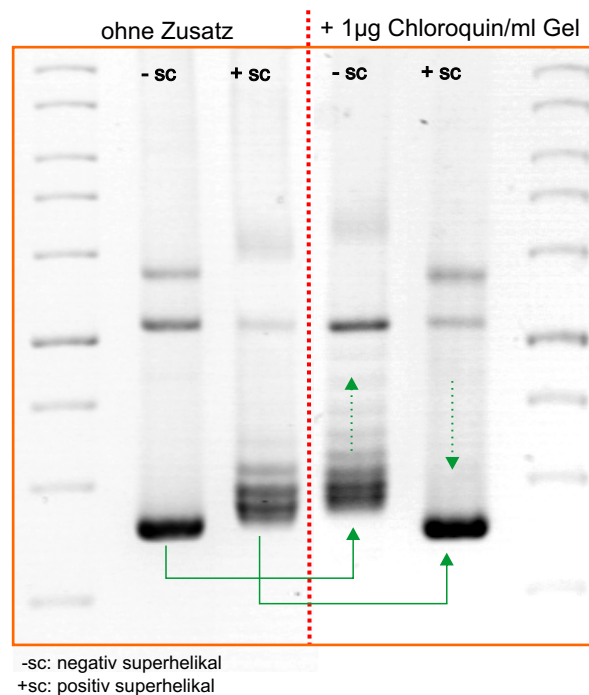


Abbildung 2.2.: Unterscheidung der Plasmid-Torsionsspannung im Agarosegel Im linken Teil des Gelbildes ist ein normales 1%iges TAE-Gel gezeigt. Es wurde mit negativ superhelikalen pUC18-Plasmiden mit der nativen Torsionsspannung von $\sigma = -0.046$ (-sc) und rechts daneben mit positiv superhelikalen Plasmiden, mit einer Torsionsspannung von $\sigma = 0.031$ beladen. Die rechte Seite des Gelbildes zeigt ein Gel mit Chloroquinzusatz ($1 \mu\text{g/ml}$). Wie durch die grünen Pfeile in der rechten Hälfte des Bildes indiziert, läuft die negativ superhelikale Probe etwas weiter oben im Gel als die positiv superhelikale Probe. Der Zusatz des Chloroquins führt zu einer Überwindung der DNA und so wird der Unterwindung der negativ superhelikalen DNA entgegen gewirkt. Die Probe trennt sich dadurch außerdem nach der Anzahl der Topoisomere die in der Ausgangsprobe vorhanden waren auf. Die positiv superhelikale Probe wird durch eine weitere Überwindung der DNA durch die Interkalation von Chloroquin stärker kompaktiert und läuft weiter unten im Gel.

und negative Torsionsspannung lassen sich im Chloroquingel unterscheiden, da die Entwindung der DNA-Doppelhelix durch das Chloroquin der Überwindung des positiv superhelikalen Plasmids entgegenwirkt. Positiv superhelikale Plasmide zeigen im Chloroquingel, im Vergleich zum normalen Agarosegel, eine Verschiebung nach oben im Gel (siehe Abbildung 2.2 rechts).

Für die Analyse der positiv superhelikalen Plasmid-DNA-Proben wurde 1 µg Chloroquin pro 1 ml Agarosegel und Laufpuffer eingesetzt eingesetzt. Die Stärke des Agarosegels, sowie die angelegte Feldstärke entsprachen denen in Abschnitt 2.5.1.

2.6. Sequenzspezifische Fluoreszenzmarkierung von superhelikaler DNA

2.6.1. Markierung mittels triplexbildenden Oligonukleotiden (TFOs)

Die Fluoreszenzmarkierung der superhelikalen Plasmide (pUC18-1A-H1/H2-E) wurde mittels Triplexbildung zwischen einer Homopurin•Homopyrimidin-Sequenz (*pu•py*) und der entsprechenden Plasmidsequenz erreicht. Die einzelsträngige DNA, die im weiteren als TFO (triplexbildenden Oligonukleotide) bezeichnet wird, bindet dabei sequenzspezifisch über Hoogsten-Basenpaarung (Hoogsten-Basenpaarung gekennzeichnet mit ×, Watson-Crick Basenpaarung gekennzeichnet mit •) in der großen Furche der DNA-Doppelhelix. Je nach Beschaffenheit der Sequenz kann sie parallel oder antiparallel an die komplementäre DNA binden. Pyrimidin-reiche TFO's binden hierbei parallel zur DNA-Sequenz, es entstehen folgende Basenpaarungen: T×A•T und C×G•C. Purin-reiche TFO's binden antiparallel mit den folgenden Basenpaarungen: G×G•C, A×A•T sowie T×A•T [92].

Um superhelikale Plasmide zu markieren muss man eine *pu•py*-Sequenz in das Plasmid einklonieren, an welche dann die triplexbildenden Oligonukleotide binden, die dann wiederum einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Die Bindung der TFO's an die Doppelhelix ist nur in leicht sauren Bedingungen (pH5) stabil, da die Cytosine der TFO's protoniert sein müssen um eine Hoogsten-Basenpaarungen mit der DNA-Doppelhelix einzugehen [93, 94]. Um die Bindung der TFO's an die Doppelhelix über einen weiten pH-Bereich zu stabilisieren, wird an ein Ende des Oligonukleotids (5'-Phosphat) ein Psoralen-Molekül angehängt. Dieses interkaliert neben der *pu•py*-Sequenz in die DNA-Doppelhelix und wird durch UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 350 nm kovalent gebunden [92, 95]. Durch diese Reaktion wird das TFO in der DNA stabil verankert. TFO's gehen bevorzugt eine Bindung mit Pyrimidinen ein, die im entsprechenden DNA-Strang folgend vorliegen: 5'-TpA-3' [96]. An das freie Ende des TFO's kann z.B. ein Fluorophor gebunden werden.

a)

H2-Sequenz: Basenabfolge

5'-CTATAGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGGGAAG-3'
 3'-GATATCTC TT CTCTCTCC TCTC TCT CCCTTC-5'

b)

TFO4: Aufbau

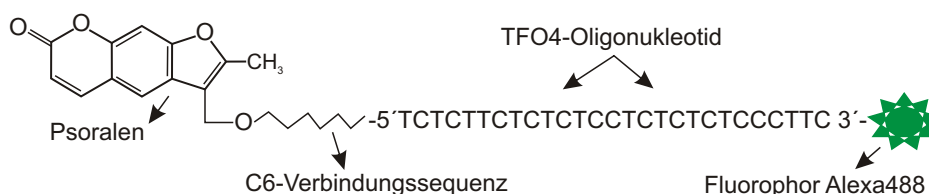


Abbildung 2.3.: TFO-Aufbau am Beispiel des TFO4 (b), Basenabfolge der H2-Sequenz (a).

Die in dieser Arbeit verwendete Plasmide enthielten zwei Bindestellen für TFO's (siehe Abschnitt 2.1.3). Für die fluorezente Markierung wurde das TFO4 verwendet, welches spezifisch an die H2-Sequenz im Plasmid bindet (siehe Abbildung 2.3). Die Synthese, chemische Markierung, sowie die Aufreinigung des TFO4 wurden von der Firma IBI-Oligo durchgeführt und nach Erhalt auf ihre Sauberkeit im Agarosegel überprüft. Die TFO's waren am 5'-Phosphat-Ende über eine $(\text{CH}_2)_6$ -Gruppe mit einem Psoralen-Molekül verbunden. Das 3'-OH-Ende des Oligonukleotids war mit dem Fluorophor Alexa488 verbunden.

Für die Bindereaktion wurde die Plasmid-DNA (pUC18-1A-H1/H2-E) in einer Konzentration von 250 nM mit einem 20fachen Überschusses des TFO's bei pH5 inkubiert. Während der Inkubation kommt es zur spezifischen Hybridisierung zwischen dem TFO4 und der entsprechenden *pu•py*-Sequenz. Ein Reaktionsansatz enthielt: 160 nM Plasmid-DNA, 3,2 μM TFO4, 0,5% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH5, 50 mM MgCl_2 . Der Ansatz wurde in einem PCR-Block auf 75 °C erhitzt und schrittweise innerhalb von 60 min auf 20 °C heruntergekühlt. Direkt im Anschluss wurde der Ansatz mit einem selbstgebauten UV-Strahler (siehe Abschnitt 2.6.2, mit Intensitätsregler und Probenhalterung, für 10 sec bestrahlt. Alternativ kann auch das monochromatische Licht in einem Fluoreszenz-Spektrometer verwendet werden.

2.6.2. Bau eines UV-Crosslinkers für die TFO-Markierung

Die Bindung von Psoralen an DNA erfolgt über die Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm. Dafür wurde eine Bestrahlungsapparatur selbst gebaut. Abbildung 2.4 a) zeigt den Aufbau der Apparatur. Vier Metallschienen (30 mm cage system, Thorlabs, New Jersey,

USA) tragen drei, durch Schrauben feststellbare Halterungen (30 mm cage system, Thorlabs, New Jersey, USA). Die obere Halterung trägt einen Kühlkörper (Heatsink ICK LED R 32 × 14 G, RS-Components, Deutschland) auf dem eine 5 W UV-Leuchtdiode (LZ1-10U600, LedEngin Inc, San Jose, USA, [97]) aufgebracht ist. Diese leuchtet bei einer Wellenlänge von 365 nm und strahlt eine Lichtleistung von 130 – 200 mW ab. Der Abstrahlwinkel der LED beträgt 85°. Die untere Halterung trägt ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit der zu bestrahlenden Probe. Abbildung 2.4 b) zeigt die Schaltplatine, auf der eine Konstantstromquelle für die LED (RCD-24-0.70/Vref, Recom, Brooklyn, NY, USA, [98]), sowie ein zugehöriger Intensitätssteller (1 kΩ-Potentiometer) aufgesteckt und verlötet sind. Der Schaltplan der Platinenkomponenten ist in Abbildung 2.4 c) schematisch dargestellt. Nicht dargestellt ist das 7,5 V/1.1 A Gleichstrom-Stecker-Netzteil (PA-1000S-LED, Voltcraft/Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland), das zum Betrieb der LED verwendet wurde.

Die Probe wird in die untere Halterung gestellt und die obere Halterung mit der LED wird kurz über der Probe mit zwei Schrauben festgestellt (siehe Abbildung 2.4 b). Die Apparatur wird mit einem schwarzen Pappzylinder verhüllt, um UV-Schäden an Augen oder Haut zu vermeiden. Für die Reaktion wurde mit der Konstantstromquelle die Ausgangsleistung der LED auf $\sim 1/3$ ihrer maximalen Leistung eingestellt und die Proben wurden für etwa 10 s bestrahlt.

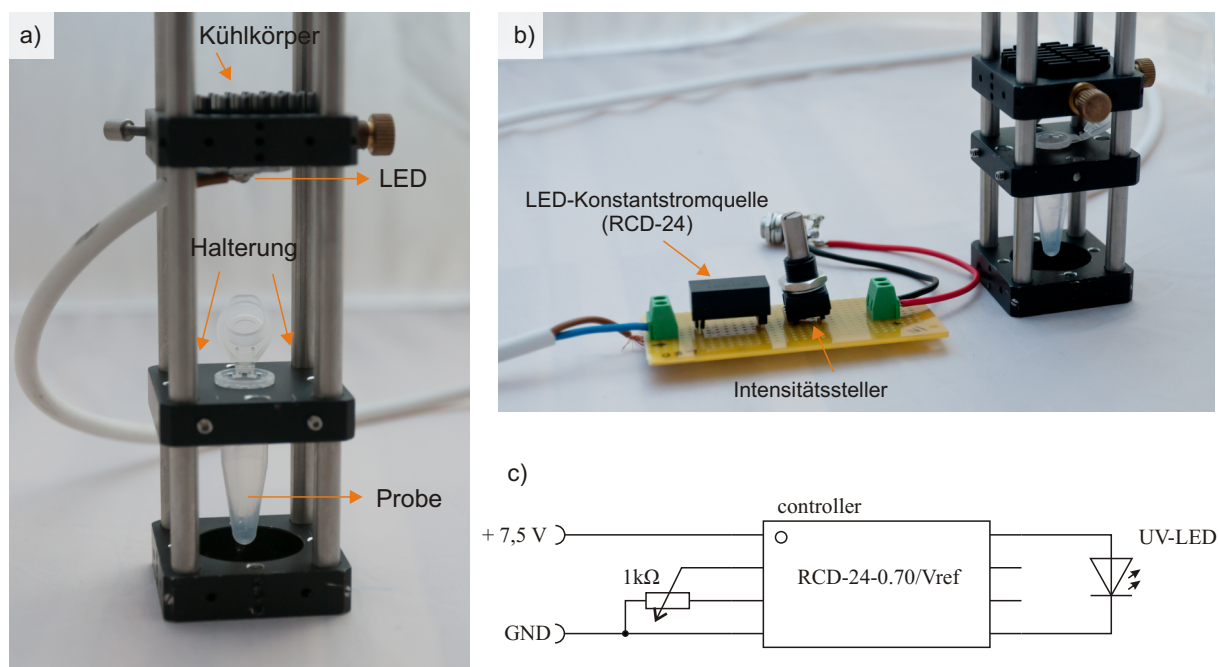


Abbildung 2.4.: UV-Crosslinker für die TFO-Bindung an die DNA. a) Aufbau der Probenbeleuchtung, b) Elektronik, c) Schaltplan der Elektronik.

2.6.3. Gelfiltration der fluoreszent markierten DNA

Um die noch verbleibenden ungebundenen TFO-Moleküle aus der Probe zu entfernen, wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde in die Spitze einer Pasteurpipette ein wenig Glaswolle gestopft, anschließend wurde die Glaspipette mit 1,5 ml des gut aufgeschwämmten Trennmediums befüllt. Als Trennmedium wurde Superose 6 (Pharmacia) verwendet. Nach der Sedimentierung des Mediums wurde die Säule mit $2 \times 1,5$ ml TE-Puffer gespült. 100 μ l des Markierungsansatzes wurden auf die Säule aufgetropft. Sobald die gesamte Probe in die Gelmatrix eingetreten war, wurde die Säule für die Elution der Probe wieder befüllt. Für die Elution wurden $2 \times 1,5$ ml TE-Puffer verwendet. Es wurden 12 Fraktionen von je 200 μ l gesammelt und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen um festzustellen welche Fraktionen das markierte Plasmid enthielten und welche das freie TFO. Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese auf eine 3,2 mm starke Klarglasplatte gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Das Gel wurde direkt im Anschluss auf einem Typhoon-Laserscanner bei einer Anregungs-Wellenlänge von 488 nm gescannt. Zur Detektion des Fluoreszenzsignals wurde ein Bandpassfilter mit einem Durchlassbereich von 500 – 540 nm verwendet (520/40-Filter). Wie aus Abb. 2.5 deutlich wird, sind die einzelnen Fraktionen gut voneinander unterscheidbar. Die fluoreszierenden Banden, die weiter unten im Gel liegen enthalten freies TFO, die Banden weiter oben im Gel enthalten die fluoreszent markierte DNA. Die verwendete negativ superhelikale DNA enthielt immer einen kleinen Anteil an offen ringförmige DNA (Plasmide mit Einzelstrang-

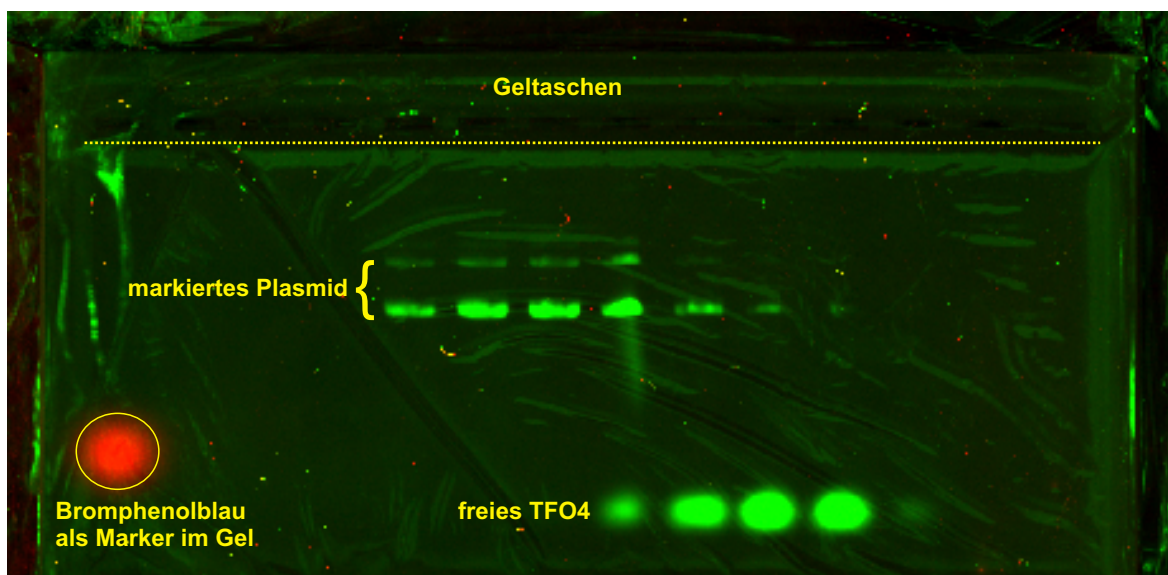


Abbildung 2.5.: Laserscan eines Agarosegels der Plasmide nach der Fluoreszenzmarkierung mit TFO4.

bruch), die in Abb. 2.5 die obere schwache Bande erzeugt und sich nicht aus der Probe entfernen ließ. Die Fraktionen, die reine markierte DNA enthielten wurden zusammengeführt und für die Messungen verwendet.

2.7. Herstellung fluoreszenzmarkierter Nukleosomen

2.7.1. Oktamerpräparation

Die Präparation der Histonoktamere erfolgte mit den rekombinanten Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 aus dem afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*). Diese Proteine wurden unserem Labor von Prof. Dr. Luger (Colorado State University, USA) zur Verfügung gestellt. Die Histonproteine wurden, wie in [99] beschrieben, in *E. coli* exprimiert und isoliert. Für die Faltung der Histone zu Oktameren wurden die vier Histonproteine äquimolar in einem Puffer mit Protein-entfaltenden Eigenschaften (7 M GuHCl (Guadiniumhydrochlorid), 20 mM Tris pH7,5, 10 mM DTT) gemischt. Die Gesamtkonzentration des Proteingehalts betrug 1 mg/ml. Die Konzentration der Proteinmenge wurde spektroskopisch kontrolliert (siehe Tab. 2.1 für Extinktionskoeffizienten).

Für die Faltung des Oktamers wurde das Gemisch bei 4 °C gegen einen Puffer mit Proteinfaltungsfördernden Eigenschaften (2 M NaCl, 10 mM Tris pH7,5, 0,1 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol) in Dialysekassetten dialysiert (Slide-A-Lyzer 7000 MWCO, Pierce, Rockfort, USA). Während der 14-stündigen Dialyse wurde der Puffer zweimal gegen frischen Puffer getauscht.

Die Oktamere wurden mittels HPLC von Proteinaggregaten und unvollständigen Oktameren, wie auch freiem Histon und im Falle der fluoreszent markierten Histonen auch von freien Fluorophoren getrennt. Die Probe wurde davor mit einem Zentrifugal-Konzentrator (Vivaspin 20 PES, MWCO 10000) auf 500 μ l reduziert.

Für die HPLC wurde eine Gelfiltrations-Säule (Superdex 200, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit dem Dialysepuffer äquilibriert. Der Rückfaltepuffer enthielt kein β -Mercaptoethanol. Die Probe wurde auf die Säule aufgebracht und mit dem gleichen Puffer eluiert (bei 0,5 ml/min). Die Herstellung der unmodifizierten Oktamere, sowie der fluoreszent markierten Oktamere, wie auch deren Aufreinigung und Kontrolle im Gel, sowie die spektroskopischen Qualitätsanalysen wurden von Frau Natalie Braun durchgeführt.

2.7.2. Nukleosomenrekonstitution mittels Salzdialyse

Die Rekonstitution der Nukleosomen wurde mittels Salz-Dialyse-Verfahren durchgeführt. In diesem Verfahren wird durch die langsame Reduktion der Salzkonzentration, von 2 M NaCl

Histon	Molekulargewicht [Da]	Extinktionskoeffizient [cm ⁻¹ M ⁻¹]
H2A	13960	4050
H2B	13774	6040
H3	15273	4040
H4	11236	5040

Tabelle 2.1.: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der Histonproteine (*X. laevis*). Daten aus Ref. [99].

(entspricht der Salzkonzentration der Oktamerpräparation) auf 5 mM NaCl, die ionischen Wechselwirkungen zwischen DNA und gebundenem Oktamer langsam stärker. Für die Rekonstitution von Histonoktameren aus *X. laevis* wurde die im Labor etablierte Methode der zweistufigen Dialyse verwendet [100]. Die Rekonstitution läuft insgesamt über drei Stufen. In der ersten Stufe werden Histonoktamere und Plasmid-DNA im gewünschten Konzentrationsverhältnis mit TE-Puffer, sowie NaCl-haltigem TE-Puffer (5 M-NaCl) vermischt. Pro Dialyseansatz wurden 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt, und mit beiden TE-Puffern auf 2 M NaCl eingestellt. Das Oktamer kam in der entsprechenden Menge zum Schluss dazu. Die Probe wurde für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler inkubiert. Die Dialyse erfolgte über zwei Dialysemembranen, der Rekonstitutionsansatz wurde dazu in ein Dialysehütchen gegeben (Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units, 7000 MWCO, Thermo Scientific, Rockfort, USA) und in eine zweite selbstgebaute Dialyse-Einheit gegeben, die etwa 15 ml 2 M NaCl-haltigen TE-Puffer fasste. Diese Einheit wurde in einem Styropor-Schwimmer eingepasst und im ersten Dialyseschritt auf 1 l TE-Puffer mit 0,1 M NaCl pro Probe gesetzt. In dem ersten Dialyseschritt wurde die Salzkonzentration über 4 h bei 4 °C auf 0,1 mM NaCl reduziert. Für den zweiten Dialyseschritt wurde der Dialysepuffer gegen einen zweiten Puffer getauscht, der die gewünschte Endkonzentration an Salz enthielt (TE-Puffer pH7,5, 0,5 mM NaCl). Die kleine Dialyseeinheit wurde in einem Styroporschwimmer auf den Puffer gesetzt und über Nacht dialysiert. Die fertigen Proben wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von einer Woche verbraucht, da die Stabilität der Nukleosomen mit längerer Lagerung schwächer wurde.

2.8. Messmethodik und Grundlagen zur Messmethodik

2.9. Rasterkraftmikroskopie

2.9.1. Prinzip

Das Rasterkraftmikroskop (engl.: *atomic force microscope*, 'AFM' oder *scanning force microscope*, 'SFM') gehört zur Familie der so genannten Rastersonden-Nahfeldmikroskope. Der Vorgänger des SFM, das Raster-Tunnel-Mikroskop (STM) wurde Anfang der 1980er Jahre von Gerd Binnig und Heinrich Rohrer bei IBM in Zürich entwickelt [101]. Das gemeinsame Funktionsprinzip dieser Mikroskope ist das rasterförmige Abtasten von Oberflächen mittels sehr kleiner Sonden. Der Idealfall einer solchen Sonde besteht aus einer ein-atomaren Spitze, z.B. aus einem einzelnen CO-Molekül. Mit einer solchen Spitze lassen sich die kovalenten Bindungsstrukturen von chemischen Molekülen auflösen [102].

Informationen der zu untersuchenden Probe liefert das SFM über Wechselwirkungen der Spitze mit der Probe (z.B. durch van der Waals-Kräfte). Es wird also die Kraft, die bei der Annäherung der Spitze an die Oberfläche wirkt vermessen. Neben topographischen Abbildungen von Proben kann das SFM so auch andere Informationen liefern, wie etwa die lokale Oberflächenladung, chemische und magnetische Eigenschaften, Hydrophobizität, Elastizität, Plastizität und noch einige andere mehr [103]. Dabei werden dann oft entsprechende Spezialspitzen verwendet.

Um Topographien zu erstellen, nutzt das SFM die mechanischen Kräfte zwischen einer Oberfläche und einer scharfen Spitze, um diese in Nanometer-Auflösung abzubilden. Die Kräfte, die Interaktionen zwischen Spitze und Oberfläche bedingen, sind kurzreichweitige Kräfte, wie z.B. die Pauli-Abstossung, und langreichweitige Kräfte, wie z.B. van-der-Waal's Kräfte und weitere elektrostatische Wechselwirkungen. Die zu untersuchende Oberfläche wird in einem ausgewählten Bereich zeilenweise abgerastert. Zwischen der zu untersuchenden Oberfläche und der Sonde kann es zu repulsiven oder anziehenden Kräften kommen, welche die an einem Federbalken befestigte Spitze von einer festgelegten Ruheposition über der Oberfläche auslenkt. Diese Auslenkungen enthalten Höheninformationen des gerasterten Bereichs, welche über einen auf die Sondenspitze fokussierten Laserstrahl von einer 4-Quadranten-Photodiode detektiert wird (siehe Abb. 2.6). Die Höheninformationen werden in Winkeländerungen des Laserstrahls übersetzt und über Änderungen der Intensität auf den verschiedenen Photodiodensegmenten detektiert.

Die Information wird registriert und so auf einen Piezoscanner rückgekoppelt, dass die Spitze einen konstanten Abstand zur Oberfläche hält. Die Bewegungen des Piezoscanners werden dann in Topographien umgerechnet. Hierzu wird die Höheninformation farbkodiert als Bild dargestellt.

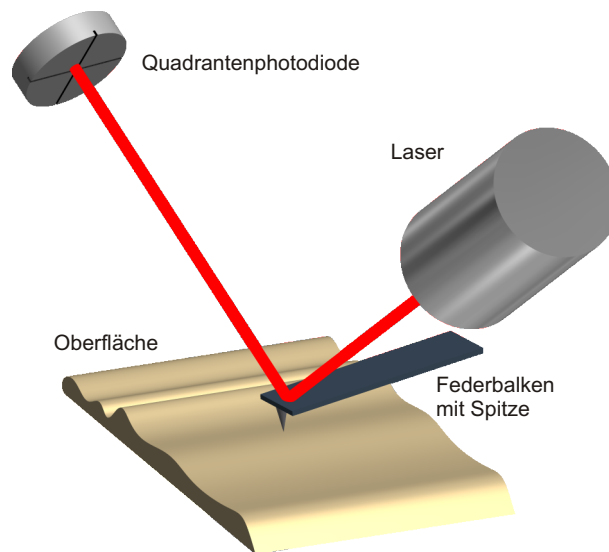


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops.

Der verwendete Piezoscanner erzeugt oft eine großskalige Unebenheit dieser Bilder, die über digitale Filter herausgerechnet werden kann.

Mit dem SFM sind nicht nur Messungen im Vakuum und in Luft, sondern auch in Lösung möglich. Dies ist besonders für biowissenschaftliche Zwecke interessant, da biologische Proben unter fast physiologischen Bedingungen untersucht werden können. Es lassen sich hier nicht nur Topographien, sondern auch dynamische Prozesse abbilden. So konnten z.B. Teilaspekte der Transkription beobachtet werden [104, 105].

2.9.2. Messmodi

Je nach Einsatzbereich werden unterschiedliche Messmodi benutzt. Diese werden in den folgenden Unterabschnitten einzeln erklärt.

2.9.2.1. Kontaktmodus

Die Sondenspitze befindet sich beim Kontaktmodus während der gesamten Messung in Kontakt mit der Probe. Durch attraktive oder repulsive Kräfte neigt sich der Federbügel zur Probe hin oder wird von ihr weg gebogen. Der Piezoscanner wird in z-Richtung bewegt und so die Auslenkung des Federbügels ausgeglichen. Diese Ausgleichbewegungen des Scanners enthalten dann die Höheninformationen. Für biologische Proben ist dieser Modus nur bedingt geeignet, da durch die Auflagekraft der Spitze stärkere Lateralkräfte wirken, die die Proben deformieren oder sogar zerstören können.

2.9.2.2. Nichtkontaktmodus

Im Nichtkontaktmodus wird der Federbalken nahe seiner Resonanzfrequenz in Vibration versetzt, wobei der Abstand zur Probe größer ist als die Anregungsamplitude. Die Probenoberfläche wird von der Spitze nicht berührt. Die langreichweitigen 'van-der-Waal's-Kräfte führen zu einer Verringerung der Resonanzfrequenz, die vom Abstand zwischen der Probe und der Spitze abhängt und wiederum als Regelsignal verwendet wird. Da berührungslos gearbeitet wird, ist die auf die Probe ausgeübte Kraft minimiert. Jedoch wird die laterale Auflösung durch den Abstand zwischen Probe und Spitze beschränkt.

2.9.2.3. Intermittierender Modus oder Tapping-Modus

Im Tapping-Modus wird der Federbalken nahe seiner Eigenresonanz, mittels eines Piezokristalls, zu sinusförmigen Oszillationen angeregt. Die Probe wird dann so nahe an die Spitze angenähert, dass sie die Spitze zeitweise berührt. Durch die Berührung der Oberfläche wird die Amplitude der Schwingung gedämpft. Die Amplitude der Schwingung wird hierbei über Ausgleichsbewegungen des Piezoscanners in z-Richtung konstant gehalten. Da im Tapping-Modus die Oberfläche nur kurzzeitig berührt wird, treten geringe laterale Kräfte auf, was vor allem für die Untersuchung biologischer Proben von Vorteil ist.

2.9.2.4. Auflösung

Die Auflösung wird bei der Rasterkraftmikroskopie durch die Eigenschaften der Probe, der Messinstrumentation, aber maßgeblich von der Geometrie der Sondenspitze bestimmt (siehe Abbildung 2.7). Die hier verwendeten Sondenspitzen besitzen eine kegelförmige Geometrie, dadurch kann es zu einer Verbreiterung des Abbilds der gerasterten Probe kommen. Für die laterale Auflösung gilt, dass sich die betrachtete Probe um annähernd einen Spitzendurchmesser

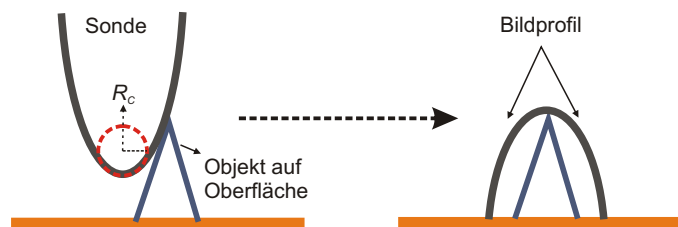


Abbildung 2.7.: Objektauflösung in der Rasterkraft-Mikroskopie. Schematische Objektvergrößerung in Abhängigkeit der Spitzengeometrie.

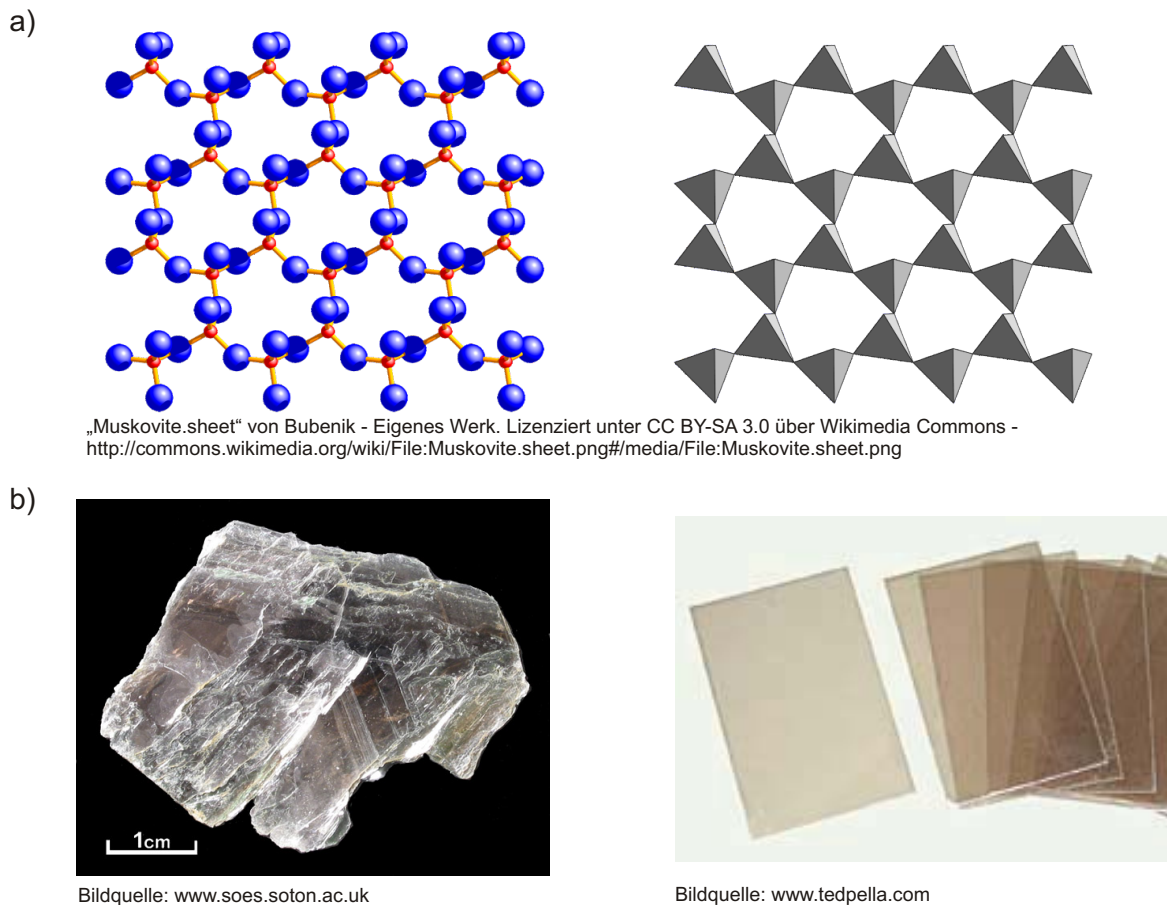


Abbildung 2.8.: Glimmer als Probenoberfläche in der Rasterkraft-Mikroskopie : a) molekulare Organisation eines Glimmer-Kristalls. b) Muskovit-Glimmer in seiner natürlichen Form (links) und verarbeitet für die Mikroskopie (rechts).

(verwendete Spitzen: $R_c \leq 10$ nm) verbreitert. Je nachdem wie flexibel die Probe ist, kann sich dieser Wert verschieben. Soll die Breite einer Probe gemessen werden, gibt man diese bei halber Höhe der Struktur an, um diesen Verbreiterungseffekt zu berücksichtigen.

2.9.3. Probenpräparation und Mikroskopie

2.9.3.1. Glimmer als Messoberfläche

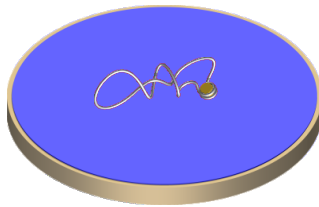
Für die rasterkraftmikroskopische Darstellung von Molekülen müssen diese an eine Oberfläche gebunden werden. Die verwendeten Oberflächen müssen auf atomarer Ebene flach sein, damit sich einzelne Moleküle gut darstellen lassen. Als Oberfläche wird neben aufgedampftem Gold, geätztem Glas, hoch orientierter pyrolytischer Graphit (H.O.P.G.), auch, wie in dieser Arbeit, Glimmer verwendet. Glimmer ist ein Schichtsilikat, in welchem tetraedisch angeord-

nete SiO_4 -Gruppen hexagonale, planare Strukturen bildet (Phyllosilikate), die negativ geladen sind (siehe Abb. 2.8). Die einzelnen Silikat-Strukturschichten werden über Metallionen zusammengehalten, diese vertikal wirkende Wechselwirkungen sind aber schwächer als die der horizontalen Bindung zwischen den Einheiten der planaren Phyllosilikatschichten. Aufgrund dieser unterschiedlichen Bindungsstärke lassen sich einzelne Schichten relativ leicht voneinander trennen, und man erhält eine saubere, planare Oberfläche mit negativer Ladung [106]. Für die Rasterkraftaufnahmen wurden Muskovit-Glimmerplatten benutzt ($\text{KAl}_2[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2]$), die für die Rasterkraft-Mikroskopie hergestellt werden (Muskovit-Glimmer, Plano, Wetzlar) (siehe Abb. 2.8). Diese Platten werden auf die passende Größe des Oberflächenhalters zurecht geschnitten und mittels beidseitig adhesiven Klebebandes auf der Halterung fixiert.

Aufgrund der negativen Ladung der Glimmeroberfläche muss diese modifiziert werden, um die ebenfalls negativ geladenen DNA-Moleküle binden zu können. Hierfür können Puffer mit divalenten Kationen verwendet werden, die an die Oberfläche binden und ihr so eine positive Ladung geben. Als Folge der Ladungsänderung der Oberfläche können sich nun DNA-Moleküle anlagern [107, 108]. Die in dieser Arbeit verwendete Methode benutzt Polylysin um die Oberflächenladung zu modifizieren (siehe Abbildung 2.9). Diese Technik ist im Labor etabliert und bietet den Vorteil, dass sich mit dem Einsatz unterschiedlicher Polylysin-Konzentrationen unterschiedlich starke Bindungseigenschaften der Oberfläche herstellen lassen. Die für diese Arbeit verwendete Polylysinkonzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ ergibt eine Oberfläche mit mittlerer Bindungsstärke, bei der eine geringe zwei-dimensionale Bewegung der DNA-Plasmide auf der Oberfläche möglich ist. Dadurch können die gebundenen Moleküle nach der Bindung noch eine äquilibrierte Struktur einnehmen [109].

2.9.3.2. Probenpräparation

Die SFM-Aufnahmen wurden in Luft angefertigt. Dies bedeutet, dass die DNA-Moleküle nach der Anlagerung auf die Glimmeroberfläche getrocknet wurden bevor sie im SFM gerastert wurden. Für die Probenpräparation wurde die Glimmeroberfläche mit Polylysin beschichtet. Das verwendete Polylysin bestand aus 7-12 Aminosäuren (P0879-25MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und hatte somit ein Molekulargewicht von 1000 – 5000 Da. Es wurde eine Stocklösung mit Reinstwasser (Millipore-Anlage) bei einer Poly-Lysin-Konzentration von 10 g/l angefertigt. Das Polylysin wurde über 4 h auf dem Rundschüttler in Lösung gebracht, danach aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert. Für die Beschichtung wurde der Glimmer gespalten und auf die saubere Oberfläche $30 \mu\text{l}$ der verdünnten Stocklösung ($10 \mu\text{g/l}$) auf die Oberfläche getropft. Nach 3 Minuten wurde die so präparierte Oberfläche mit Reinstwasser gespült und anschließend in einem gefilterten N_2 -Strom getrocknet. Auf die so modifizierte Glimmeroberfläche

a) Schema der Messoberfläche mit Molekül
(Plasmid mit Nukleosom)

b) AFM-Topographie: Plasmid mit Nukleosom

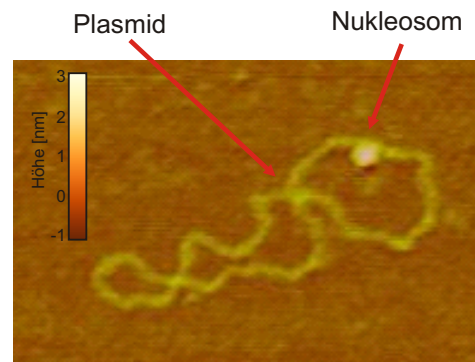


Abbildung 2.9.: Polylysinbeschichtung und SFM-Topographie : a) Darstellung einer Polylysinbeschichteten (blau) Glimmeroberfläche mit Plasmid und Nukleosom und b) SFM-Topographie eines Plasmids mit positiver Torsionsspannung und Nukleosom.

wurde die DNA-Probenlösung aufgetropft. Hierzu wurde die Probe mit HEPES-Puffer (10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure) pH8, 20 mM NaCl) auf eine Endkonzentration von 5 nM verdünnt. 30 μ l der so verdünnten Probe wurden pro präparierter Oberfläche verwendet. Der Bindung der Moleküle an die Oberfläche fand innerhalb von drei Minuten statt. Im Anschluss wurde die Oberfläche dreimal mit 1 ml Reinstwasser gewaschen, welches sehr vorsichtig vom Rand des Probenträgers über die Oberfläche lief. Die Probe wurde anschließend ebenfalls sehr vorsichtig im N_2 -Strom getrocknet.

2.9.3.3. Durchführung der Messungen und Auswertung der SFM-Topographien

Für die Messung wurden Siliziumspitzen (PointProbe®Plus NCH tips, Nanosensors™, Nanoworld, Schaffhausen, Schweiz) verwendet. Diese wurden im 'tapping'-Modus bei einer Anregungsfrequenz von 300 – 400 kHz betrieben. Dies entspricht dem Frequenzbereich, in dem die Siliziumspitzen eine Resonanz aufweisen. Der Laser wurde bei ruhender Spitze auf die Mitte der 4-Quadranten-Photodiode fokussiert, bis die Differenzspannung in vertikaler und horizontaler Richtung den Wert 0 hatte. Die Parameter des Rasterns wurden eingestellt, indem zunächst die Amplitude der Schwingung des Federbalkens auf 2 – 3 V festgelegt wurde. Um die Zerstörung der empfindlichen Spitzen durch eine Resonanzkatastrophe zu vermeiden, lag dieser Wert etwa 200 – 250 mV unter der Spannung der freien Schwingung. Die Spitze wurde automatisch an die Oberfläche angenähert bis dieser Sollwert erreicht war. Die Rasterung der Oberfläche fand bei diesen Einstellungen statt. Die Messungen fanden an einem Veeco Nanoscope IIIa (Bruker, Camarillo, USA) statt. Die aufgezeichneten SFM-Topographien wurden zunächst mit einem Filter

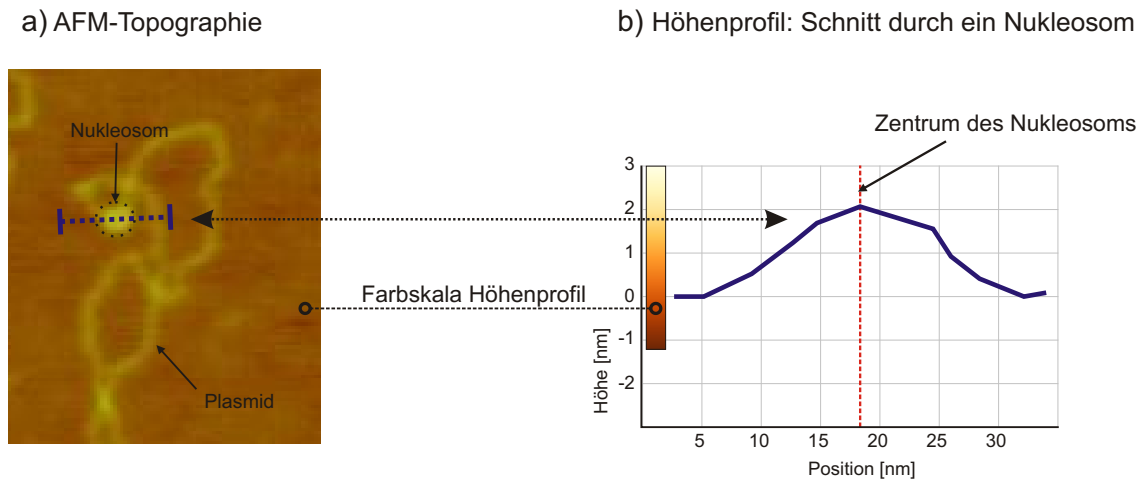
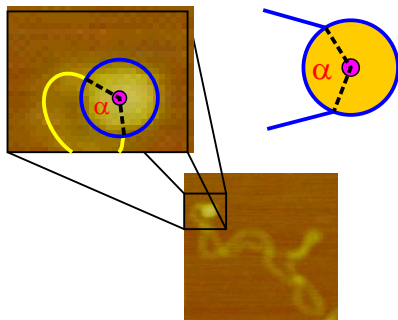


Abbildung 2.10.: Vermessung der Nukleosomen. (a) SFM-Topographie mit Plasmids und Nukleosom, b) Schnitt durch das Höhenprofil des Nukleosoms.

geglättet um die leicht bogenförmige Auslenkungsbewegung des Piezokristalls des Scanners aus den Höheninformationen herauszurechnen. Hierzu wurde die Steuerungssoftware 'z' der Firma Veeco verwendet (Version 5.12r3). Für die Messung der Nukleosomen-Öffnungswinkel in Abhängigkeit der Plasmid-DNA-Torsionsspannung, wurde ein ImageJ-Macroprogramm verwendet (Autor: R. Kirmse). Dieses Programm erzeugt eine runde Maske, um einen zuvor manuell gewählten Mittelpunkt (siehe Abb. 2.11). Die Größe der Maske lässt sich verändern und so dem Nukleosomendurchmesser anpassen. Durch einen Rechtsklick auf die DNA-Eintritts- und Austrittsstelle am Nukleosom, wird automatisch, vom zuvor gewählten Mittelpunkt aus, der Winkel gemessen. Es wurden nur solche Nukleosomen für die weitere Auswertung gewählt, die eindeutig an die DNA gebunden hatten und etwa 20 nm breit waren (siehe Abbildung 2.10).

Ausgewählt wurden Moleküle die maximal ein oder zwei Nukleosomen trugen und nicht mit anderen Molekülen überlappten. Abbildung 2.11 a) zeigt eine schematische Darstellung der Messung des Öffnungswinkels mittels Macro-Werkzeug. Abbildung 2.11 b) zeigt representative Moleküle, die jeweils typische Öffnungswinkel für alle vier verwendeten Plasmid-Topoisomere mit Torsionsspannungen von $\sigma \in \{-0,046, -0,02, 0, 0,031\}$ zeigten.

a) Vermessung des Öffnungswinkels α 

1. Der Mittelpunkt des Nukleosoms wird manuell gewählt (Magenta).
2. Die Größe eines Kreises ausgehend vom Mittelpunkt wird an die Größe des Nukleosoms angepasst (Blau).
3. Der Winkel wird zwischen dem DNA-Eintrittspunkt, dem Zentrum und dem DNA-Austrittspunkt gemessen.

Beispielbilder von shDNA mit verschiedenen Werten für σ (Öffnungswinkel α in blau):

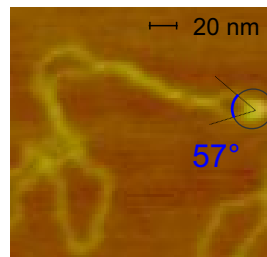
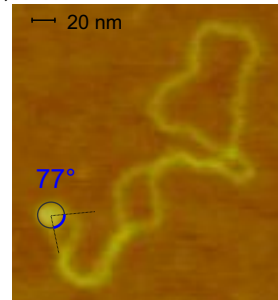
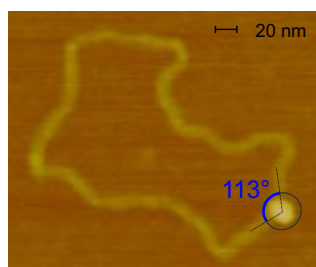
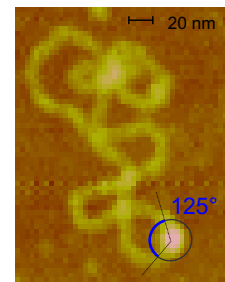
b) $\sigma \sim -0.046$ c) $\sigma \sim -0.02$ d) $\sigma \sim 0$ e) $\sigma \sim 0.031$ 

Abbildung 2.11.: Illustration der Messung des Öffnungswinkels von Nukleosomen. (a) zeigt die Definition des Öffnungswinkels. (b-e) zeigen Beispiele für Winkelgrößen bei unterschiedlichen Werten für σ : $\sigma \in \{-0,046, -0,02, 0, 0,031\}$ (in blau: gemessener Winkel).

2.10. Grundlagen der Fluoreszenz

2.10.1. Licht

In vielen Teilen dieser Arbeit wird Licht genutzt um Bewegungen von Molekülen zu studieren. Licht ist elektromagnetische Strahlung, deren Elementarteilchen als Photonen bezeichnet werden. Die Energie eines Photons ist abhängig von der Wellenlänge λ , bzw. der Frequenz ν der Strahlung und entspricht:

$$E_{\text{Photon}} = \frac{h \cdot c_0}{\lambda} = h \cdot \nu,$$

wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum und c_0 die Vakuum-Lichtgeschwindigkeit ist.

2.10.2. Lichtabsorption

Die Intensität von Licht wird beim Durchtritt durch Materie reduziert. Die Strahlung wird durch die Absorption bestimmter Wellenlängen verringert, die Energie des Lichts wird also an die Materie weiter gegeben. Jede Materie hat ein spezifisches, Wellenlängen-abhängiges

Absorptionsprofil $\epsilon(\lambda)$ und kann durch seine Licht-absorbierenden Eigenschaften auch charakterisiert werden. Die Reduktion der Lichtintensität beim Durchgang durch Licht-absorbierende Flüssigkeiten und Gase, ist von der Konzentration der absorbierenden Teilchen und der Dicke der absorbierenden Schicht abhängig. Das Lambert-Beersche-Gesetz stellt den Zusammenhang zwischen eingestrahelter Intensität $I_0(\lambda)$ und der Intensität nach dem Durchgang durch die Probe $I_1(\lambda)$ her:

$$A(\lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I_1(\lambda)}{I_0(\lambda)} \right) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.10.1)$$

$A(\lambda)$: Extinktion

I_0 : Intensität des einfallenden Lichts

$I_1(\lambda)$: Intensität des transmittierten Lichts

$\epsilon(\lambda)$: dekadischer Extinktionskoeffizient

c : Konzentration der abs. Teilchen

d : Dicke der absorbierenden Schicht

Dieser Zusammenhang wurde an vielen Stellen z.B. zur Bestimmung von Protein-Konzentrationen in einem UV-Absorptionsspektrometer benutzt. Dabei wird die Absorption von UV-Licht durch die Aminosäuren in einem Protein ausgenutzt (siehe Abschnitt 2.7.1).

2.10.3. Fluoreszenz

Bei der Absorption von Photonen durch Materie werden die in ihr enthaltenen Moleküle angeregt. Hierbei kommt es zu Interaktionen zwischen den Photonen und den Valenz-Elektronen in der bestrahlten Materie, die durch die Energie der Photonen in einen angeregten Energiezustand gebracht werden. Der angeregte Zustand eines Atoms wird früher oder später wieder in seinen Grundzustand zurückfallen. Hierbei kann die Energiedifferenz als Photon, oder als Wärme bzw. Molekül-Schwingung freigegeben werden. Das dabei emittierte Photon wird Fluoreszenz- oder Phosphoreszenz-Photon genannt. Zerfälle bei denen kein Photon entsteht, werden als nicht-strahlend bezeichnet. Das Jablonski-Diagramm (siehe Abb. 2.12) zeigt anschaulich, welche Phänomene der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz in einem Molekül zugrunde liegen. Das hier dargestellte Energiespektrum teilt sich auf in unterschiedliche Elektronenzustände S_n der Energie E_n , wobei n die elektronische Quantenzahl ist. S_0 bezeichnet den Grundzustand und $S_1, S_2, \dots$ die angeregten Zustände. Die elektronischen Zustände spalten jeweils noch in breite Banden von Rotations-Schwingungs-Zuständen auf. Entspricht die Energie eines Photons der Energiedifferenz zweier Zustände (z.B. $E_1 - E_0$ zwischen S_0 und S_1), so wird das Photon absor-

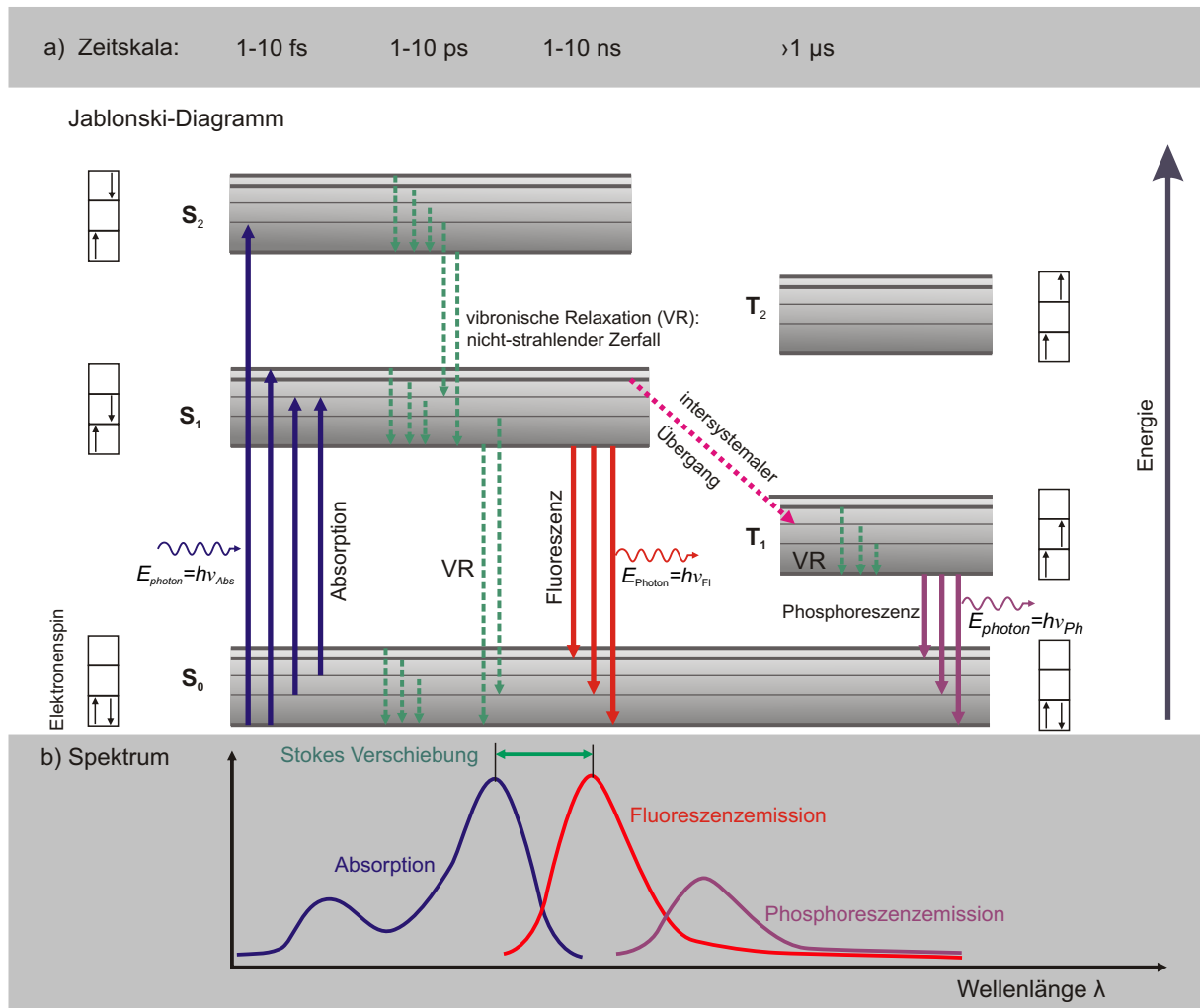


Abbildung 2.12.: Jablonski Diagramm

biert und das Elektron wird von dem Grundzustand auf das nächste Energieniveau S_1 gehoben. Die angeregten Elektronen verbleiben zunächst in einem Zwischenzustand S_1^* , aus welchem sie durch vibronischen Energieverlust, ohne Photon-Emission, in den angeregten Grundzustand S_1 übergehen. Nach einer bestimmten Zeit geht das Elektron von dort, unter Emission eines Photons, in den Grundzustand S_0^* über, welcher im Anschluss ohne Photonenabgabe in den Grundzustand S_0 zerfällt. Durch die erwähnten nicht-strahlenden Übergänge (z.B. $S_1^* \rightarrow S_1$) ist die Energie des Fluoreszenz-Photons niedriger, als die des absorbierten Photons. Die Wellenlängendifferenz zwischen der Anregung und der Fluoreszenz bezeichnet man als Stokes-Verschiebung (siehe Abb. 2.12 b)):

$$\delta\lambda_{\text{Stokes}} = \lambda_{\text{Abs,Max}} - \lambda_{\text{Fluor,Max}} \quad (2.10.2)$$

Typischerweise liegt die Verschiebung zwischen 10 nm und 100 nm. Absorptionsspektren von Atomen bestehen aus Peaks, also scharfen Linien. Moleküle formen breitere Bandenspektren, da aufgrund der größeren Anzahl an Atomen auch Schwingung und Rotation der Moleküle eine Rolle spielen (siehe Abb. 2.12 b). Der Übergang von Elektronen in den angeregten Zustand geschieht auf einer Zeitskala von Femtosekunden, die Lebensdauer der vibronischen Relaxierung beträgt Picosekunden, beide Prozesse sind also deutlich schneller als die Fluoreszenz-Lebensdauer, die einige Nanosekunden beträgt.

2.10.4. Triplet-Übergang

Der Elektronen-Grundzustand S_0 wird, wie aus Abb. 2.12 ersichtlich wird, von zwei Elektronen mit anti-parallelen Spins besetzt. Diese Anordnung der Spins führt zu einem Gesamtspin von 0 mit einer Multiplizität von 1, dieser Zustand wird daher auch Singulett-Zustand genannt. Während eines Anregungsübergangs im Atom kann der Elektronen-Spin in einem Zustand nicht verändert werden, daher können nur andere Singulettzustände (S_1 , S_2) erreicht werden. Neben den Singulettzuständen gibt es auch Triplettzustände (T_1 , T_2), diese haben einen Gesamtspin von $1\hbar$ und eine Multiplizität von 3. Übergänge zwischen Singulett und Triplett-Zuständen innerhalb eines Atoms würden zu einer Spinänderung des Elektrons führen und sind daher quantenmechanisch verboten. In komplexen Molekülen, wie z.B. Fluorophoren, sind sie aber durchaus möglich, wenn auch seltener als der Anregungsübergang zwischen zwei Singulett-Zuständen. Solche Triplett-Übergänge treten z.B. in dem in dieser Arbeit verwendeten Fluorophor Alexa488 auf. Die Lebensdauer von Elektronen in Triplettzuständen ist länger und liegt, für Alexa488, im Microsekunden-Bereich. Die Emission der Photonen die aus dem Übergang von T_1 nach S_0 stammen wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Im Wellenlängenspektrum ist die Phosphoreszenz-Emission im Vergleich zu Fluoreszenz nach rechts verschoben. Da keine weiteren Photonen emittiert werden, so lange sich das angeregte Elektron im Triplettzustand befindet, erzeugt dies eine spezifische Blinkdynamik der Fluorophore. Wie noch gezeigt wird, lässt sich dieses Triplett-Blinken aber in der Auswertung berücksichtigen.

2.10.5. Chemische Fluorophore

Viele Moleküle mit einer Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Wellenlängen-Spektrums besitzen ein konjugiertes π -Elektronensystem. Die Elektronen sind in diesem Fall nur schwach an das Molekül gebunden und Photonen aus dem sichtbaren Bereich verfügen über genügend Energie um sie anzuregen. Die Bindungsenergie nimmt typischerweise mit steigender Größe des π -Elektronensystems ab. Dies führt zu einer Verschiebung der Absorption und der Fluoreszenz

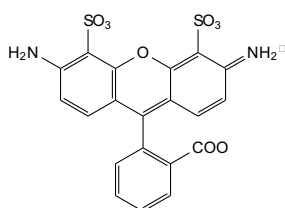
	$\lambda_{\text{Abs,Max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Fluor,Max}}$ [nm]	$\delta\lambda_{\text{Stokes}}$ [nm]	ϵ_{Abs} [$M^{-1}\text{cm}^{-1}$]
Alexa488	495	519	24	73,000
Alexa594	590	617	27	92,000

Tabelle 2.2.: Spektroskopische Eigenschaften von Alexa-Fluorophoren. Daten aus Ref. [99].

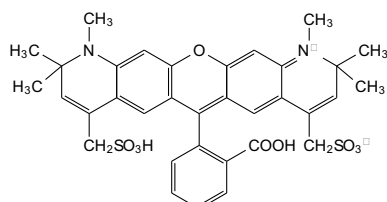
in den roten Bereich des Wellenlängen-Spektrums [110] (siehe Abbildung 2.13).

Der grüne Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 488 wurde in dieser Arbeit zur Markierung der DNA-Plasmide (siehe Abschnitt 2.6), wie auch der Histonoktamere verwendet (siehe Abschnitt 2.7.1). Abbildung 2.13 zeigt seine Strukturformel sowie sein Absorptions- und Emissionsspektrum. Zum Vergleich ist auch der rote Licht emittierende Farbstoff Alexa594 dargestellt.

a) Alexa488



b) Alexa594



c)

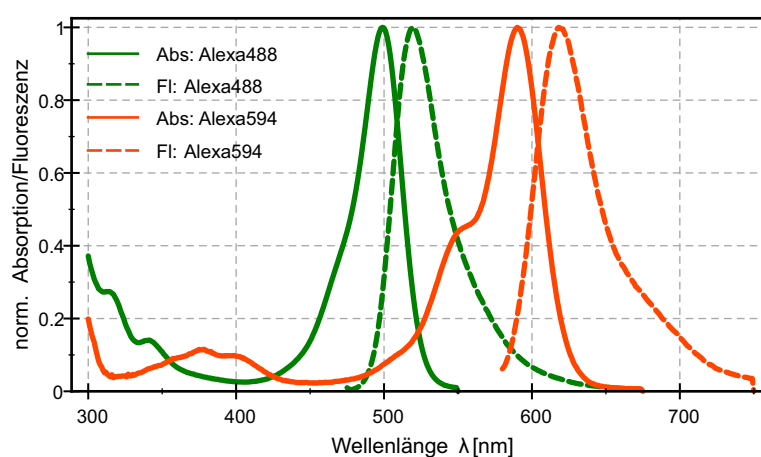


Abbildung 2.13.: Spektrum der Alexa-Fluorophore a) Strukturformel von Alexa488 und b) von Alexa594. c) zeigt das Spektrum bei Anregung und Fluoreszenz beider Fluorophore (Alexa488: grün, Alexa594: rot).

2.11. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

2.11.1. Prinzip der FCS

In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) werden die zeitlichen Fluktuationen der Fluoreszenz-Intensität farbmarkierter Moleküle, während der Diffusion durch ein Laser-generiertes Fokusvolumen in einer Probe, detektiert. Hierdurch lassen sich physikalische oder chemische Eigenschaften, wie z.B. der translationale, oder auch Rotations-Diffusionskoeffizienten, Bindungs-Interaktion zwischen Molekülen, Aggregation etc. auflösen und analysieren. Das Prinzip von FCS zur Bestimmung von translationalen Diffusionskoeffizienten wie auch Rotations-Diffusionskoeffizienten, wurde bereits in den 1970er Jahren beschrieben ([111–114]). Durch die Weiterentwicklung der Technik in Form von konfokaler Anregung, Photonen-Detektion und Korrelation Anfang der 1990er Jahre, verbreitete sich die Verwendung von FCS vor allem auch für die Untersuchung von lebenden Zellen [86, 115–118]. Tabelle Tab. 2.2 fasst die wichtigsten spektroskopischen Eigenschaften dieser Farbstoffe zusammen.

Wie in Abb. 2.14 a) dargestellt, wird ein diffundierendes farbmarkiertes Molekül durch einen Laser in einem kleinen Beobachtungsvolumen ($\sim 1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$) angeregt. Dieses angeregte Molekül emittiert Photonen, welche in einem Detektor gemessen werden. Das sich daraus erge-

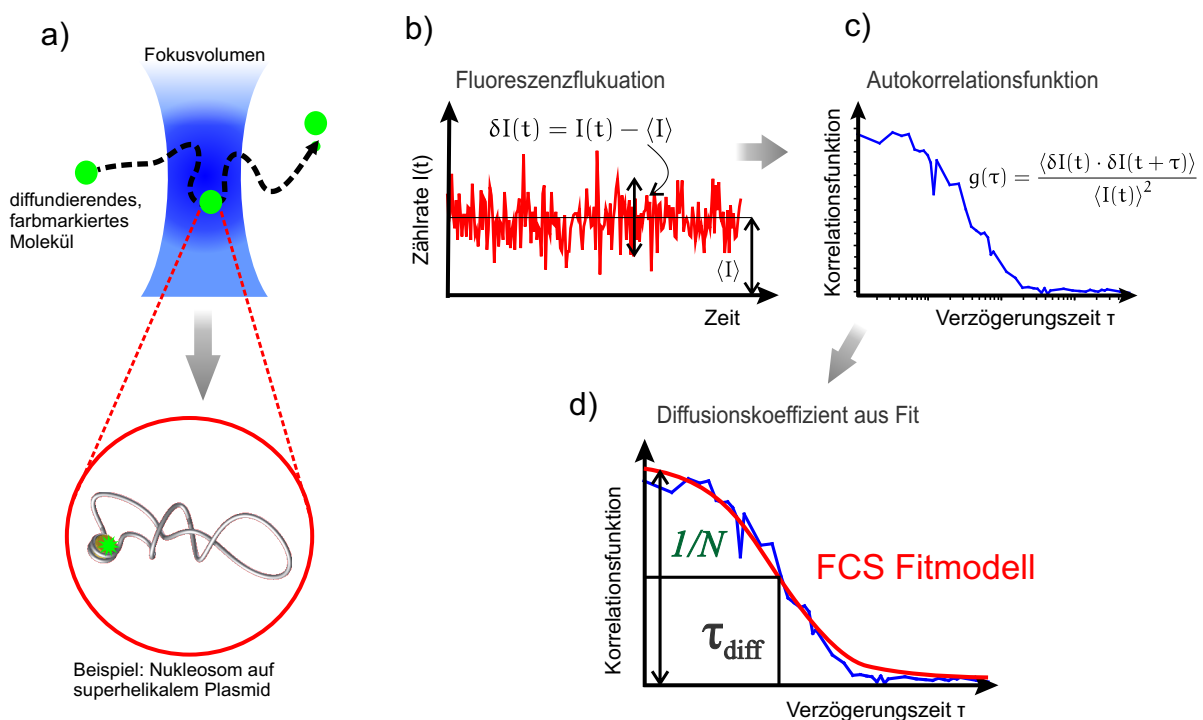


Abbildung 2.14.: Umwandlung von Fluoreszenz-Fluktuationen in Autokorrelationsdaten.

bende Signal (siehe Abb. 2.14 b) zeigt Fluktuationen der Fluoreszenzintensität $\delta I(t)$ um eine mittlere Intensität $\langle I \rangle$, die wie folgt zustande kommen: Solange sich ein einzelnes Molekül im Beobachtungsvolumen aufhält, emittiert es Photonen. Das Fluoreszenzsignal bleibt dadurch mehr oder weniger auf dem gleichen Level. Ist das Molekül wieder aus dem Beobachtungsvolumen diffundiert, so fällt das Signal im Detektor ab, da kein Fluoreszenz-Licht mehr detektiert wird. Sind mehrere Teilchen im Fokus enthalten, ist das gemessene Signal die Summe über die Einzelsignale der Fluorophore und variiert mit der sich durch die Diffusion ändernden Teilchenzahl im Beobachtungsvolumen.

Solche Fluktuationen $I(t)$ lassen sich durch eine Autokorrelationsanalyse quantifizieren. Dazu wird die zeitliche Autokorrelationsfunktion

$$g(\tau) = \frac{\langle I(\tau) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 = \frac{\langle \delta I(\tau) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (2.11.1)$$

des Signals $I(t)$ berechnet. Sie beschreibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals als Mittelung $\langle \cdot \rangle$ über verschiedene Verzögerungszeiten τ . Die Selbstähnlichkeit ist nur auf einer Zeitskala $\tau \leq \tau_D$ gegeben, in der sich das Teilchen noch nicht aus dem Beobachtungsvolumen bewegt hat. Diese Zeitskala ist durch den kleinsten Durchmesser $2 w_{xy}$ des Beobachtungsvolumens und den Diffusionskoeffizienten D der Teilchen definiert:

$$\tau_D = \frac{w_{xy}^2}{4D} \quad (2.11.2)$$

Die typische Form einer Autokorrelationskurve ist in Abb. 2.14 c)/d) dargestellt. Sie wird bestimmt durch den Abfall von $g(\tau)$ nach τ_D auf ihren halb-maximalen Wert. Die Amplitude $g(0) = 1/N$ gibt die Teilchenzahl im Fokus wieder. Hieraus lassen sich Konzentrationen bestimmen wenn die Größe des Beobachtungsvolumen bekannt ist.

2.11.2. Theoretische FCS-Fitmodelle

Zur Auswertung der experimentell gemessenen Kurven werden Parameterfits verwendet für die eine theoretische Modellfunktion nötig ist. Diese kann aus der Definition der Autokorrelationsfunktion aus Gleichung (2.11.1) hergeleitet werden. Die Unbekannte $I(t)$ beschreibt die Fluoreszenz aus dem Beobachtungsvolumen zur Zeit t . Man kann sie theoretisch wie folgt als Integral über die Fluoreszenz aller Teilchen im Fokus modellieren:

$$I(\tau) = \phi \cdot \iiint \eta \cdot \epsilon \cdot c(t, x, y, z) \cdot \text{MDE}(x, y, z) \, dx \, dy \, dz. \quad (2.11.3)$$

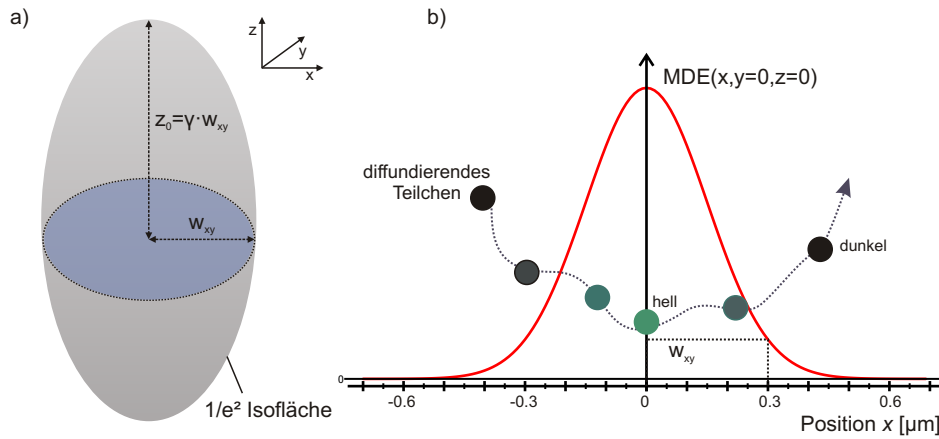


Abbildung 2.15.: Das Fokusvolumen und seine Gauß-förmige Ausleuchtung. a) zeigt schematisch die typische Form eines Fokusvolumens, wie sie durch die Optik der konfokalen Mikroskopie erzeugt wird. Der $1/e^2$ -Radius w_{xy} bestimmt das Gauß-Volumen in xy-Richtung und der Radius $z_0 = \gamma \cdot w_{xy}$ bestimmt die z-Richtung des Volumens. b) zeigt die Gauß-Form des ausgeleuchteten Fokusvolumens und verdeutlicht durch den diffundierenden Partikel (Kreis von schwarz bis hellgrün) die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Ausleuchtungsstärke durch den Laser an unterschiedlichen Orten im Fokus.

Hierbei beschreibt die molekulare Detektionseffizienz (MDE) das Beobachtungsvolumen. Integriert wird über das gesamte Volumen, da nur die Gesamtfluoreszenz aus dem Beobachtungsvolumen detektiert wird. Die Funktion $c(t, x, y, z)$ steht für die Konzentration der beobachteten Teilchen zur Zeit t am Ort (x, y, z) . Die Absorption des Anregungslichts wird durch den Extinktionskoeffizienten ϵ beschrieben. Aus den absorbierten Photonen werden mit der Quantenausbeute η Fluoreszenz-Photonen erzeugt. Da durch die verwendete Optik nicht alle Photonen detektiert werden können (es wird z.B. nicht der ganze Raumwinkel bei der Detektion abgedeckt), wird ein weiterer Faktor ϕ eingeführt, der dies modelliert.

Für diese Arbeit wird FCS an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Das durch die Fokussierung des Lasers in der Probe ausgeleuchtete Beobachtungsvolumen (auch Fokusvolumen genannt) lässt sich gut durch eine 3D-Gauß-Verteilung beschreiben:

$$MDE(x, y, z) = \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2} - 2\frac{z^2}{(\gamma \cdot w_{xy})^2}\right). \quad (2.11.4)$$

Die Intensität des Laserlichts ist in der Mitte am höchsten und fällt nach allen Seiten gleichmäßig ab. Die Größe des Gauß-Volumen ist in xy-Richtung durch den $1/e^2$ -Radius w_{xy} und in z-Richtung durch den größeren Radius $z_0 = \gamma \cdot w_{xy}$ bestimmt (siehe Abb. 2.15). Der Parameter γ wird auch als Achsenverhältnis des Fokusvolumens bezeichnet.

Durch Einsetzen von (2.11.3) in die Autokorrelationsgleichung (2.11.1) wird letztere mit der

Konzentrationsverteilung $c(t, x, y, z)$ und deren Fluktuationen $\delta c(t, x, y, z)$ in Beziehung gesetzt (analog zu $I(t)$ und $\delta I(t)$). Sie hängt dadurch von der Konzentrations-Korrelations-Funktion, die sich aus der FCS-Theorie ergibt, ab [119]:

$$\langle \delta c(t, x, y, z) \cdot \delta c(t + \tau, x', y', z') \rangle \propto \frac{1}{(4\pi \cdot D\tau)^{3/2}} \cdot \exp\left(-\frac{(x - x')^2 + (y - y')^2 + (z - z')^2}{4D\tau}\right). \quad (2.11.5)$$

Mit dieser Gleichung und der MDE aus (2.11.4) kann die FCS-Autokorrelationsfunktion für normale Diffusion berechnet werden [112, 114, 119]:

$$g(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\gamma^2 \tau_D}\right)^{-1/2}. \quad (2.11.6)$$

Hierbei wurde die Definition in Gl. (2.11.2) für die Diffusionszeit τ_D verwendet. Diese Autokorrelationsfunktion ist für einfache Proben mit normaler Diffusion gültig.

2.11.2.1. Transformation der FCS-Kurven in mittlere quadratische Verschiebungen (MSD)

Die in dieser Arbeit verwendeten superhelikalen Plasmide besitzen wie in der Einleitung beschrieben, neben der normalen Translationsdiffusion des gesamten Moleküls noch die interne Dynamik als eine zweite Komponente auf kürzeren Verzögerungszeiten τ . Die Gesamtdynamik der Plasmide lässt sich, wie in der Einleitung beschrieben, durch die Transformation der Autokorrelationskurven in mittlere quadratische Abstände (MSD) beschreiben. Wie in [32] gezeigt lässt sich die FCS-Theorie für den Fall eines allgemeinen MSDs anpassen wenn man Gleichung (2.11.5) ändert:

$$\begin{aligned} \langle \delta c(t, x, y, z) \cdot \delta c(t + \tau, x', y', z') \rangle &\propto \\ &\propto \frac{1}{(2\pi \cdot \text{MSD}(\tau)/3)^{3/2}} \cdot \exp\left(-\frac{(x - x')^2 + (y - y')^2 + (z - z')^2}{2 \cdot \text{MSD}(\tau)/3}\right). \end{aligned} \quad (2.11.7)$$

Damit ergibt sich dann statt Gleichung (2.11.6):

$$g_{\text{MSD}}(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{2}{3} \cdot \frac{\text{MSD}(\tau)}{w_{xy}^2}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{2}{3} \cdot \frac{\text{MSD}(\tau)}{\gamma^2 \cdot w_{xy}^2}\right)^{-1/2}. \quad (2.11.8)$$

Hiermit lässt sich, sofern N , γ und w_{xy} bekannt sind, für jede Verzögerungszeit τ die mittlere Verschiebung ($\text{MSD}(\tau)$) aus der gemessenen Autokorrelationsfunktion $\hat{g}_{\text{gemessen}}(\tau)$ berechnen,

indem man die folgende Gleichung numerisch nach $\text{MSD}(\tau)$ auflöst:

$$\hat{g}_{\text{gemessen}}(\tau) = g_{\text{MSD}}(\tau). \quad (2.11.9)$$

2.11.2.2. Triplettdynamik

Wie in Abschnitt 2.10.4 bereits erläutert, können Fluorophore zeitweise in einen Tripletzustand übergehen. Dieses führt zu einem Blinken der Farbstoffe, welches ebenfalls Fluktuationen der Intensität verursacht. Diese Blinkdynamik lässt sich wie in [120] gezeigt im FCS-Fitmodell berücksichtigen, indem man folgenden Faktor an die Modellfunktion multipliziert:

$$X_{\text{triplett}}(\tau) = \frac{1 - \theta_T + \theta_T \cdot \exp(-\tau/\tau_T)}{1 - \theta_T}. \quad (2.11.10)$$

Die mittlere Lebensdauer des Triplet-Zustands ist hier τ_T und θ_T ist der mittlere Anteil der N Teilchen, die sich zu jeder Zeit im Triplet-Zustand befinden. Damit ist N die Summe aus leuchtenden Fluorophoren und den Fluorophoren im dunklen Triplet-Zustand.

2.11.3. Datenauswertung

2.11.3.1. FCS-Autokorrelation

Für die Auswertung der meisten Autokorrelationsdaten in dieser Arbeit wurde ein Fit-Modell verwendet, das zwei normal in 3 Dimensionen diffundierende Komponenten und das Tripletblinken berücksichtigt. Diese verschiedenen Komponenten können als Summe der 1-Komponenten-Autokorrelationsfunktion in Gleichung (2.11.6) dargestellt werden [119]:

$$g(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1 - \theta_T + \theta_T \cdot \exp(-\tau/\tau_T)}{1 - \theta_T} \cdot \sum_{i=1}^2 \rho_i \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\gamma^2 \cdot \tau_{Di}}\right)^{-1/2} \quad (2.11.11)$$

Der Parameter N steht dabei wieder für die Gesamt-Partikelzahl (incl. dunkler Partikel), τ_{Di} ist die Diffusions-Korrelationszeit und ρ_i ist die Fraktion der Partikelzahl der i -ten diffundierenden Spezies. Diese Gleichung enthält auch den Triplet-Faktor (siehe Gleichung (2.11.11)) Für die Datenauswertung wurde die Software QuickFit 3.0 (QF3) benutzt [121].

2.11.3.2. MSD

Für die Berechnung der MSD-Kurven aus den FCS-Daten wird eine Transformation der Autokorrelationskurven mit Gleichung (2.11.9) durchgeführt. Diese Transformation ermittelt die mittlere quadratische Verschiebung des Polymers für jede Verzögerungszeit τ . Für die Transformation der

gemessenen FCS-Autokorrelationskurven in MSD-Kurven wurde das MSD-Plugin der Software QuickFit 3.0 (QF3) benutzt [121].

Zur weiteren Auswertung der MSD-Kurven wurden diese typischerweise in zwei Zeitregime geteilt. An die Daten jedes Regims wurde mit den MSD-Plugin ein Potenzgesetz $\text{MSD}(\tau) = 6\Gamma \cdot \tau^\alpha$, bzw. das Diffusionsgesetz $\text{MSD}(\tau) = 6D\tau$ gefittet. Dies ist in Abbildung 2.16 exemplarisch gezeigt.

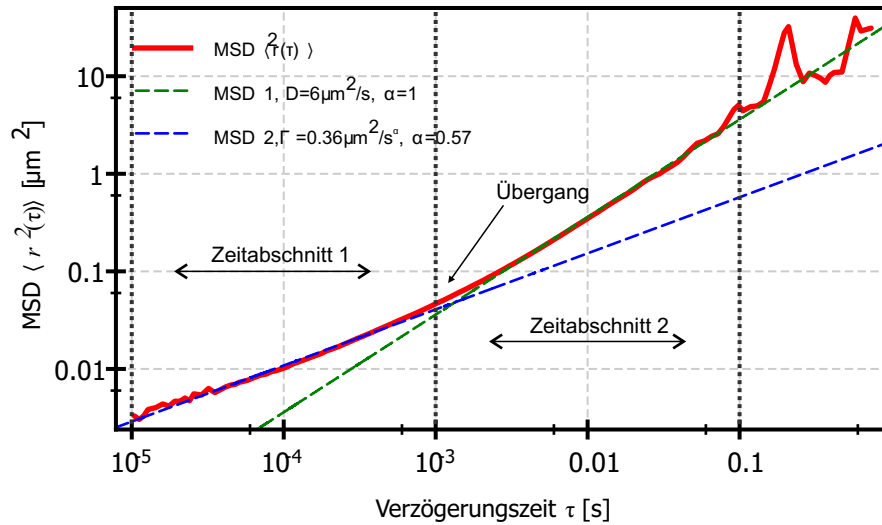


Abbildung 2.16.: Auswertung der MSD-Daten. Beispiel für eine MSD-Kurve für negativ superhelikale pUC18-1A Plasmide.

2.11.3.3. Maximale Entropie-Verteilung (MaxEnt)

Die Daten der Nukleosomen-Stabilität wurden zunächst mittels der Maximum-Entropie Methode ausgewertet (MaxEnt) [122, 123]. MaxEnt extrahiert nicht nur zwei oder drei Komponenten aus der Autokorrelationsfunktion, wie in Gleichung (2.11.11), sondern fittet eine ganze Verteilung $p(\tau_D)$ solcher Komponenten mit Diffusionszeiten τ_D . Diese Verteilung muss dabei eine maximale statistische Entropie aufweisen, das heißt sie muss bei einer Gleichverteilung möglichst ähnlich sein, und die Daten gleichzeitig gut beschreiben. Dieses Verfahren erlaubt es aus den begrenzten Messdaten die Verteilung (mit sehr vielen Parametern) zu bestimmen. Das MaxEnt-Fit-Modell berücksichtigt auch den Triplett und hat folgende Form:

$$g(\tau) = \left(\frac{1 - \theta_T + \theta_T \cdot \exp(-\tau/\tau_T)}{1 - \theta_T} \right) \cdot \sum_{i=1}^{N_{\text{MEM}}} p(\tau_i) \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i} \right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\gamma^2 \cdot \tau_i} \right)^{-1/2} \quad (2.11.12)$$

Hierfür wurde die MaxEnt Implementierung in QF3 von N. Schnellbacher benutzt [121].

2.11.3.4. Ausschluss von Messartefakten

Messartefakte können z.B. durch Aggregation der diffundierenden Moleküle ausgelöst werden. Um den statistischen Fehler der Messungen möglichst klein zu halten, wurden Messungen die Artefakte enthielten vor der Auswertung aussortiert.

Als Beispiel für die Auswirkung von Aggregaten auf die FCS-Messdaten zeigt Abbildung 2.17 a) eine Messfolge von 20 Einzelmessungen a 1 min von pUC18-1A-Plasmiden mit 1-2 Nukleosomen pro Plasmid. Die rot markierte Einzelmessung enthält ein Artefakt, ausgelöst durch Aggregate, die die Amplitude deutlich über den Durchschnitt erhöhen und die Kurvenform verzerren. Dies erhöht den Mittelwert über alle Messungen (in blau). Durch den Ausschluss einer solchen Autokorrelationskurve sinkt der Mittelwert über die verbleibenden Messungen wieder in den normalen Bereich (siehe Abbildung 2.17 b).

Zusätzlich wurden vor jedem Fit die ersten 3-10 Verzögerungszeiten abgeschnitten, um den dort sichtbaren starken Anstieg der Kurven zu entfernen. Dieser wird nicht von der Probe, sondern von dem Nachpulsen der Detektoren des Mikroskops erzeugt. Dabei werden manchmal fälschlicherweise pro einfallendem Photon zwei gezählt.

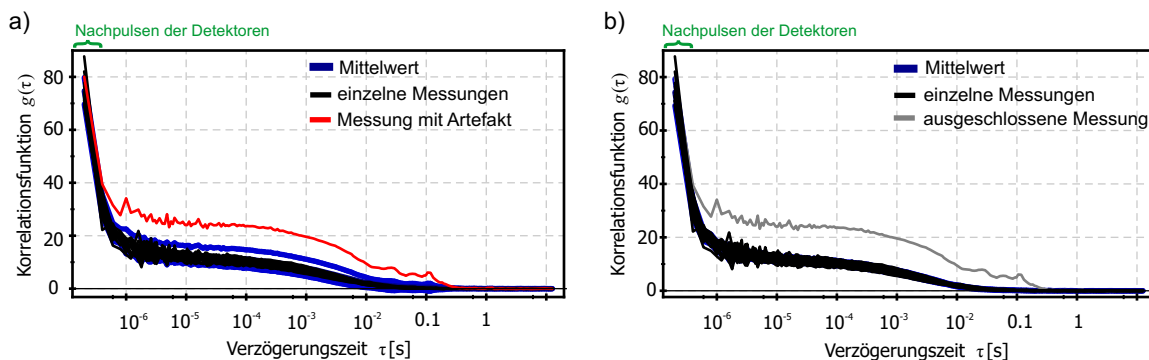


Abbildung 2.17.: Messartefakte in FCS-Autokorrelationskurven. a) Autokorrelationskurven einer Messung vor dem Ausschluss des Messartefakts (rote Kurve) und b) nach dem Ausschluss. Die blaue Kurve gibt den Mittelwert über alle Messkurven wieder.

2.11.4. optischer Aufbau

Das in dieser Arbeit verwendete Mikroskop ist ein in unserer Abteilung selbst gebautes konfokales Mikroskop welches auf einem invertiertem Olympus IX-70 Mikroskop mit einem UPlanApo IR 60x NA=1.2W Objektiv basiert [124]. Ein Argon/Krypton Laser(CVI Melles Griot, Bensheim, Germany), sowie ein Dioden-Laser (Calypso-25, Cobalt SE, Schweden) lieferten das Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm, bzw. 491 nm.

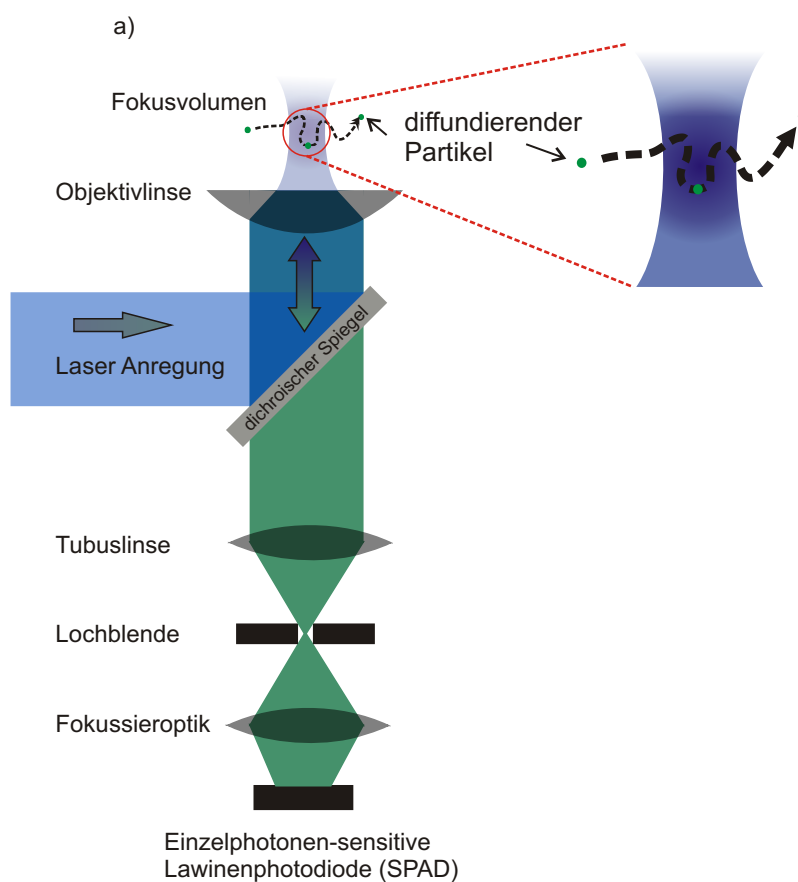


Abbildung 2.18.: Schematische Zeichnung des Aufbaus eines konfokalen Mikroskops, wie es für FCS-Messungen verwendet wird.

Das Laserlicht wird gefiltert und durch einen opto-akustischen Modulator (AOTF Nc, AA Opto Electronic, Frankreich) in der Intensität moduliert. Die Intensität des Lichtstrahls wird auf $10\ \mu\text{W}$ über der Objektivlinse reduziert. Das Fluoreszenzlicht wird schließlich durch einen Strahlenteiler (dichroitischer Spiegel) vom Anregungslicht getrennt und räumlich durch eine Lochblende (pinhole) gefiltert. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht durch einen Bandpass Filter auf eine Lawinenphotodiode projiziert (APD, SPCM-AQR13, Parkin Elmer). Die Korrelationsfunktion des Fluoreszenzlichts wurde mittels der ALV-5000/E Autokorrelatorkarte durchgeführt (ALV GmbH, Langen).

2.11.5. Gerätekalibrierung

Das Fokusvolumen des Mikroskops wurde nach der Justage und Einstellung der Deckglas-korrektur des Objektivs auf die maximale Korrelationsamplitude an jedem Messtag kalibriert. Hierfür wurde eine $20\ \text{nM}$ Lösung des Fluorophors Alexa-488 verwendet. Der angenommene

Diffusionskoeffizient für Alexa-488 liegt bei $D_{20,W} = 407 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [125]. Durch die Gleichung:

$$w_{xy} = \sqrt{4D\tau_D} \quad (2.11.13)$$

die sich aus Gleichung (2.11.2) ergibt, lässt sich zunächst die Breite (w_{xy}) des Fokusvolumens bestimmen und somit auch das Fokusvolumen V_{Fokus} mit folgender Gleichung:

$$V_{\text{Fokus}} = \pi^{3/2} \cdot w_{xy} \cdot \gamma. \quad (2.11.14)$$

Die Halbwertsbreite des Fokusvolumens war im Durchschnitt $w_{xy} = 290 \text{ nm}$.

Die zu vermessenen Proben wurden in TE-Puffer verdünnt (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5). Für alle Salz-abhängigen Messungen wurde die entsprechende Menge einer NaCl Lösung (2M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7,5) zugesetzt.

2.12. Sequenz-spezifischen Plasmid-Markierung mittels Peptid-Nukleinsäuren (PNA)

Zu Beginn des Projekts sollten die Fluorophor-Markierungen durch PNA (PNA: peptide nucleic acid) in die Plasmide eingebracht werden [126]. Peptid-Nukleinsäuren sind künstliche Hybrid-Moleküle aus einem Peptidrückgrat und DNA-Basen, die sequenzspezifisch an DNA binden können. Da PNA im Gegensatz zur DNA ungeladen ist, sind die Wechselwirkungen zwischen PNA und DNA stärker als zwischen einem DNA-Oligomer und doppelsträngiger DNA. PNA kann invasiv oder nicht-invasiv binden. Invasiv verdrängt sie den Abschnitt des komplementären

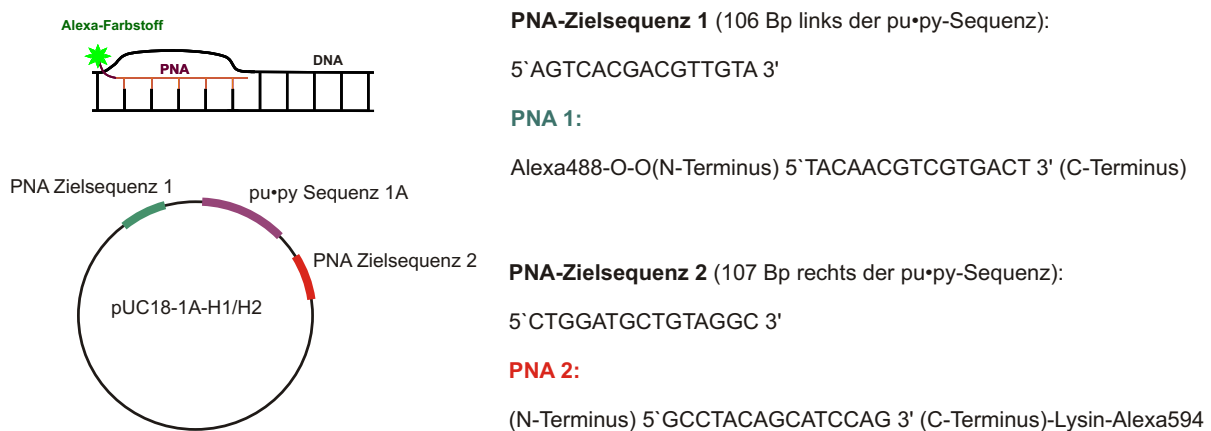


Abbildung 2.19.: Aufbau und Bindung der PNA-Sequenzen.

Stranges und bindet über normale Wasserstoffbrücken. Die nicht invasive Bindung erfolgt über Hoogsten Bindung [126]. Die Idee hinter der PNA-Markierung war, superhelikale DNA unabhängig von einklonierten Bindungssequenzen, in einem möglichst einfachen DNA-schonenden Verfahren und nicht kovalent zu markieren. Hierzu sollte einzelsträngige PNA verwendet werden um an ausgewählte Sequenzen des pUC18 Plasmids zu binden. Da in diesem Verfahren, zumindest in der Theorie, keine zusätzlichen Schritte zu weiteren DNA-Aufreinigungen nötig gewesen wären, sollte dieses Verfahren die Plasmidstruktur, insbesondere die Torsionsspannung gut erhalten.

PNA bildet leicht Sekundärstrukturen aus. Daher wurden die verwendeten Sequenzen nach den vorgegebenen Regeln der Hersteller erstellt um die Wahrscheinlichkeit solcher PNA-Sekundärstrukturen zu minimieren und somit die Bindungswahrscheinlichkeit an die DNA zu erhöhen: Die Gesamtlänge der Sequenzen 18 PNA-Basenpaare nicht überschreiten da die Aggregations-Wahrscheinlichkeit mit steigender Sequenz-Länge steigt. Der Puringehalt der Sequenz sollte 60% nicht überschreiten, da die Löslichkeit der PNA-Oligomere mit steigendem Puringehalt sinkt. Bei der Auswahl der Sequenzen muss auch darauf geachtet werden Sekundärstruktur-bildende Basenabfolgen, wie z.B. Palindrome oder Haarnadelschleife, zu vermeiden. Abbildung 2.19 gibt einen Überblick über den Aufbau der PNA-Sequenzen, sowie die anvisierten Bindungsstellen im Plasmid.

Diese Art der Plasmid-Markierung war nicht erfolgreich. Zwar haben die PNA Oligomere spezifisch an ihre kurzen antiparallelen Zielsequenzen in einzel- und doppelsträngiger Form gebunden, die Bindung an superhelikale Plasmide konnte jedoch nie nachgewiesen werden. Für die Überprüfung der Bindung wurden Gel-Elektrophoresen und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) verwendet. Verschiedene Parameter, wie Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur und Zeit wurden variiert.

Abbildung 2.20 zeigt typische Ergebnisse beim Test der spezifischen Bindung der PNA-Sequenzen an kurze komplementäre DNA-Duplex-Sequenzen. Da PNA ein ungeladenes Molekül ist, wandert es nur durch das Gel, wenn es an DNA gebunden ist. Die Bindung kommt nur zwischen komplementären Sequenzen zustande (PNA 1:DNA-Duplex 1, PNA 2:DNA-Duplex 2).

Nach dem erfolgreichen Binden der PNA an kurze DNA-Fragmente, wurde die Bindung pUC18-Plasmiden mittels FCS untersucht. Freie PNA diffundiert schnell, während PNA an Plasmide gebunden deutlich verlangsamt werden sollte.

Abbildung 2.21 b) zeigt die auf die Teilchenzahl normalisierten Autokorrelationskurven aus den FCS-Messungen der verschiedenen Proben (Durchführung, Messparameter und Auswertung siehe Abschnitt 3.2). Wie aus dem Graphen ersichtlich wird ist die Autokorrelationskurve für

das TFO-markierte Plasmid nach rechts, in Richtung höhere Verzögerungszeiten τ verschoben. Durch die TFO-Markierung der Plasmide wird ihre Diffusion sichtbar und zeigt sich in deutlich niedrigeren Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu den anderen Proben.

Abbildung 2.21 a) zeigt die Diffusionskoeffizienten der verschiedenen gemessenen Proben (oberer Graph) sowie ihre Diffusionszeiten (unterer Graph). Es wurden sowohl freie PNA (grün), PNA-DNA-Komplexe (blau) als auch PNA-pUC18-1A-Mischungen gemessen (magenta). Zum Vergleich sind auch erfolgreich mittels TFO4 markierte Plasmide (türkis) gezeigt (siehe Abschnitt 2.6). Hier sticht deutlich die Probe der TFO-markierten Plasmide heraus (türkis). Mit einem Diffusionskoeffizienten von $D = (5,5 \pm 0,04) \mu\text{m}^2/\text{s}$ liegt sie weitab der anderen Proben, bei denen nur die Diffusion der PNA zu sehen ist (PNA in grün, PNA/Plasmid in magenta). Im Vergleich zu der reinen PNA-Probe kommt es bei der Kombination der PNA mit der kurzen komplementären DNA-Duplex-Sequenz (Sequenz 1, PNA 1) zu einer Bindung, die zu einer Verringerung des Diffusionskoeffizienten von $D = (207 \pm 31) \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf $D = (125 \pm 6,4) \mu\text{m}^2/\text{s}$ führt (blau).

Der Diskussion mit Prof. Frank-Kamenetskii (Boston University, USA), einem Spezialisten

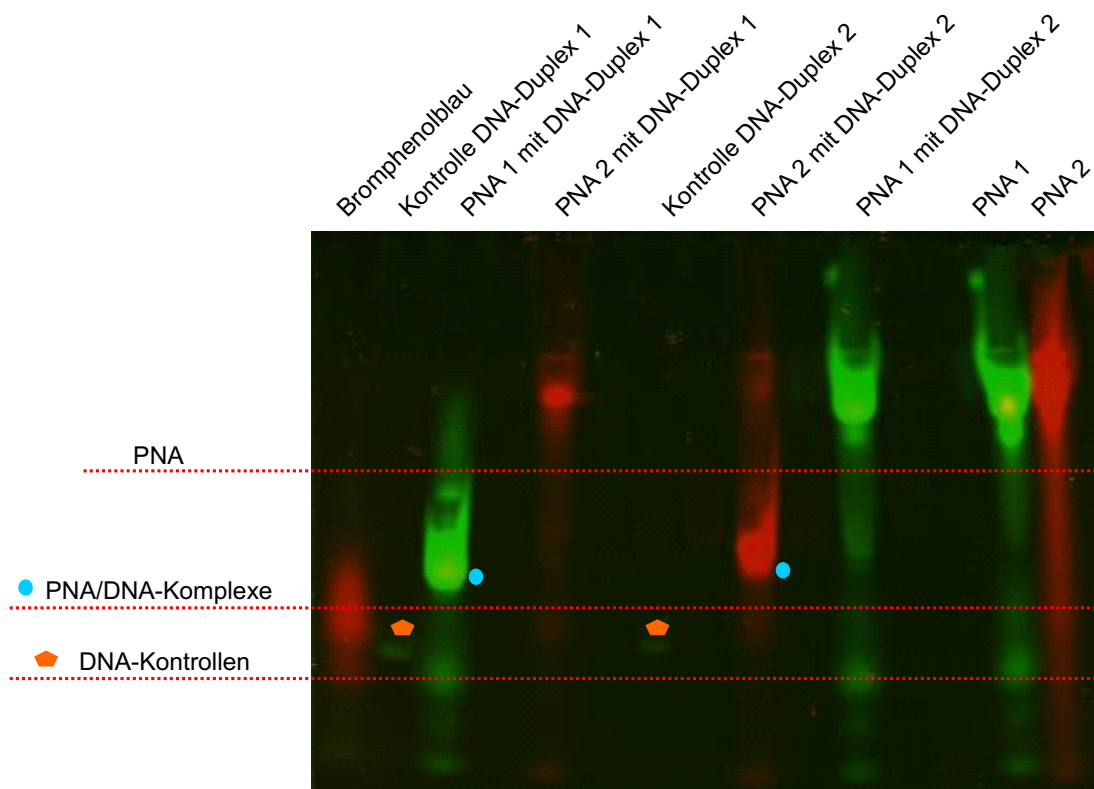


Abbildung 2.20.: PNA-Bindungsstudie im Gel. Die ungeladene PNA läuft im Gel nur, wenn sie an geladene DNA gebunden ist. Das Gel zeigt spezifische Bindung zwischen PNA-1 und DNA-Duplex-1 und PNA-2 an Duplex-2. Die PNA-DNA-Duplex Komplexe laufen aufgrund der höheren Masse etwas langsamer als die DNA allein.

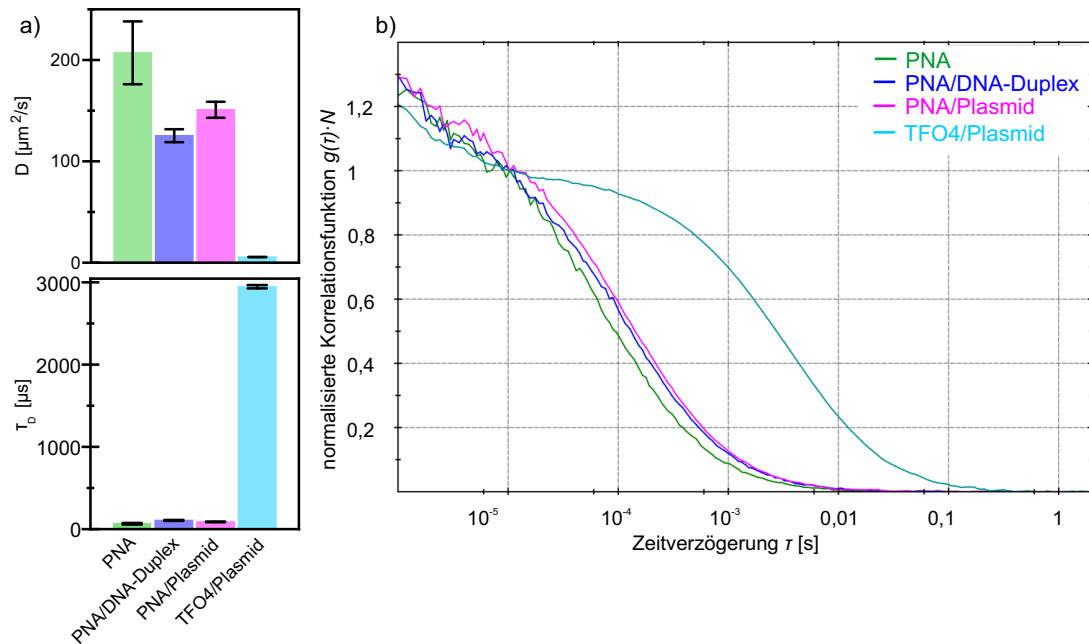


Abbildung 2.21.: PNA-Bindungsstudie mit FCS. b) zeigt die normalisierten Autokorrelationskurven der unterschiedlichen Proben. Nur das TFO-Oligomer (TFO4) bindet stabil an das Plasmid wie durch die große Verschiebung der Kurve in größere Verzögerungszeiten τ sichtbar ist. a): die erfolgreiche Markierung der Plasmide durch TFO4 wird im oberen Plot durch die große Verringerung des Diffusionskoeffizienten im Vergleich mit den anderen Proben. Der untere Plot zeigt die Bindung mit dem Anstieg der Diffusionszeit.

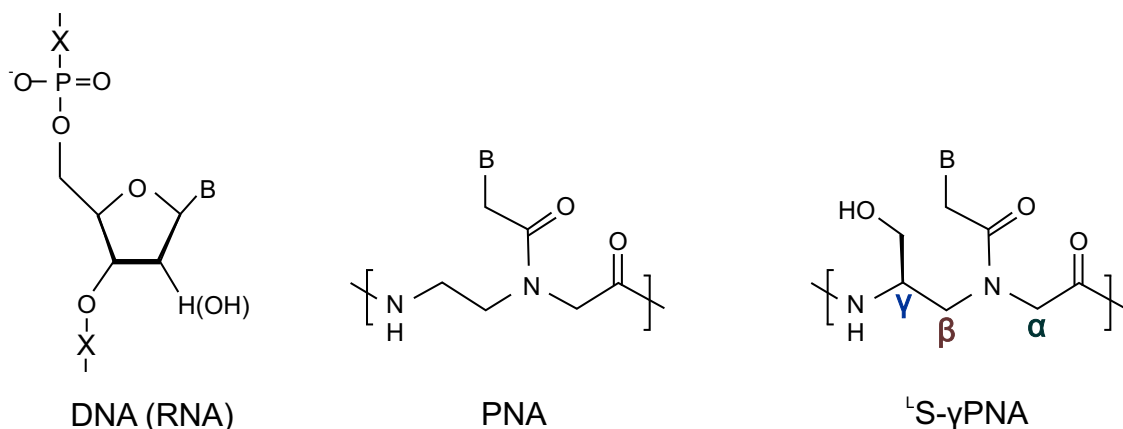


Abbildung 2.22.: Strukturformeln der DNA- und PNA-Struktur. B ist jeweils die Base, die in DNA und PNA gleich ist.

für PNA-Markierungen, brachte Klarheit über die Gründe der nicht erfolgten PNA-Plasmid Bindung. Die Bindungsenergie der einzelsträngigen PNA in ihrer Grundform reicht nicht aus um zufällig ausgewählte Sequenzen in Plasmid-DNA zu markieren. Bis zum heutigen Tag gibt es nur eine erfolgreiche Plasmid-Markierungsmethode durch Anlagerung einzelsträngiger PNA: sogenannte γ -PNA. Diese Form der PNA besitzt eine Modifikation im Rückgrat in der γ -Position der N-(2-Aminoethylglycin)-Einheit. Diese Modifikation transformiert die eher zufällig gefaltete Form der einzelsträngigen PNA sterisch in eine rechtsgängige Helix durch die Einführung eines chiralen Zentrums [127, 128]. Dies erleichtert wiederum die Bindung an die Plasmid-DNA. Aufgrund der hohen Kosten der γ -PNA Sequenzen und ihrer aufwendigen Charakterisierung, wurde dann für die Messungen in dieser Arbeit die etablierte Methode der Markierung mittels TFO gewählt (siehe Abschnitt 2.6).

Teil III.

Ergebnisse

3. Interne Dynamik superhelikaler DNA

3.1. Einleitung

Wie in der Einleitung (siehe Abschnitt 1.4) bereits ausführlich diskutiert, spielt die DNA-Dynamik eine wichtige Rolle bei den zeitlichen Abläufen zellulärer Prozesse, wie z.B. der Transkription. Die DNA-Dynamik wurde am Modell eines superhelikalen Plasmids unter verschiedenen Umgebungsbedingungen untersucht. Auch die Veränderungen der internen DNA-Dynamik durch die Verpackung der Plasmid-DNA in Nukleosomen wurde vermessen.

Die nachfolgenden Experimente basieren auf FCS. Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass nicht wie bei der Lichtstreuung über die Bewegungen der gesamten Moleküle bzw. alle ihrer Segmente gemittelt wird, sondern nur die Bewegungen einzeln fluoreszent markierter Stellen auf der DNA beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden DNA Plasmide unterschiedlicher Torsionsspannung verwendet, die mittels Tripelhelix formenden Oligonukleotiden (TFO) an zuvor einklonierten Bindestellen fluoreszent markiert wurden. Die Bewegungen des Fluorophors ist direkt an die Bewegung der DNA gekoppelt. Die gemessenen FCS Daten lassen sich als mittlere quadratischer Verschiebungen (MSD), die direkt aus den gemessenen FCS Daten berechnet werden, darstellen. Mit dieser Technik können Einflüsse auf die interne Dynamik einzelner DNA-Segmente gut aufgelöst werden.

Im folgenden Abschnitt 3.2 werden Messungen zum Einfluss der Torsionsspannung dargestellt. Abschnitt 3.3 behandelt den Einfluss von Salz und Abschnitt 3.4 untersucht den Einfluss der Viskosität des umgebenden Mediums auf die interne DNA-Dynamik. Im Abschnitt 3.5 werden die Ergebnisse von Dynamikmessungen an Plasmiden vorgestellt, die durch Bildung von Histonen in unterschiedlichem Maße kompaktiert wurden.

3.2. Interne Dynamik unterschiedlicher Topoisomere mittels FCS

3.2.1. Experimentdurchführung

Um den Einfluss der Torsionsspannung auf die interne DNA-Dynamik zu vermessen wurden zwei verschiedene Topoisomere des Plasmids pUC18-1A-H1/H2 verwendet (siehe Abschnitt 5). Die Topoisomere eines Plasmids unterscheiden sich in der Stärke ihrer Torsionsspannung. Das erste benutzte Topoisomer ist die native Form des Plasmids, die mit einer Torsionsspannung von $\sigma = -0.046$ zwischen 10 und 11 superhelikale Überwindungen pro Plasmid aufweist. Das zweite Topoisomer wurde im Vorfeld der Messungen mittels Topoisomerase I relaxiert (siehe Abschnitt 5) und hatte somit eine Torsionspannung von $\sigma = 0$. Die Proben wurden mittels Gel-Elektrophorese auf die vollständige Relaxierung des Plasmids kontrolliert (siehe Abschnitt 5). Um die Plasmide mittels Fluoreszenz Korrelationsspektroskopie (FCS) untersuchen zu können wurden die Plasmide mit Triple-Helix bildenden Oligonukleotiden fluoreszent markiert. Hierbei wird an einer zuvor einklonierten DNA Sequenz ein Fluorophor-tragendes Oligonukleotid kovalent mittels UV-Aktivierung von Psoralen in die DNA eingebracht (siehe Abschnitt 5.4). Alle Messungen wurden in TE-Puffer (pH 7,5) durchgeführt.

Die gezeigten Daten stammen aus drei unabhängigen Wiederholungen des Experiments. In jeder Wiederholung wurden die Proben jeweils 20 Mal vermessen, wobei jede Messung über 2 Minuten lang war. Die Laserleistung wurde so eingestellt, dass sie $10 \mu\text{W}$ über dem Objektiv betrug. Je höher die Laserstärke, desto höher der Anteil der vom Fluorophor stammenden Photophysik (z.B. Triplet). Da die Zeitskalen auf denen die interne Dynamik der DNA sichtbar wird mit der der Photophysik des Fluorophors überlappt, und um den Anteil der Photophysik möglichst klein zu halten wurde die Laserstärke als Kompromiss zwischen der Photophysik und der gemessenen Photonenzahl pro Molekül gewählt. Für die FCS Messungen, wurden die Proben auf eine Endkonzentration von etwa 2 nM verdünnt. Artefakte in einzelnen Messkurven wurden eliminiert, indem die betroffenen Autokorrelationskurven vor der Auswertung aussortiert wurden (siehe Abschnitt 2.11.3). Solche Artefakte können z.B durch größere Schwankungen der Teilchenzahl hervorgerufen werden. An den Mittelwert der verbliebenen Messkurven wurden verschiedene theoretische FCS-Modellfunktionen gefittet (siehe Abschnitt 2.11.3).

3.2.2. Ergebnisse der FCS Autokorrelationsfits

Abbildung 3.1 zeigt die, mit der Teilchenzahl normalisierten Autokorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau). Diese Verschiebung kommt durch die kompaktere

Struktur des superhelikalen Plasmids zustande: Zu sehen ist eine leichte Verschiebung der Kurve in Richtung kürzere Verzögerungszeiten τ für das Plasmid mit der hohen negativen Torsionsspannung. Dies wird in Abbildung 3.2 illustriert. Sie zeigt zwei SFM-Aufnahmen eines superhelikalen (a) und eines relaxierten pUC18-Plasmids (b). Wie man erkennen kann, führen die Superhelixwindungen zu einem kleineren Durchmesser des Moleküls. Dies äußert sich nach der Stokes-Einstein-Beziehung in einem höheren Diffusionskoeffizienten als bei relaxierten Proben gleicher Konturlänge. Die als Polygon dargestellten Fehler (ähnlich groß wie die Linienbreite) der Kurve zeigen die Standardabweichung zwischen den einzelnen Wiederholungen des Experiments.

Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der FCS-Fits an die Daten aus Abbildung 3.1. Für diese wurden zwei diffundierenden Komponenten angenommen (siehe 2.11.3), da sich zeigte, dass für diese Proben eine einzige diffundierende Komponente nicht ausreicht, um die Kurven gut zu beschreiben. Abbildung 3.3 (c) zeigt die Diffusionskoeffizienten der langsamen Komponente (D_2). Für Plasmide mit $\sigma = 0$ ist der Diffusionskoeffizient mit einem Wert von $D_2 = (4,97 \pm 0,13) \mu\text{m}^2/\text{s}$ etwas langsamer als für Plasmide mit $\sigma = -0,046$, hier ergab sich $D_2 = (4,1 \pm 0,22) \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dies erklärt sich, wie bereits erwähnt, durch die Kompaktierung des superhelikalen Moleküls gegenüber dem relaxierten Molekül. Die Diffusionskoeffizienten sind vergleichbar mit Daten, die aus Brownian-Dynamics-Simulationen stammen, die von Wocjan et al. durchgeführt

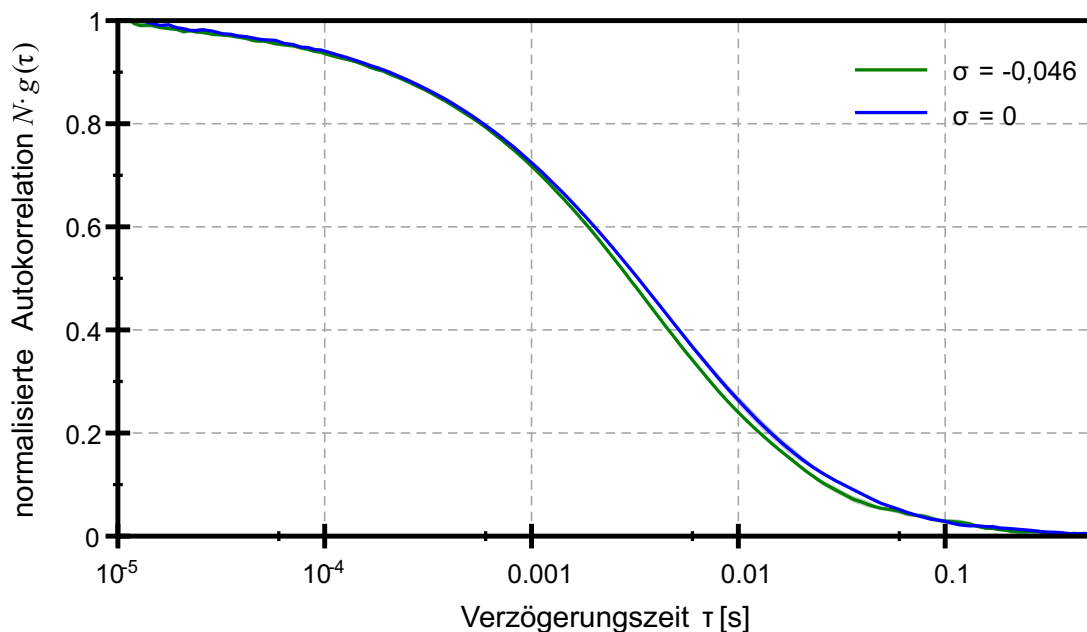


Abbildung 3.1.: FCS-Autokorrelationskurven für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau). Die Fehler (Polygon um die Kurven) sind die Standardabweichungen zwischen den Wiederholungen des Experiments. Der Fehler ist fast überall kleiner als die Linienbreite im Plot.

wurden (siehe [36]). Hier waren die Werte für die Diffusionskoeffizienten $3,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei $\sigma = 0$ und $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei $\sigma = -0,046$. Nach der Stokes-Einstein-Gleichung entsprechen die zwei gemessenen Diffusionskoeffizienten hydrodynamischen Radii von $R_H = (58,8 \pm 3,2) \text{ nm}$ (für $\sigma = 0$) und $R_H = (48,2 \pm 1,2) \text{ nm}$ (für $\sigma = -0,046$).

Wie in Abbildung 3.3 (a) zu sehen ist, verlangsamt sich auch die schnell diffundierende Komponente D_1 durch die Relaxierung des Plasmids von $D_1 = (121,93 \pm 26) \mu\text{m}^2/\text{s}$ für $\sigma = -0,046$ auf $D_1 = (67,11 \pm 10) \mu\text{m}^2/\text{s}$ für $\sigma = 0$. Andererseits steigt der Anteil ρ_1 der schnellen Komponente etwas an. Der Effekt auf die Diffusionskoeffizienten zeigt sich gleichwertig auch in den Diffusionszeiten τ_{D1} und τ_{D2} (siehe Abbildung 3.3 (b) und (d)). Eine genauere Analyse dieser schnellen Komponente, die auf die interne Dynamik zurückzuführen ist, erfolgt mit einer anderen Auswertungsmethode im nächsten Unterabschnitt.

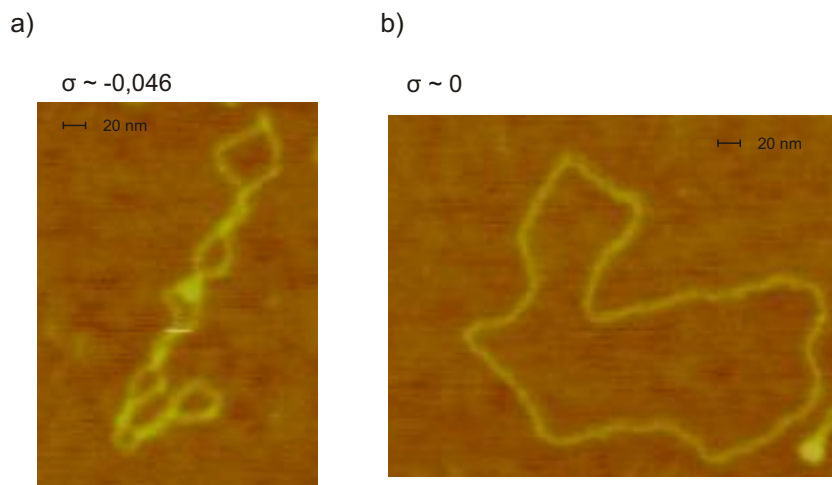


Abbildung 3.2.: Beispiele für Rasterkrafttopographien von den verwendeten pUC18 Plasmiden mit Torsionsspannungen von (a) $\sigma = -0,046$ und (b) $\sigma = 0$.

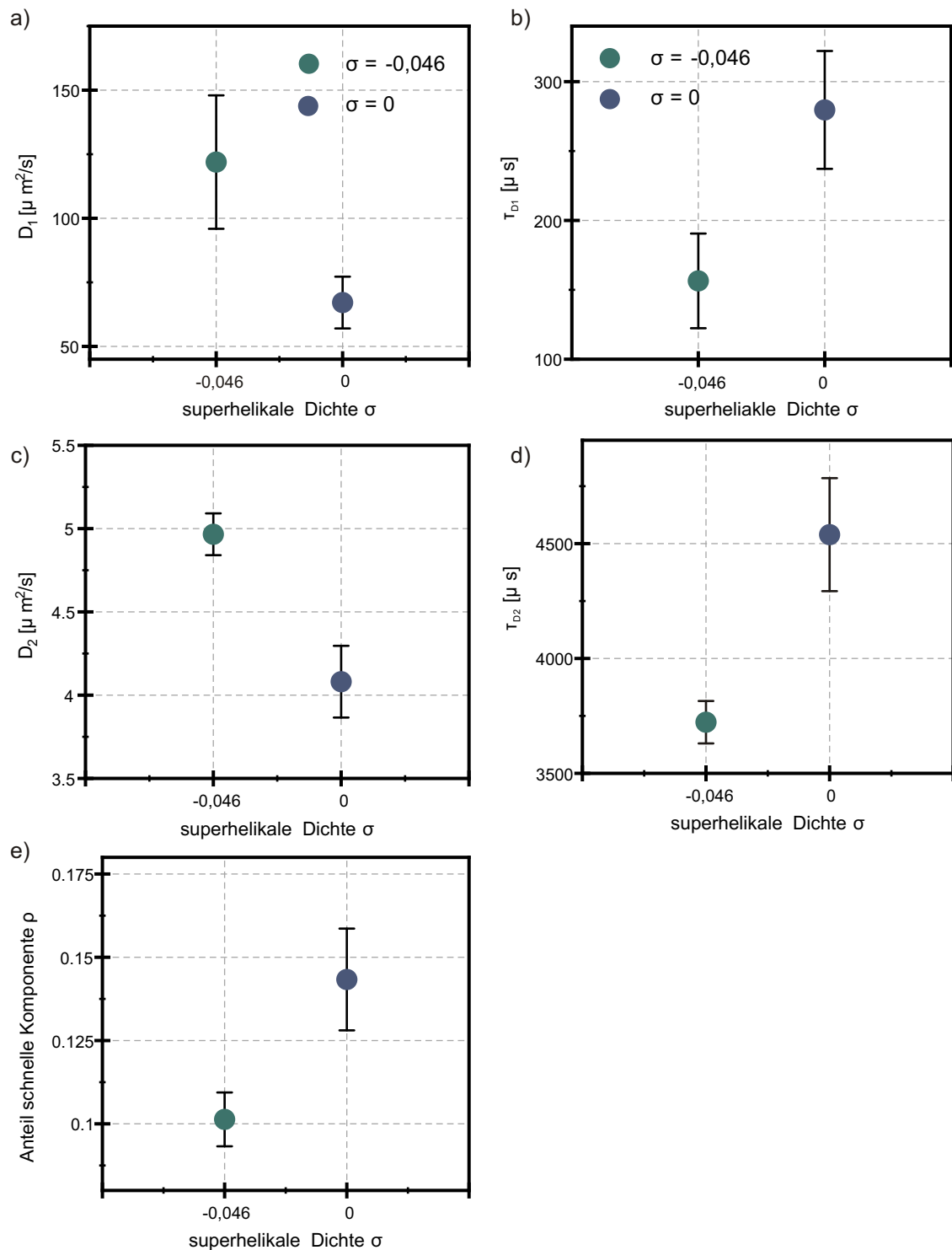


Abbildung 3.3.: Ergebnisse der FCS Fits der Autokorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau). (a) und (c) zeigen die Diffusionskoeffizienten für zwei angenommene diffundierenden Komponenten. (b) und (d) zeigen die korrespondierenden Diffusionszeiten. (e) gibt den Anteil der schnell diffundierenden Komponente wieder. Die Fehler sind die Standardabweichungen zwischen den Wiederholungen des Experiments.

3.2.3. Messung der internen Dynamik über MSD

In diesem Unterabschnitt wird die Dynamik der DNA genauer untersucht, indem MSD-Kurven analysiert werden, die sich aus den FCS-Daten berechnen lassen. Dies ermöglicht genauere Aussagen über die Dynamik und eine Unterscheidung globaler und interner Dynamik.

Für die Berechnung der MSD-Kurven aus den FCS-Daten wird eine Transformation der Autokorrelationskurven durchgeführt (siehe 2.11.3). Diese Transformation ermittelt die mittlere quadratische Verschiebung des Polymers für jede Verzögerungszeit τ . Dies wird möglich durch die Kopplung der Bewegung des Farbstoffs mit der Bewegung des damit verbundenen Plasmids. In dieser Form der Darstellung, zeigt sich auf großen Zeitskalen ($\tau \geq 10^{-3}$ s) ein linearer Anstieg der MSD-Kurve, der der Schwerpunktsbewegung (globale Diffusion) des gesamten Moleküls entspricht und nach der Einstein Relation der Funktion $\langle r^2(\tau) \rangle = 6D_2\tau$ folgt (siehe rote Linie in Abbildung 3.4). Wie bereits aus den FCS-Fits ersichtlich lässt sich auch hier feststellen, dass sich der Schwerpunkt der superhelikalen Plasmide schneller bewegt (die grüne Kurve liegt über der blauen Kurve).

Auf kürzeren Zeitskalen zeigt sich eine Abweichung von $6D_2\tau$. Es zeigt sich ein leichter Anstieg der MSD-Kurve zwischen 10^{-4} s und 10^{-3} s. In diesem Bereich der Zeitskala kommt es also zu einer Beschleunigung gegenüber der Schwerpunktsbewegung. Diese Beschleunigung

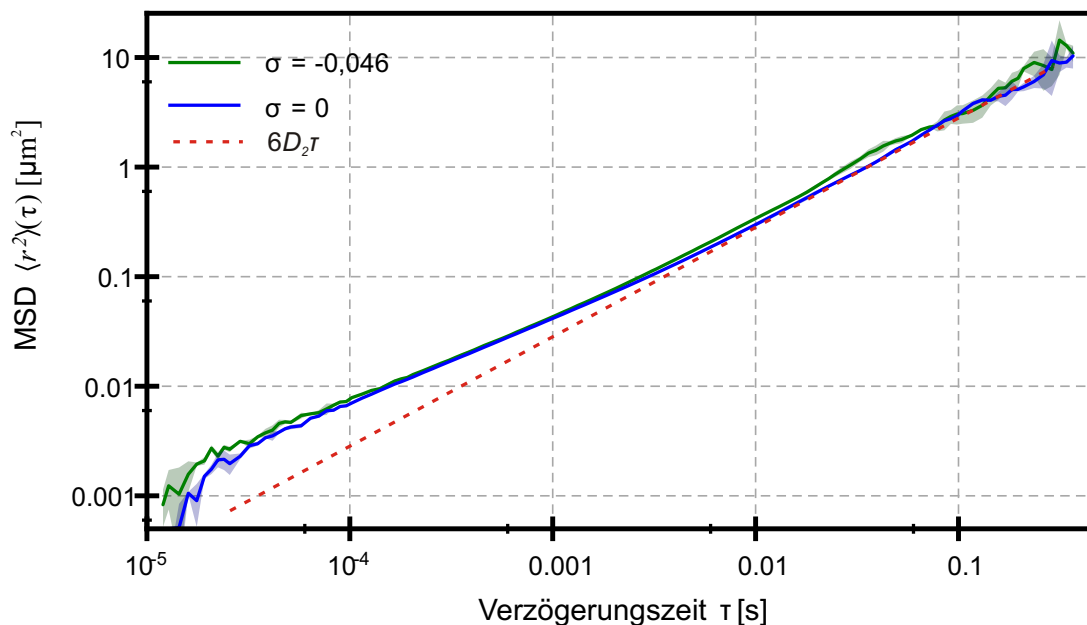


Abbildung 3.4.: Ergebnisse der MSD Transformation der Autocorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau) . Die Fehler sind die Standardabweichungen zwischen den Wiederholungen des Experiments. Die rote Gerade illustriert ein Verhalten nach der Einstein Relation ($\text{MSD} \propto \tau$).

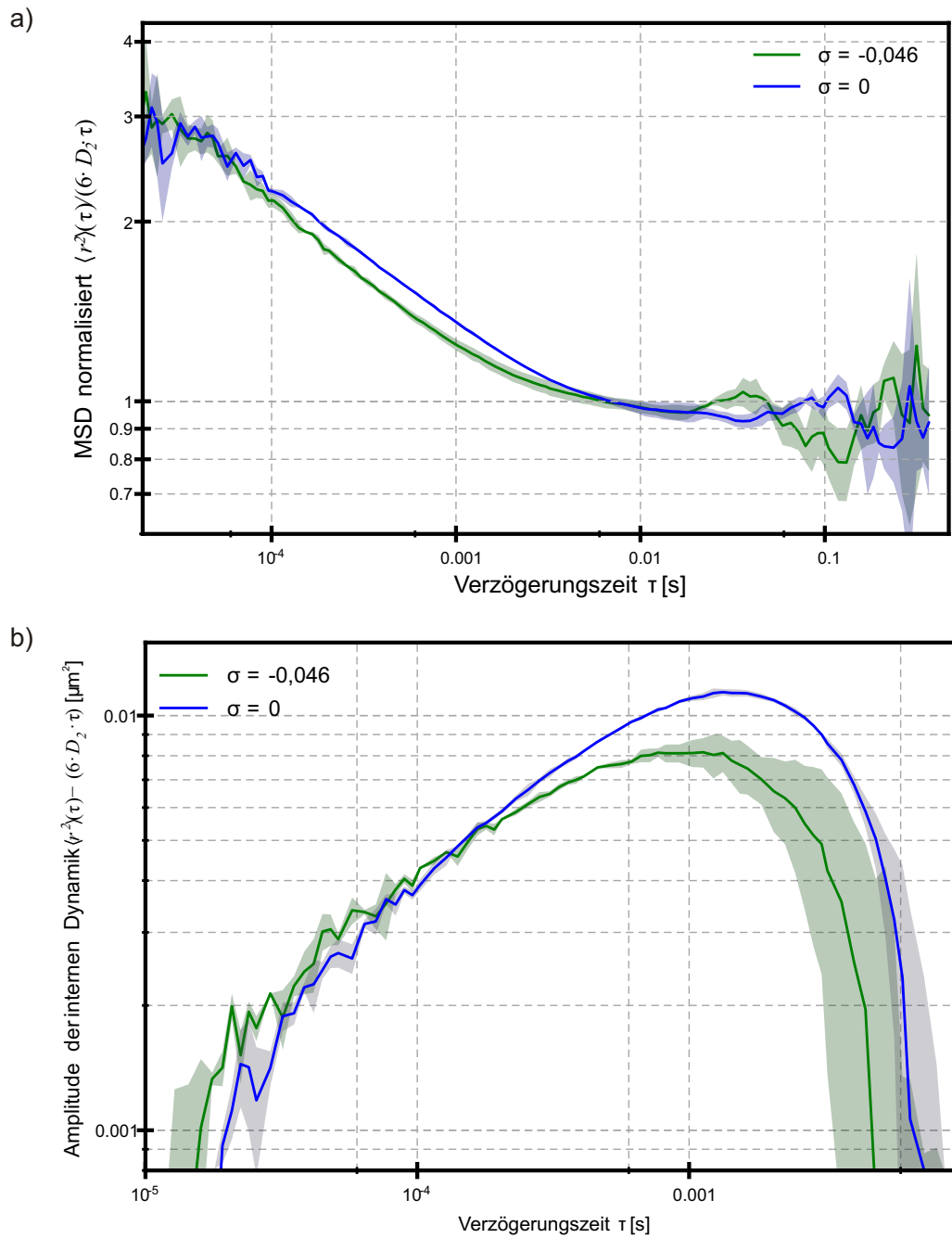


Abbildung 3.5.: Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik durch zwei mathematische Methoden: a) $\text{MSD}/(6D_2\tau)$ und b) $\text{MSD} - 6D_2\tau$ für Plasmide mit $\sigma = 0$ und $\sigma = -0,046$.

kann durch die internen, schnelleren Bewegungen (interne Dynamik) des DNA-Polymers erklärt werden. Auf diesen kürzeren Zeitskalen wird auch ein Unterschied zwischen den zwei Plasmiden deutlich: Die Kurve für die Plasmide mit hoher negativer Torsionsspannung (grün) liegt leicht über der für Plasmide ohne Torsionsspannung (blau). Die MSD-Rohkurven, die in Abbildung 3.4 dargestellt sind, lassen sich nur schwer analysieren, da hier globale und interne Dynamik überlagert sind. Die globale Dynamik muss daher herausgerechnet werden.

Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse zweier Möglichkeiten die globale Diffusion von der internen Dynamik des DNA Polymers zu trennen. Abbildung 3.5 (a) zeigt die Beschleunigung der internen Dynamik relativ zur globalen Diffusion. Hier wird die globale Diffusion von der internen Dynamik getrennt, indem die MSD Kurve durch $6D_2\tau$ geteilt wird ($MSD/6D_2\tau$). Ein Wert von 1 entspricht dann reiner globaler Diffusion, alles was davon abweicht beschreibt die interne Dynamik, gemessen als Beschleunigungsfaktor relativ zur globalen Diffusion zu dieser Verzögerungszeit.

Es wird eine leichte Beschleunigung der relaxierten Probe (blau) gegenüber der negativ superhelikalen (grün) ab einer Verzögerungszeit von $\tau = 10^{-4}$ sichtbar. Für kleinere Zeiten τ lassen sich keine Aussagen über Unterschiede zwischen den Topoisomeren treffen, hier rauschen die Kurven zu stark um zwischen beiden Proben unterscheiden zu können.

In Abbildung 3.5 (b) ist die quadrierte Amplitude der internen Bewegung dargestellt. Hier wird der Anteil der globalen Diffusion von der gesamten Diffusion über alle Zeiten τ abgezogen ($MSD - 6D_2\tau$). Übrig bleibt die absolute interne Bewegung die als quadrierte Strecke (in μm^2) angegeben wird, die das Polymer zu den Verzögerungszeiten τ im Mittel zurückgelegt hat. Die Kurven zeigen auch hier eine leichte Beschleunigung der negativ superheliaklen Probe gegenüber der relaxierten Probe für Verzögerungszeiten τ zwischen ($5 \cdot 10^{-4} - 10^{-2} s$). Für kleinere Zeiten τ ist das Rauschen der Kurven auch hier zu stark um einen Unterschied zu erkennen. In beiden Graphen ist die Standardabweichung der Wiederholungen des Experiments als Fehlerpolygon dargestellt.

Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse einer weiteren Analyse der MSD Daten. Hierfür wurde die Funktion $6D_2\tau$ an lange Zeitskalen ($\tau = 10^{-3} - 10^{-1} s$) gefittet und $6\Gamma\tau^\alpha$ an kurze Zeitskalen ($\tau = 10^{-5} - 10^{-3} s$). ein Beispiel ist in Abbildung 3.6 (a) dargestellt.

Auf großen Zeitskalen lassen sich die MSD-Kurven durch die einfachere Funktion $6D_2\tau$ gut beschreiben ($D_2 =$ für $\sigma = 0$ und $D_2 =$ für $\sigma = -0.046$). Die rein normale Diffusion auf dieser Zeitskala wird wieder als Schwerpunktsbewegung interpretiert. Auf kurzen Zeitskalen erlaubt es das Potenzgesetz $6\Gamma\tau^\alpha$, die Abweichungen von der globalen Dynamik gut zu beschreiben und mit theoretischen Berechnungen zu vergleichen. Aus beiden Fits lässt sich außerdem der Übergangszeitpunkt $\tau_{\text{int} \rightarrow \text{global}}$ zwischen den Regimen als Schnittpunkt der Einzelfits berechnen.

Abbildung 3.6 (b) zeigt den Übergangszeitpunkt $\tau_{\text{int} \rightarrow \text{global}}$ bei dem die interne Dynamik in die globale Dynamik übergeht. Die Probe mit $\sigma = 0$ zeigt im Vergleich mit der Probe mit $\sigma = -0.046$ eine leichte Verschiebung des Übergangszeitpunkts nach rechts auf der Zeitskala und somit in Richtung größere Verzögerungszeiten τ .

Abbildung 3.6 (c) zeigt Änderungen im Anomaliekoeffizienten α für kurze Zeitskalen, der die Steigung der Kurve im Doppelt-logarithmischen Plot in diesem kurzzeitigen Bereich angibt.

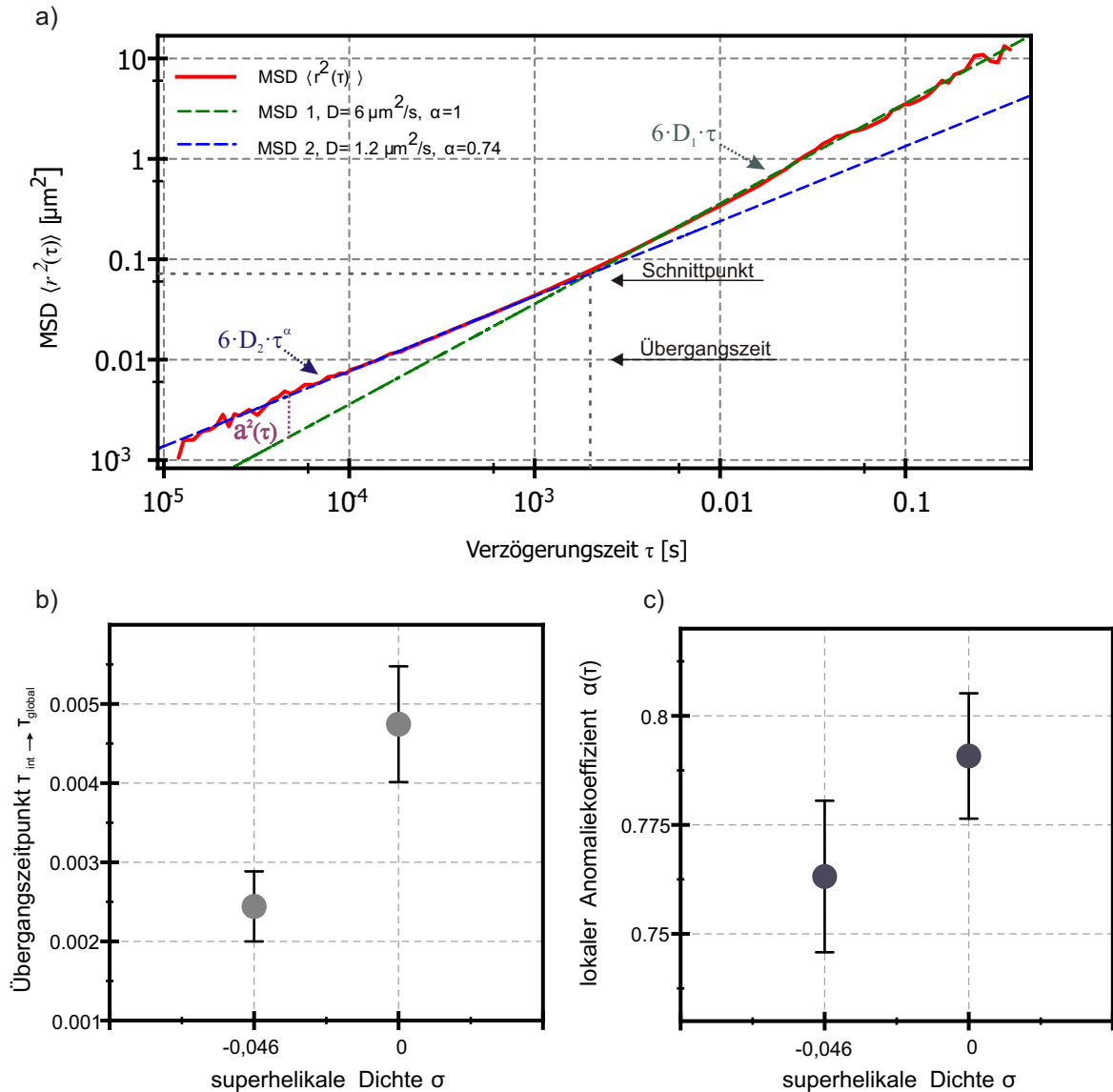


Abbildung 3.6.: Auswertung der MSD-Kurven von Plasmiden mit unterschiedlichen Torsionsspannungen ($\sigma = 0$ und $\sigma = -0.046$). a) illustriert das Prinzip der Auswertung anhand einer MSD-Kurve der Probe mit $\sigma = 0$. b) zeigt die Übergangszeitpunkte der beiden Regime und c) die Steigung der MSD-Kurve für kurze Verzögerungszeiten τ .

Aus Simulationen erwartet man auf einer Zeitskalavon $\tau \approx 10^{-7}$ s für lineare DNA mit einer Konturlänge von 910 nm einen Wert von $\alpha = 0,75$ [36, 129]. Für Plasmid-DNA gleicher Konturlänge (pUC18) steigt der Wert in den Simulationen leicht an und liegt für $\sigma = 0$ ungefähr bei 0,75 und für $\sigma = -0,046$ ungefähr bei 0,78 [36]. Diese Daten sind mit den hier gezeigten kompatibel.

3.2.4. Vergleich der Messungen mit Simulationen von Wocjan et al.

In [130] wurden Simulationen für das gleiche pUC 18 Plasmid mittels BD-Algorithmus simuliert. Aus den erhaltenen Trajektorien wurden MSDs berechnet und mit den Daten aus Abbildung 3.4 verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Wie man sieht überlagern sich Simulationen und Messungen sehr gut, wobei sich die leichte Aufspaltung der internen Dynamik die in den Messungen zu sehen war in der Simulation nicht zeigten.

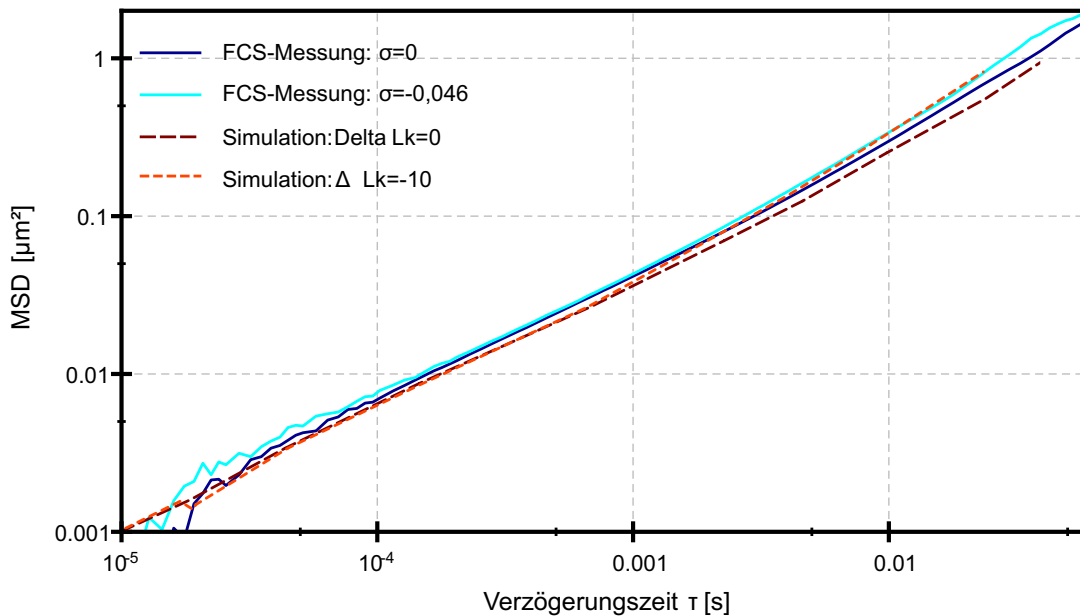


Abbildung 3.7.: Vergleich der gemessenen MSDs mit Brownian Dynamics Simulationen des gleichen Plasmids. Die Messdaten sind die gleichen, wie in Abb. 3.4 und die Simulationsdaten wurden aus [130] entnommen.

3.3. Einfluss der Ionenstärke auf die interne Dynamik superhelikaler DNA

3.3.1. Experimentdurchführung

DNA ist ein geladenes Polymer. Seine Struktur und Funktion hängen u.a. von der Ionenstärke des umgebenden Mediums ab. Wie bereits in einer anderen Studien gezeigt werden konnte, führt eine Erhöhung der Salzkonzentration zu einer Kompaktierung der DNA-Struktur und somit zu einer Beschleunigung der DNA-Bewegung auf globaler Ebene [87]. Andererseits zeigten Untersuchungen, die mittels dynamischer Lichtstreuung und Simulationen der Brownschen-Dynamik durchgeführt wurden, dass mit steigender Salzkonzentration auch die interne Dynamik beschleunigt wird [87]: Eine Erhöhung der Salzkonzentration führt aufgrund der steigenden Abschwächung der intramolekularen elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Phosphatgruppen des Polymer-Rückgrats zu einer Erhöhung der Flexibilität des Polymers. Die Ionenstärke beeinflusst also die Schwerpunktsbewegung des Polymers, wie auch seine interne Mobilität.

Um das Verhalten der internen Dynamik bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen mittels FCS zu beobachten, wurden fluoreszent-markierte negativ superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$ bei 0, 100, 500 und 1000 mM NaCl vermessen. Dazu wurden DNA-Lösungen mit negativ superhelikalen Plasmiden ($\sigma = -0,046$) auf die gewünschte NaCl-Konzentration gebracht. Die gezeigten Daten stammen auch hier aus drei unabhängigen Wiederholungen des Experiments. Die Datenaufnahme erfolgte unter den gleichen Bedingungen (Konzentration, Laserintensität, Puffer) wie in Abschnitt 3.2 beschrieben.

Um den Einfluss der NaCl-Konzentration auf den Brechungsindex der Lösung zu bestimmen und damit auch das Fokusvolumen, wurde eine Eichung mittels Alexa488 in unterschiedlichen Salz-Konzentrationen vorgenommen. Die gezeigten Daten stammen aus drei unabhängige Wiederholungen des Experiments. Die Proben wurden 20 Mal vermessen, jede Messung lief über 60 s. Es wurden NaCl-Endkonzentrationen von 0, 50, 100, 500, 1000 mM vermessen. Endkonzentration von Alexa488 wurden jeweils auf etwa ~ 20 nM eingestellt.

3.3.2. FCS-Eichung bei variierender Salzkonzentration

Abbildung 3.8 (a) zeigt theoretische Diffusionskoeffizienten bei steigender NaCl Konzentration für Alexa488. Hierbei wurden die Diffusionskoeffizienten durch die Approximation von publizierten Viskositätsdaten für NaCl [131], mit Hilfe des QuickFit Plugins “Diffusion Coefficient Calculator” berechnet. Die so gewonnenen Daten wurden für die Eichungen der Fokusvolumen benutzt.

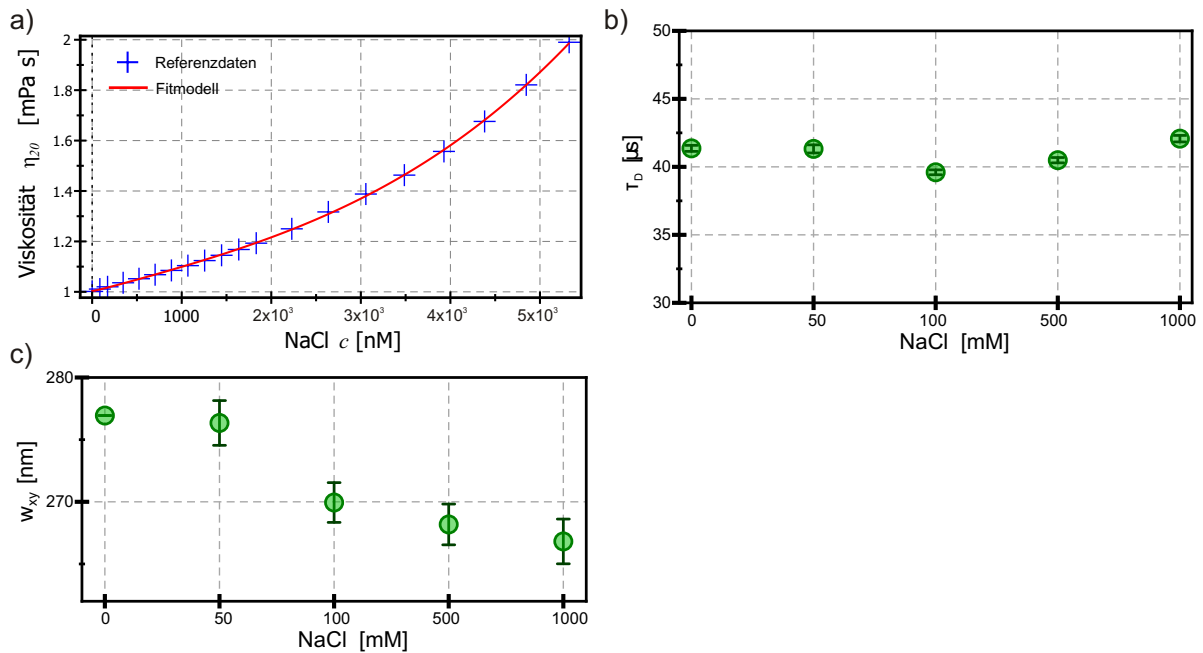


Abbildung 3.8.: Ergebnisse der FCS-Messungen von Alexa488 in Lösung mit steigender NaCl Konzentration zur Eichung des FCS-Fokusvolumen. a) zeigt die Referenzdaten der Abhängigkeit der Viskosität bei 20°C von der steigenden NaCl Konzentration. b) zeigt die gemessenen Diffusionszeiten für Alexa488, c) zeigt die aus der Eichung gewonnenen Werte von w_{xy} mit steigender Ionenstärke des Mediums.

Abbildung 3.8 (b) zeigt die gemessenen Diffusionszeiten für Alexa 488 mit steigender NaCl-Konzentration. Bei den verwendeten Salzkonzentrationen ist kein Einfluss auf die Diffusionszeit zu erkennen.

Abbildung 3.8 (c) zeigt die ermittelten Fokusradien für unterschiedliche NaCl-Konzentrationen. Der Fokusradius nimmt mit steigender NaCl-Konzentration leicht ab. Die Fehler in b) und c) zeigen die Standardabweichung der Wiederholungen des Experiments.

3.3.3. Ergebnisse der FCS-Fits

Abbildung 3.9 (a) zeigt die, auf die Teichenzahl, normalisierten Autokorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ bei den verschiedenen Salzkonzentrationen (0mM: grün bis 1000mM:blau). Es wird eine leichte Verschiebung der Kurven nach links, in Richtung schnellere Verzögerungszeiten τ , mit steigender Salzkonzentration sichtbar.

Abbildung 3.9 (b) zeigt die aus den Autokorrelationsdaten berechneten MSD Kurven. Hier ist rechts zwischen den Verzögerungszeiten $\tau = 10^{-3}$ s und $\tau = 10^{-1}$ s ein Unterschied in den globalen Diffusionszeiten sichtbar. Die Kurven zeigen mit steigender Salzkonzentration

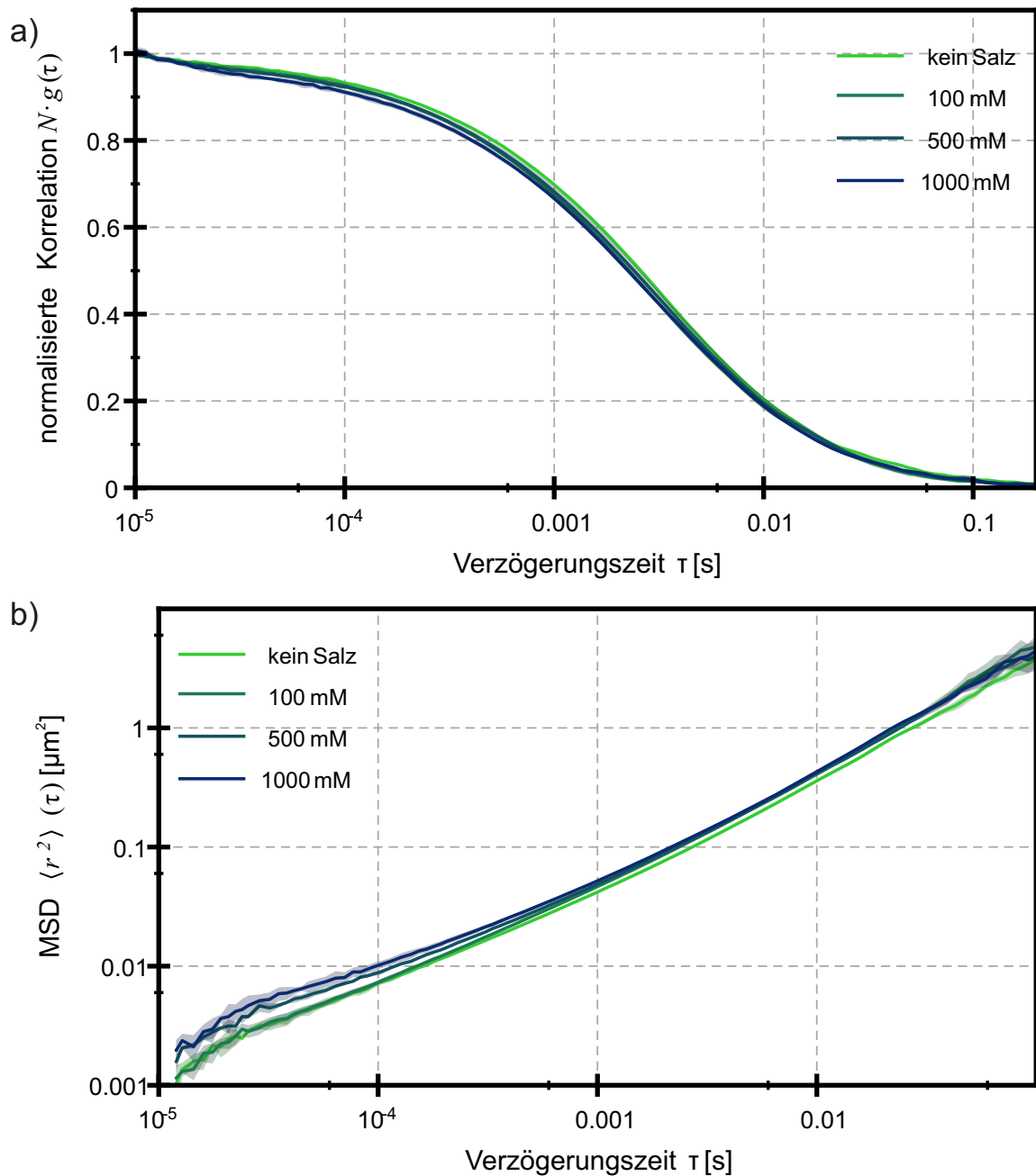


Abbildung 3.9.: FCS-Messungen von Plasmiden (mit $\sigma = -0,046$) bei verschiedenen Salzkonzentrationen : a) zeigt die FCS-Autokorrelationskurven und b) zeigt die Ergebnisse der MSD Transformation der Autokorrelationsdaten. Die Fehler sind die Standardabweichungen zwischen den Wiederholungen des Experiments. Der Fehler ist in weiten Bereichen kleiner als die Linienbreite im Plot.

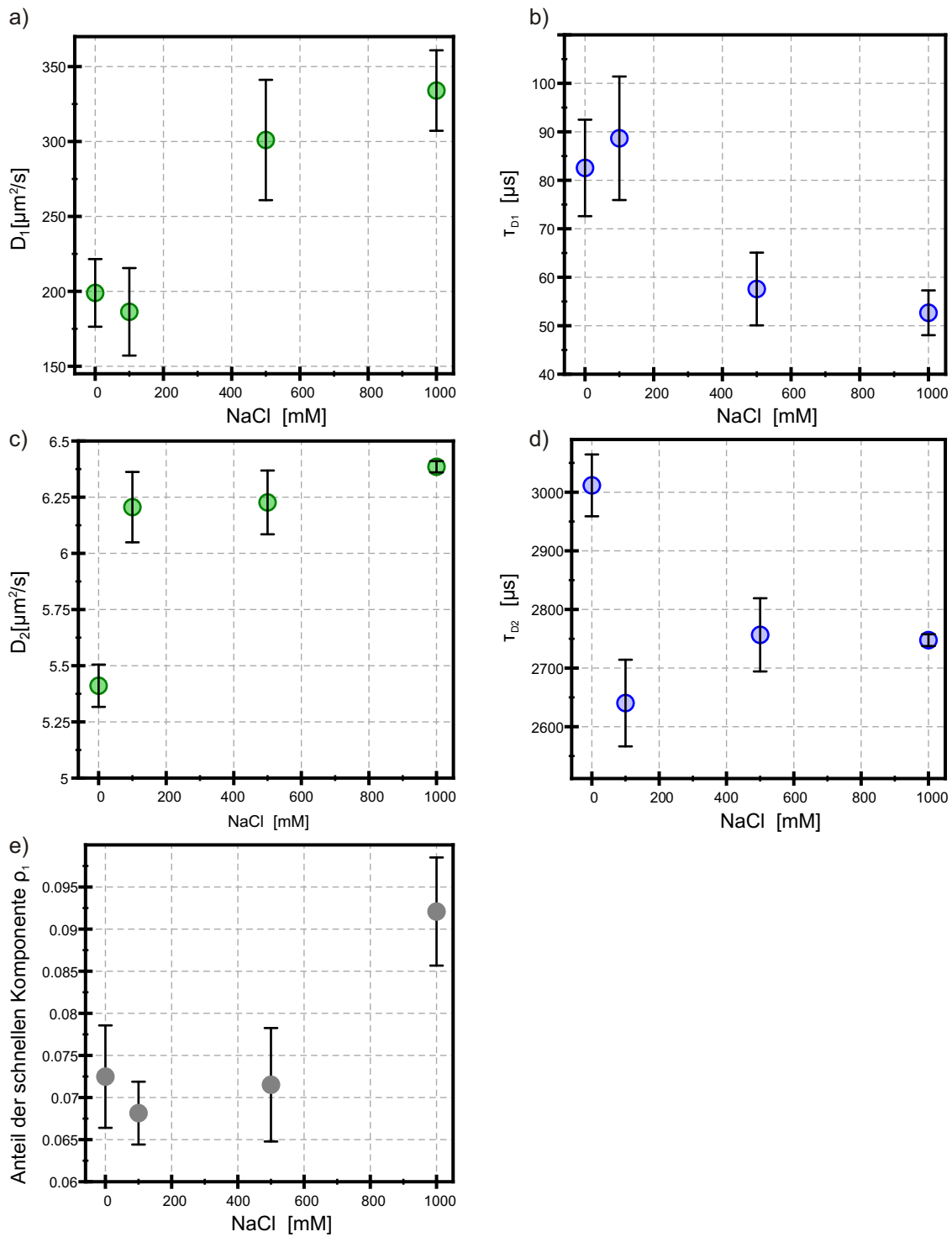


Abbildung 3.10.: Ergebnisse der FCS Fits an die Autokorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ bei steigender Salzkonzentration (grün bis dunkelblau). (a) und (c) zeigen die Diffusionskoeffizienten für zwei angenommene diffundierenden Komponenten. (b) und (d) zeigen die korrespondierenden Diffusionszeiten. (e) gibt den Anteil der schnell diffundierenden Komponente wieder.

eine leichte Verschiebung nach oben im Plot zu größeren mittleren quadratischen Abständen. Die Moleküle bewegen sich also im Schnitt weiter pro Zeiteinheit als die Kontrollprobe ohne Salz (grün). Im linken Bereich der Kurven, also im Zeitabschnitt zwischen $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 10^{-3}$ s wird die Beschleunigung der internen Dynamik mit steigender Salzkonzentration sichtbar. Durch die Verschiebung der Gesamtkurven durch die schneller werdende globale Diffusion, ist die interne Dynamik ebenfalls verschoben. Dieser Effekt wird im folgenden Abschnitt herausgerechnet.

Abbildung 3.10 führt die Ergebnisse der Diffusionsdaten aus den FCS Fits auf. Abbildung 3.10 (a) und (c) zeigen die Diffusionskoeffizienten der beiden diffundierenden Komponenten. Mit steigender Salzkonzentration steigt der Diffusionskoeffizient der langsamen Komponente von Anfangs $D_2 = (5,41 \pm 0,09) \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei 0 mM NaCl auf $D_2 = (6,4 \pm 0,02) \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei 1000 mM NaCl an. Allerdings scheint mit einer Salzkonzentration von 100 mM NaCl bereits ein Plateau erreicht zu sein, das sich bis 1000 mM NaCl nicht mehr signifikant ändert. Nach der Stokes-Einstein Gleichung (1.3.3) (Seite 12) entsprechen die zwei D_2 hydrodynamischen Radii von $R_H = (44,26 \pm 0,78 \text{ nm})$ bei 0 mM NaCl und $R_H = (37,46 \pm 0,12 \text{ nm})$ bei 1000 mM NaCl. Die Erhöhung der Salzkonzentration führt also zu einer leichten Kompaktierung des Plasmids.

Die schnell diffundierende Komponente D_1 (siehe Abbildung 3.10 a) steigt mit ansteigender Salzkonzentration, von $D_1 = (200 \pm 20) \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei 0 mM NaCl und $D_1 = (335 \pm 26) \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei 1000 mM NaCl.

Der Effekt auf die Diffusionskoeffizienten zeigt sich gleichwertig auch in den Diffusionszeiten τ_{D1} und τ_{D2} in Abbildung 3.10 (b) und (d).

Abbildung 3.10 (e) zeigt Änderungen im Anteil ρ_1 der schnell diffundierenden Komponente. Hier ist mit steigender Salzkonzentration ein Anstieg der schnell diffundierenden Komponente zu sehen.

3.3.4. Messung der internen Dynamik über MSD

Wie auch zuvor wird nun in diesem Abschnitt, zur genaueren Analyse der internen Dynamik, der globale diffusive Anteil mathematisch auf zwei Arten von der internen Dynamik getrennt. Abbildung 3.11 (a) zeigt die Ergebnisse aus der Division von $\text{MSD}/6D_2\tau$, also der relativen Beschleunigung der internen Dynamik gegenüber der globalen Diffusion. Mit steigender Salzkonzentration (grün nach blau) sieht man eine Beschleunigung des gesamten Anteils der internen Dynamik zwischen $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 5 \cdot 10^{-3}$ s.

Abbildung 3.11 (b) zeigt die Amplitude der internen Bewegung aus der Subtraktion des global diffusiven Anteils ($\text{MSD} - 6D_2\tau$). Hier wird der Anteil der globalen Diffusion von der gesamten Diffusion über alle Zeiten τ abgezogen. Übrig bleibt die absolute interne Bewegung die als

quadrierte Amplitude in μm^2 angegeben wird, und die mittlere Verschiebung charakterisiert, die das Polymer zusätzlich zur globalen Diffusion zu den Verzögerungszeiten τ zurücklegt. Es ist ein Anstieg der Amplituden mit steigender Salzkonzentration zu beobachten. In beiden Graphen ist die Standardabweichung der Wiederholungen des Experiments als Fehlerpolygon dargestellt.

Abbildung 3.12 (b) zeigt Ergebnisse aus der Analyse der MSD Daten. Es wurden wieder zwei Potenzgesetze an die Daten auf kurzen und langen Zeitskalen gefittet (siehe Abschnitt 3.2). Abbildung 3.12 (b) zeigt den Übergangszeitpunkt $\tau_{int \rightarrow global}$ bei dem die interne Dynamik in die globale Dynamik übergeht. Wie aus dem Plot ersichtlich wird, hat die Salzkonzentration kaum Einfluss auf die Übergangszeit der beiden Regime. Eine marginale Verschiebung der Übergangszeit nach links auf der Zeitachse ist zu sehen, allerdings ist der Effekt so gering, dass nicht mit Bestimmtheit gesagt werden kann ob der Einfluss tatsächlich vorhanden ist. Abbildung 3.12 (c) zeigt Änderungen im Anomaliekoeffizienten α , der die Steigung der Kurve angibt. Hier ist eine signifikante Abnahme der Steigung α auf niedriger Zeitskala mit steigender Salzkonzentration zu beobachten.

Wie bereits in Abschnitt 3.3 ausgeführt, erwartet man aus Simulationen bei niedrigem Salz $\alpha = 0,75$, was auch hier vorgefunden wurde. Bei höheren Salz-Konzentrationen scheint einerseits das Plasmid kompaktiert zu werden und andererseits die interne Dynamik erhöht zu sein.

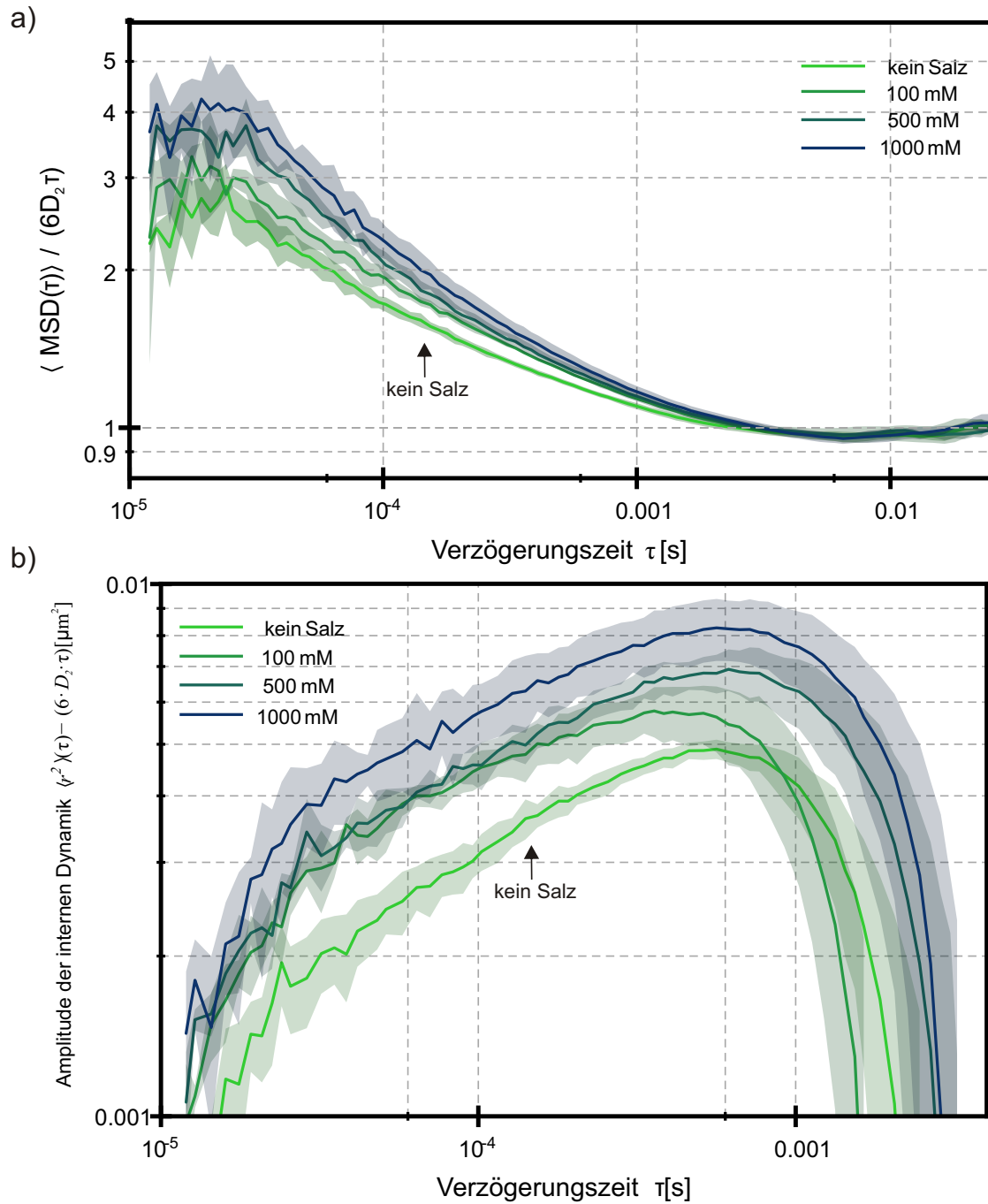


Abbildung 3.11.: Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik durch zwei mathematische Methoden : a) $\text{MSD}/6D_2\tau$ und b) $\text{MSD} - 6D_2\tau$ für superhelikale Plasmide $\sigma = -0.046$ bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.

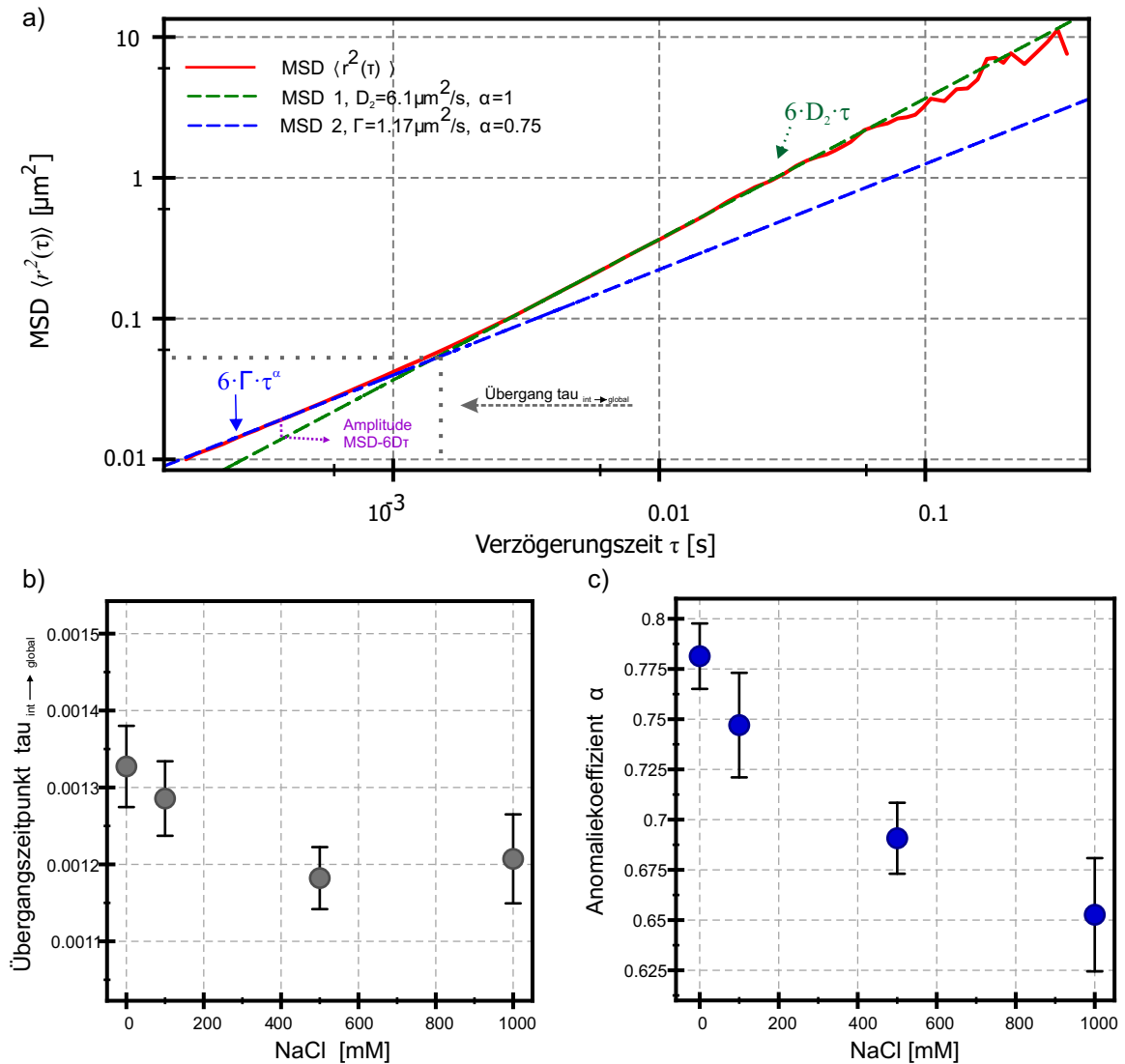


Abbildung 3.12.: Auswertung der MSD-Kurven von Plasmiden mit $\sigma = -0,046$ bei verschiedenen Salzkonzentrationen. a) illustriert das Prinzip der Auswertung anhand der MSD-Kurve der Probe bei 0 mM NaCl. b) zeigt die Übergangszeitpunkte der beiden Regime und c) die Steigung der MSD-Kurve für kurze Verzögerungszeiten τ .

3.4. Interne Dynamik superhelikaler DNA in komplexen Medien (Ficoll400)

3.4.1. Experimentdurchführung

DNA liegt *in vivo* immer in komplexen Medien vor. Hier interagieren die löslichen Bestandteile des Kernplasmas (bei Eukaryoten) mit der DNA. Die Interaktionen können von zufälliger Natur sein, wie z.B. Kollisionen mit zahlreichen molekularen Komponenten des Nukleoplasmas oder Interaktionen zwischen dem DNA Polymer und mit ihm spezifisch interagierenden Proteinen. Da ungefähr 2m DNA im Zellkern verpackt vorliegen, kommt es auch zu zufälligen Kollisionen der DNA Stränge untereinander, aber auch zu spezifischen Interaktionen von verschiedenen DNA Abschnitten wie z.B. zwischen “enhancer” oder “silencer” Sequenzen und Genpromotoren [78, 132, 133].

Um einen Einfluss des Mediums auf die interne Dynamik von superhelikaler DNA in einem ersten Schritt zu untersuchen, kann man die Viskosität des umgebenden Mediums schrittweise erhöhen. Hierbei werden klassischer Weise Saccharose Lösungen benutzt, oder Lösungen eines synthetisches Polsaccharid, welches unter Reaktion mit Epichlorhydrin hergestellt wird. Diese Moleküle sind gut wasserlöslich, stark verzweigt und haben in Wasser einen neutralen pH-Wert. Sie werden mit unterschiedlichen Molekulargewichten hergestellt, so hat etwa Ficoll400 z.B. ein Molekulargewicht von 400 kDa. Der hydrodynamische Radius eines Ficoll-Moleküls ist mit ~ 20 nm angegeben [134].

Im folgenden wurde der Einfluss von unterschiedlichen Ficoll-Konzentrationen auf die interne Dynamik negativ superhelikaler Plasmide mittels FCS untersucht. Die gezeigten Daten stammen aus ersten Testmessungen. Die Datenaufnahme erfolgte unter den gleichen Bedingungen (Konzentration, Laserintensität, Puffer) wie in Abschnitt 3.2 beschrieben.

3.4.2. FCS-Eichung bei variierender Ficoll400-Konzentration

Da nicht bekannt war, in wie weit Ficoll400 den Brechungsindex der Lösung ändert und damit auch das Fokusvolumen, wurde eine sorgfältige Eichung mittels Alexa488 in unterschiedlichen Ficoll-Konzentrationen vorgenommen. Die gezeigten Daten stammen aus drei unabhängige Wiederholungen des Experiments. Die Proben wurden 20 Mal vermessen, jede Messung lief über 60 s. Es wurden Endkonzentrationen von Ficoll400 zwischen 1 und 10 Gewichtsprozent in 1 Prozent Schritten vermessen. Für die Eichmessungen wurde Alexa488 in einer Endkonzentration von etwa ~ 20 nM verwendet.

Abbildung 3.13 (a) zeigt die mit der Teilchenzahl normalisierten Autokorrelationsdaten für

Alexa-488. Mit steigender Ficoll400-Konzentration verschieben sich die Kurven nach rechts auf der Zeitskala, in Richtung größere Verzögerungszeiten τ . Aufgrund der steigenden Viskosität des Mediums verlangsamt sich die Diffusion der Fluorophore.

Abbildung 3.13 (b) zeigt theoretische Diffusionskoeffizienten bei steigender Ficoll400 Konzentration für Alexa488. Hierbei wurden die Diffusionskoeffizienten durch die Approximation von publizierten Viskositätsdaten für Ficoll 400 [135], mit Hilfe des QuickFit Plugins “Diffusion Coefficient Calculator” berechnet (Abbildung 3.13 (c) und Abschnitt 3.3.3). Die Daten aus [135] wurden durch eigene Viskositätsmessungen (durchgeführt von J. Krieger und N. Mücke) über-

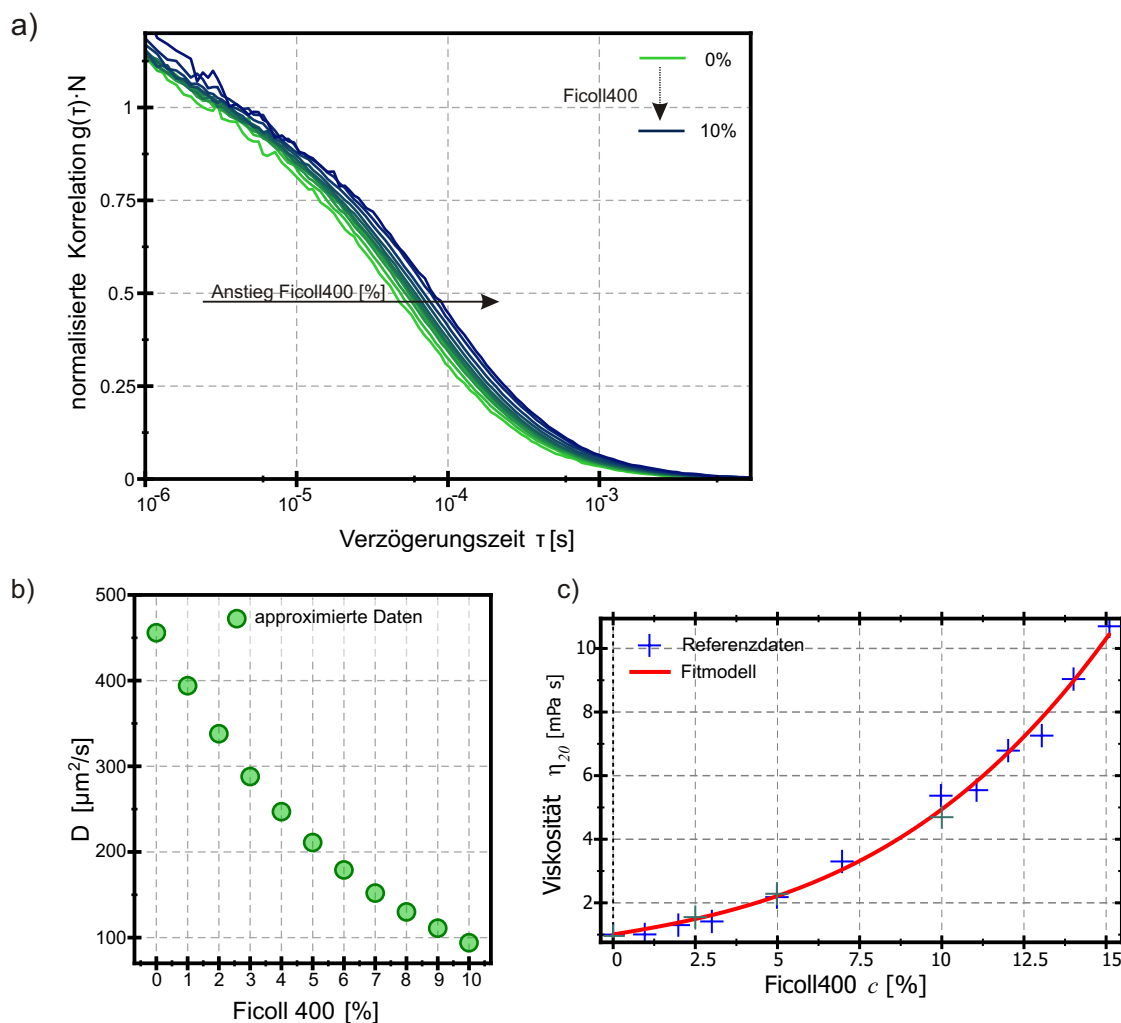


Abbildung 3.13.: Ergebnisse der FCS-Messungen von Alexa488 in Lösung mit steigender Ficoll400 Konzentration zur Eichung der Plasmiddaten. a) zeigt die normalisierten Autokorrelationskurven, b) die theoretische erwarteten Diffusionskoeffizienten bei steigender Ficoll400 Konzentration für Alexa488. c) zeigt einen Graphen mit den, für die Approximation der Diffusionskoeffizienten genutzten Viskositätsdaten bei 20°C (blau) und den Überprüfungsmessungen (grün).

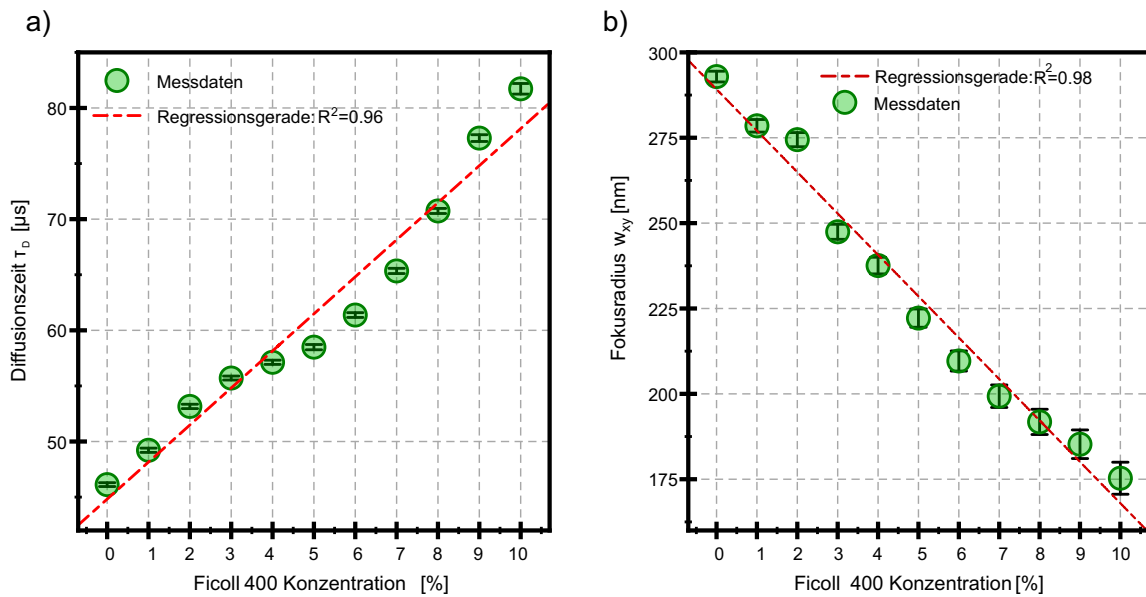


Abbildung 3.14.: Ergebnisse der FCS-Fits von Alexa488 bei steigender Ficoll400 Konzentration zur Eichung der Plasmidmessungen. a) zeigt die gemessenen Diffusionszeiten für Alexa488, b) zeigt die aus der Eichung gewonnenen Werte für den Fokusradius w_{xy} , jeweils mit steigender Viskosität des Mediums. Die Fehler sind die Standardabweichungen der Wiederholungen des Experiments.

prüft, die für Lösungen mit Konzentrationen von 0%, 2,5%, 5% und 10% Ficoll-400 in TE-Puffer mit einem Ubbelohde Kapillarviskosimeter durchgeführt wurden. Die Übereinstimmung war mit einer Maximalabweichung von 5% sehr gut. Die so gewonnenen Diffusionskoeffizienten wurden für die Eichungen des Fokusvolumens benutzt (2.11.3).

Abbildung 3.14 (a) zeigt die gemessenen Diffusionszeiten für Alexa 488 mit steigender Ficoll400-Konzentration. Die gestrichelte rote Linie stammt aus einer linearen Regressionsanalyse.

Abbildung 3.14 (b) zeigt die ermittelten Fokusradien (w_{xy}) für unterschiedliche Ficoll400-Konzentrationen. Der Fokusradius nimmt mit steigender Ficoll400-Konzentration nahezu linear ab, wie die Regressionsanalyse (rote, gestrichelte Linie) zeigt.

3.4.3. Ergebnisse der FCS-Fits

Abbildung 3.15 zeigt die auf die Teichenzahl normierten Autokorrelationskurven für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ für steigende Ficoll400-Konzentration. Dabei werden zwei Effekte sichtbar. Der erste Effekt betrifft Verzögerungszeiten von $\tau \geq 0,01$ s. Hier verschieben sich die Autokorrelationskurven nach rechts auf der Zeitachse in Richtung höhere Verzögerungszeiten τ . Durch die Erhöhung der Viskosität des Mediums verlangsamt sich also die globale Diffusion des gesamten Moleküls. Die Autokorrelationskurven sind dabei klar voneinander getrennt. Der zweite Effekt wird für Verzögerungszeiten τ zwischen 10^{-5} s und $0,01$ s sichtbar. Mit steigender Viskosität des Mediums flachen die Steigungen der Autokorrelationskurven deutlich ab. In diesem Zeitbereich, findet wie in den vorherigen Abschnitten schon beschrieben interne Dynamik statt.

Abbildung 3.16 führt die Ergebnisse der Diffusionsdaten aus den FCS Fits, mit zwei angenommenen diffundierenden Komponenten auf (siehe Abschnitt 3.2.2). Abb. (a) und (c) zeigen die Diffusionskoeffizienten der beiden diffundierenden Komponenten. Die langsam diffundierende Komponente (a) zeigt das globale Diffusionsverhalten anhand der Diffusionskoeffizienten der Plasmide in Abhängigkeit der steigenden Viskosität des umgebenden Mediums. Der Diffusionskoeffizient sinkt deutlich ab. Bei einer Ficoll400-Konzentration von 10 Gewichtsprozent ist er nur noch $D_1 = (0,74 \pm 0,01) \mu\text{m}^2/\text{s}$ wobei er in der Kontrollprobe ohne Ficoll400 $D_1 = (6,6 \pm 0,05) \mu\text{m}^2/\text{s}$ beträgt.

Abbildung 3.16 (c) zeigt den Effekt der steigenden Viskosität auf die schnell diffundierende Komponente. Hier ist insgesamt ein Abfall der Werte von Anfangs $D_1 = (448 \pm 107) \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die Kontrollprobe, auf $D_1 = (98 \pm 11) \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die Probe bei 10 Gewichtsprozent Ficoll400, zu sehen. Zwischen 0 und 5 Gewichtsprozent Ficoll400 ist ein leichter Anstieg der Werte zu beobachten, allerdings weist die Fehlergröße von bis zu 25% der Probenwerte auf eine starke Streuung der Daten hin. Ab einer Konzentration von 5 Gewichtsprozent Ficoll400 scheinen die Werte ein Plateau erreicht zu haben. Die in allen Plots gezeigten Fehler stammen aus dem FCS Fits der Daten.

Abbildung 3.16 (e) zeigt Änderungen im Anteil ρ_2 der schnell diffundierenden Komponente (D_2). Hier ist insgesamt ein relativ starker Anstieg von ρ_2 zu sehen. Der Wert steigt von Anfangs $\rho_2 = (8 \pm 5)\%$, bei 0% Ficoll400, auf $\rho_2 = (30,4 \pm 0,6)\%$, bei 10% Ficoll400.

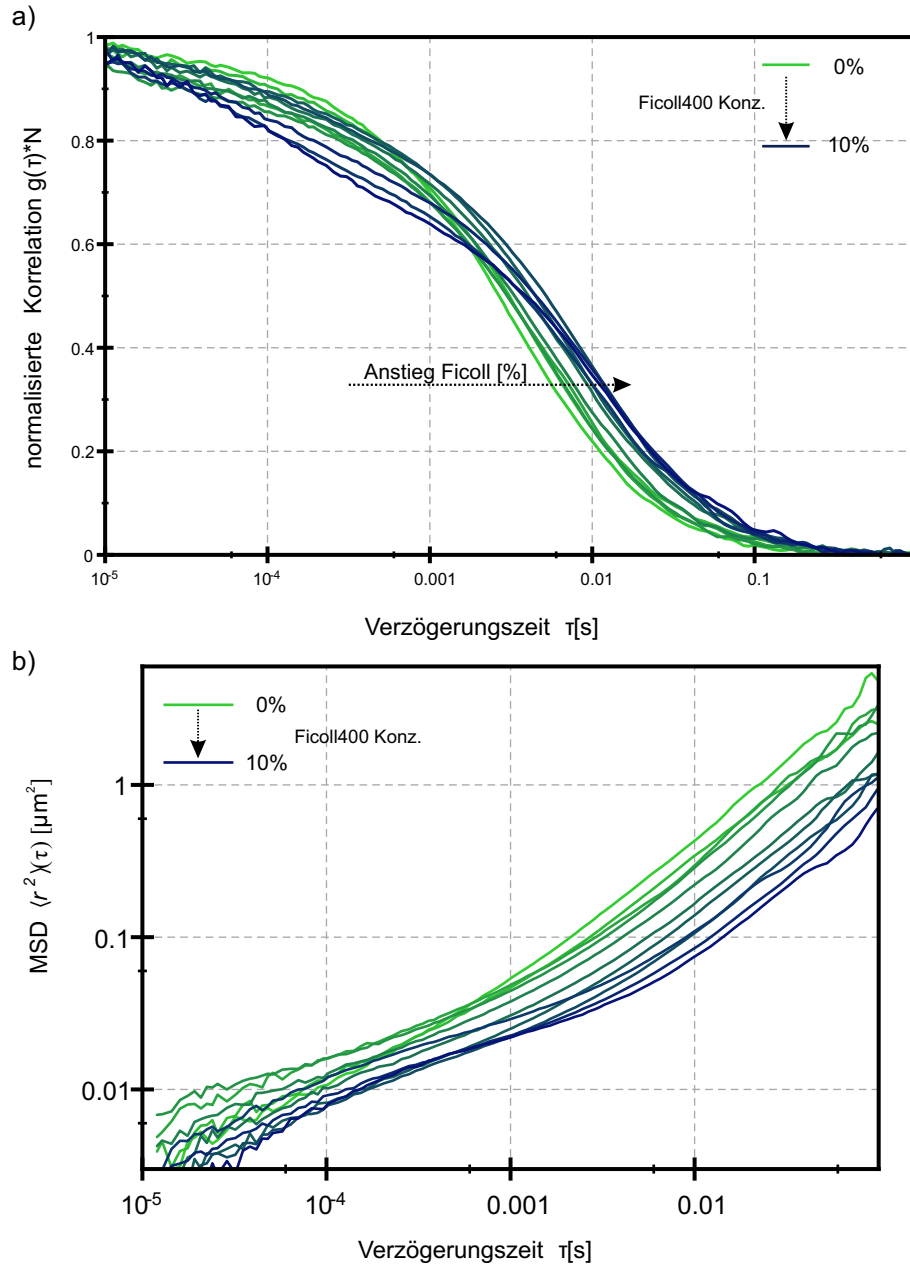


Abbildung 3.15.: Ergebnisse der Autokorrelationsdaten für superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$ bei steigender Ficoll400 Konzentration. Dargestellt sind in a) die normalisierten Autokorrelationskurven, und in b) die Ergebnisse der MSD Transformation der Autokorrelationsdaten. Die Fehler stammen aus dem Fit der FCS-Messungen.

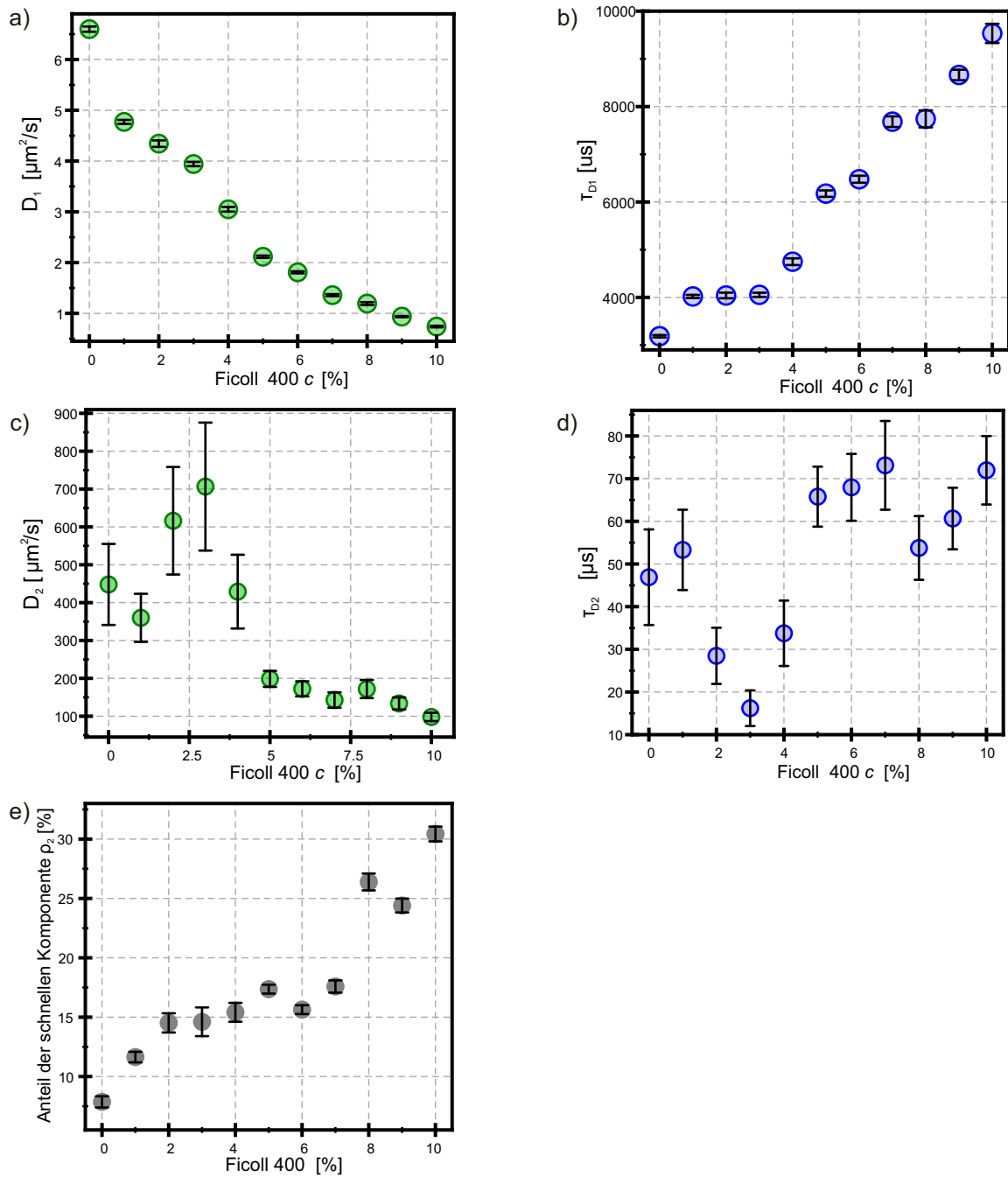


Abbildung 3.16.: Ergebnisse der Analyse der FCS-Kurven durch 2-Komponenten Fits für superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$. a) zeigt die Diffusionskoeffizienten der schnellen und (c) der langsamen Komponente des Plasmids. b) und d) zeigen die entsprechenden Diffusionszeiten, jeweils mit steigender Viskosität des Mediums. e) zeigt den Anteil der schnellen Komponente ρ_2 . Die Fehler stammen aus dem Fit der FCS-Messungen.

3.4.4. Messung der internen Dynamik über MSD

Abbildung 3.15 (b) zeigt die aus den Autokorrelationsdaten berechneten MSD Kurven. Deutlich zu sehen ist die Verschiebung der MSD-Kurven zwischen den Verzögerungszeiten $\tau = 10^{-3}$ s und $\tau = 10^{-1}$ s bei steigenden Ficoll400-Konzentrationen. Die Kurven zeigen deutliche Verschiebung nach unten im Plot zu kleineren mittleren quadratischen Verschiebungen. Die Moleküle bewegen sich also im Schnitt weniger weit pro Zeiteinheit als die Kontrollprobe ohne Ficoll400. Im linken Bereich der Kurven, also im Zeitabschnitt zwischen $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 10^{-3}$ s wird ein Effekt

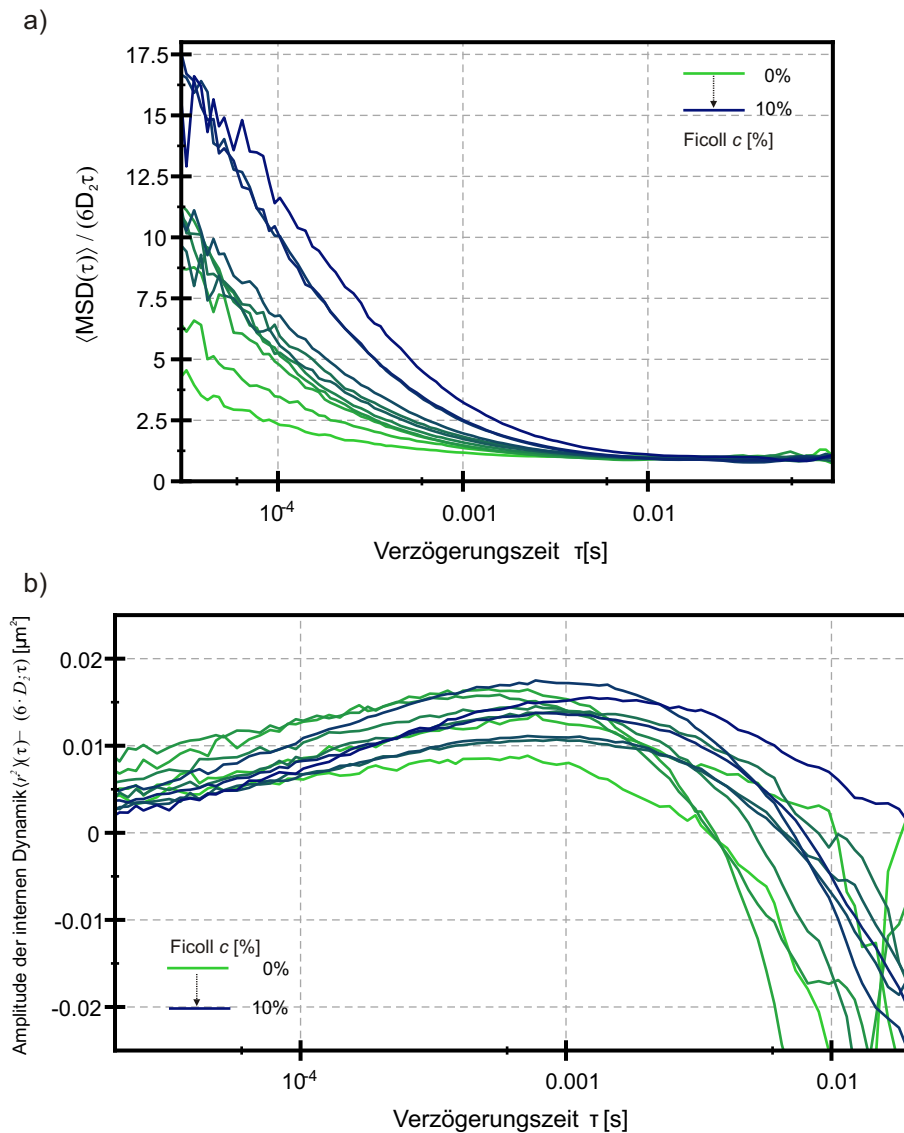


Abbildung 3.17.: Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik durch zwei mathematische Methoden : a) $\text{MSD}/6D_2\tau$ und b) $\text{MSD} - 6D_2\tau$ für superhelikale Plasmide $\sigma = -0.046$ bei unterschiedlichen Ficoll400-Konzentrationen.

auf die Steigung der MSD-Kurven sichtbar. Eine genauere Aussage über direkte Effekte der Ficoll400-Konzentration auf die interne Dynamik ist aus dieser Darstellung der Daten nicht möglich, da die Kurven durch die langsamer werdende globale Diffusion komplett gegeneinander verschoben sind.

Abbildung 3.17 (a) zeigt die Beschleunigung der internen Dynamik gegenüber der globalen Diffusion. Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erläutert, wird die globale Diffusion von der internen Dynamik getrennt. Da die globale Diffusion durch die steigende Viskosität des Mediums stark verlangsamt wird, zeigt sich in dieser Art der Darstellung eine Beschleunigung der internen Dynamik mit steigender Viskosität (grün nach blau).

Abbildung 3.17 (b) zeigt die Amplitude der internen Bewegung. Hier ist kein wirklich signifikanter Effekt von Ficoll400 auf die interne Dynamik zu sehen.

Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse aus der Analyse der MSD Daten. Abb. (b) zeigt den Übergangszeitpunkt $\tau_{\text{int} \rightarrow \text{global}}$ bei dem die interne Dynamik in die globale Dynamik übergeht. Wie aus dem Plot ersichtlich wird, hat die Ficollkonzentration bis zu 5% Ficoll400 keinen merklichen Einfluss auf die Übergangszeit der beiden Regime. Bei noch höheren Konzentrationen kommt es dann allerdings zu einer deutlichen Verschiebung der Übergangszeiten nach rechts auf der Zeitachse, zu größeren Verzögerungszeiten τ . Hier wird die Trennung der beiden Regime durch die Viskosität deutlich. Die globale Diffusion der Plasmide wird stark verlangsamt mit steigender Viskosität des Mediums, während die interne Dynamik über einen vergrößerten Zeitraum sichtbar wird. Die Viskosität des Mediums scheint sich nicht unbedingt auf die Geschwindigkeit der internen Bewegung auszuwirken, sondern führt vielmehr zu einer Trennung der Regime der internen und globalen Diffusion. Der Einfluss von Ficoll400 auf die interne Dynamik scheint begrenzt zu sein. Ficoll400 könnte in zukünftigen Messungen dieser Art genutzt werden, um die Regime voneinander zu trennen und dadurch Einflüsse auf die interne Dynamik besser auflösen zu können.

Abbildung 3.18 (c) zeigt schließlich Änderungen im Anomaliekoeffizienten α , der die Steigung der Kurve angibt. Die Steigungen der Kurven sinken zunächst zwischen 0 % und 3 % Ficoll400 um etwa die Hälfte, von 0,64 bei 0 % Ficoll400 und 0,38 bei 3 % Ficoll400. Ab einer Konzentration von 4 % schwankt der Steigungswert um 0,5 und erfährt keine signifikante Änderung mehr.

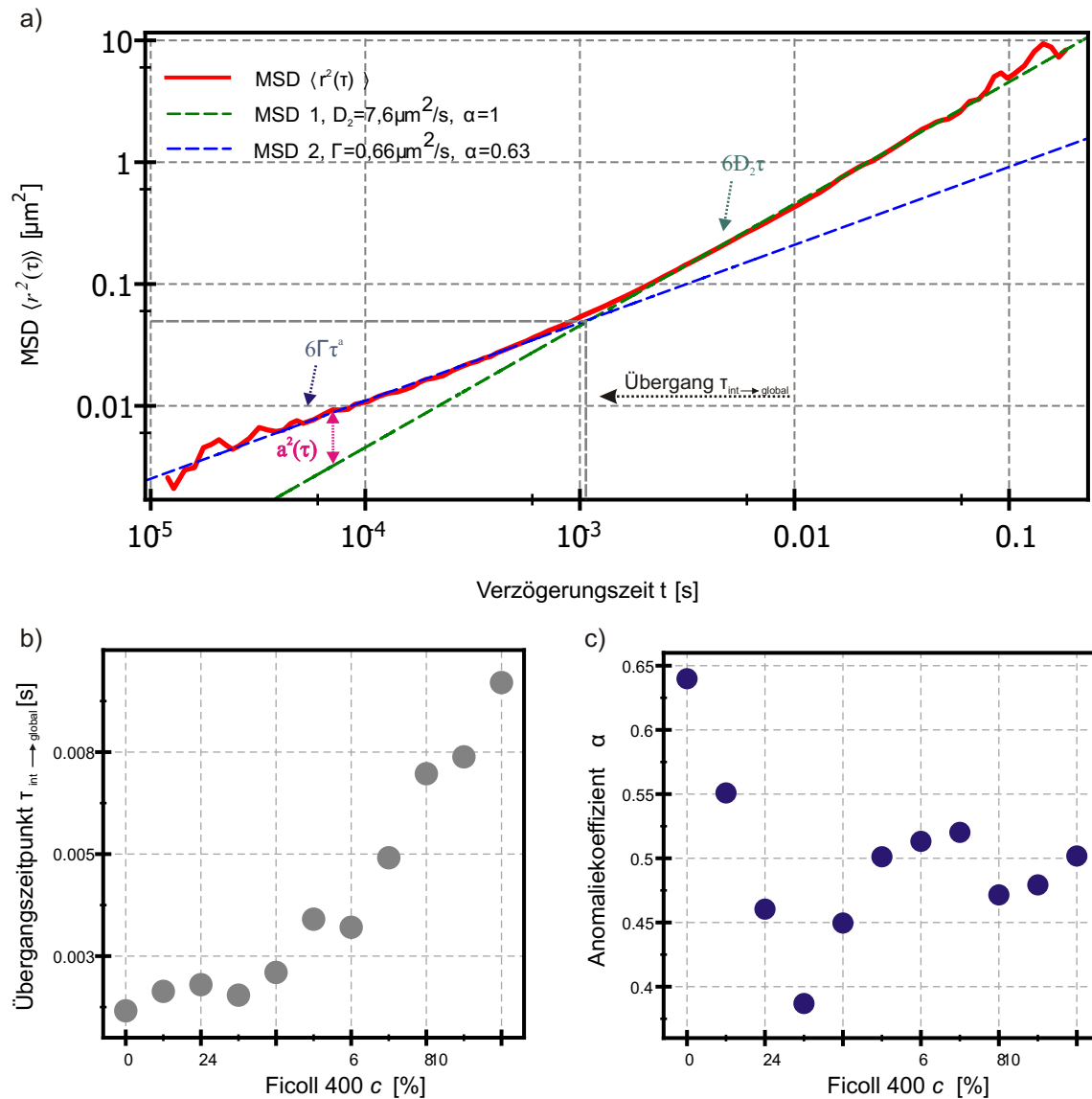


Abbildung 3.18.: Ermittlung der Übergangszeiten zwischen interner und globaler Dynamik aus der MSD-Analyse der Autokorrelationsdaten für superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (Ficoll400). a) zeigt den Übergang aus den Fitergebnissen an der MSD Kurve für die Probe ohne Ficoll 400 als Beispiel. b) zeigt die Änderungen des Übergangszeitpunkts der Plasmide mit steigender Viskosität des Mediums.

3.5. Einfluss der Verpackung von DNA in Nukleosomen auf ihre interne Dynamik

3.5.1. Einleitung

DNA liegt im Zellkern teilweise als verpackte Struktur vor, genannt Chromatin: Nukleosome bilden dabei die Packungsbasis. Sie binden ca. 147 Basenpaare DNA in einer linksgängigen Helixwindung um ein Histonoktamer. Dieser erste Verpackungsschritt wird stufenweise zu Chromatin verdichtet (siehe Abschnitt 1.6), das grob in zwei Zustände der Verpackungsdichte unterteilt wird. Das dicht gepackte Heterochromatin und das weniger dicht gepackte und genetisch aktivere Euchromatin. Die Art und die Dichte der Packung der DNA bestimmen über die Häufigkeit der Interaktionen zwischen Genen und der zellulären Maschinerie (Polymerasen, etc.). Für zahlreiche zelluläre Prozesse (z.B. Transkription, Replikation, etc.) muss die verpackte DNA zugänglich gemacht werden (dies wird in Abschnitt 4.1 näher beschrieben). Dieser Abschnitt befasst sich mit dem Einfluss der stufenweisen Verpackung der Plasmid-DNA in Nukleosomen auf die interne und globale DNA-Dynamik dieser Konstrukte.

3.5.2. Experimentdurchführung

Um dies zu untersuchen, wurden rekombinante Histonoktamere (*Xenopus laevis*) auf fluoreszent markierten Plasmiden mit einer negativen Torsionsspannung von $\sigma = -0,046$ mittels Salzgradientendialyse zu Nukleosomen rekonstituiert (siehe Abschnitt 2.7.2). Eine unterschiedliche Verpackungsstärke der Plasmid-DNA durch unterschiedlich hohe Nukleosomenzahlen wurde durch den Einsatz unterschiedlicher Histonoktamer-Zahlen pro Plasmid erreicht. Hierzu wurden pro Ansatz jeweils 2 μg Plasmid-DNA mit der entsprechenden Menge an Histonoktamer versetzt und nach einer Bindungsphase von 20 Minuten auf einem Rundschtüttler über zwei Zwischenstufen von Anfangs 2 mM NaCl auf 5 mM NaCl dialysiert (siehe Abschnitt 2.7.2). Die Massenproportionen zwischen Histonoktameren und DNA wurde dabei auf eine der folgenden Werte eingestellt: 0,0.2,0.4,0.6,0.8. Die so hergestellten Proben wurden mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht, um die Qualität und Versehrtheit der Probe zu testen, aber auch um einen Eindruck des Verpackungsgrades zu bekommen. Die Rasterkraftaufnahmen fanden in Luft und auf einer Polylysinoberfläche statt (siehe Abschnitt 2.9).

Die Proben wurden ca. 24 h nach ihrer Herstellung und der SFM-Messungen gekühlt nach Israel transportiert. Die interne Dynamik der spezifisch markierten DNA-Plasmide mit steigender Nukleosomenzahl wurde mittels FCS gemessen. Die Messungen fanden im Labor von Prof. Oleg Krichevsky in Beer Sheva/Israel statt. Für die FCS Messungen wurde die Laserstärke so einge-

stellt, dass sie $10\mu W$ über dem Objektiv betrug. Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von etwa 2 nM verdünnt. Für jede Probe wurden 160 aufeinanderfolgende Messungen von je 60 s aufgenommen. Artefakte, hervorgerufen z.B. durch größere Schwankungen der Teilchenzahl, in einzelnen Messkurven wurden eliminiert, indem die betroffenen Autokorrelationskurven vor der Auswertung aussortiert wurden (siehe Abschnitt 2.11.3.4). Ebenso wurde die Messzeit im Vergleich zu den vorherigen Messungen in diesem Kapitel auf 60 s reduziert um Artefakte durch größere Proteinaggregate zu verringern. An den Mittelwert der verbliebenen Messkurven wurden theoretische FCS-Modellfunktionen gefittet (siehe Abschnitt 2.11.3).

3.5.3. SFM und FCS Ergebnisse

Abbildung 3.19 (c) zeigt Beispielbilder der Rasterkraftaufnahmen der vermessenen Rekonstitutionsproben. Die Massenproportion, und somit die Nukleosomenzahl, (Massenproportion: 0-0,8) steigt von oben nach unten. Die Kompaktierung der Plasmide mit steigender Nukleosomenzahl ist deutlich zu sehen.

Abbildung 3.19 (a) zeigt die mit der Teilchenzahl normalisierten Autokorrelationskurven. Mit steigender Nukleosomenzahl wird eine Verschiebung nach links auf der Zeitachse in Richtung kürzere Verzögerungszeiten τ sichtbar. Diese Verschiebung kann durch die Kompaktierung der Plasmid-DNA mit steigender Nukleosomenzahl erklärt werden. Aufgrund der kompakteren Form diffundiert das Plasmid schneller mit steigender Packung.

Abbildung 3.19 (b) zeigt die aus den Autokorrelationsdaten berechneten MSD Kurven. Auch dort ist zwischen den Verzögerungszeiten $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 10^{-1}$ s eine Verschiebung der MSD-Kurven zu höheren quadratischen Verschiebungen mit steigender Nukleosomenzahl zu sehen. Im linken Bereich der Kurven, also im Zeitabschnitt zwischen $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 10^{-4}$ s wird ein Effekt auf die Steigung der MSD-Kurven sichtbar. Eine genauere Aussage über direkte Effekte der DNA Packungsdichte auf die interne Dynamik ist aus dieser Darstellung der Daten nicht möglich, da die interne Bewegung von der globalen überlagert wird. Diese wird in Abschnitt 3.5.4 wieder herausgerechnet.

Abbildung 3.20 führt die Ergebnisse von FCS Fits auf. Abb. (a) und (c) zeigen die Diffusionskoeffizienten der beiden diffundierenden Komponenten. Die langsam diffundierende Komponente D_2 repräsentiert das globale Diffusionsverhalten der Plasmide. Der Diffusionskoeffizient steigt von $D_2 = (5 \pm 0,04) \mu m^2/s$ für die Kontrollprobe (nur Plasmide) mit ansteigender Nukleosomenzahl deutlich an und erreicht bei einer Massenproportion von 0,8 einen Wert von $D_2 = (9,2 \pm 0,03) \mu m^2/s$.

Der hydrodynamische Radius der Proben ergibt sich aus dem Diffusionskoeffizienten D_2 nach der Stokes-Einstein Gleichung (siehe Gleichung (1.3.3)). Für die Kontrollprobe errechnet sich

ein hydrodynamischer Radius von $R_H = 42$ nm, für die Probe mit der höchsten Massenproportion von $mp = 0,8$ sinkt er auf $R_H = 23$ nm ab.

Abbildung 3.20 (a) zeigt den Effekt der steigenden Nukleosomenzahl auf die schnell diffundie-

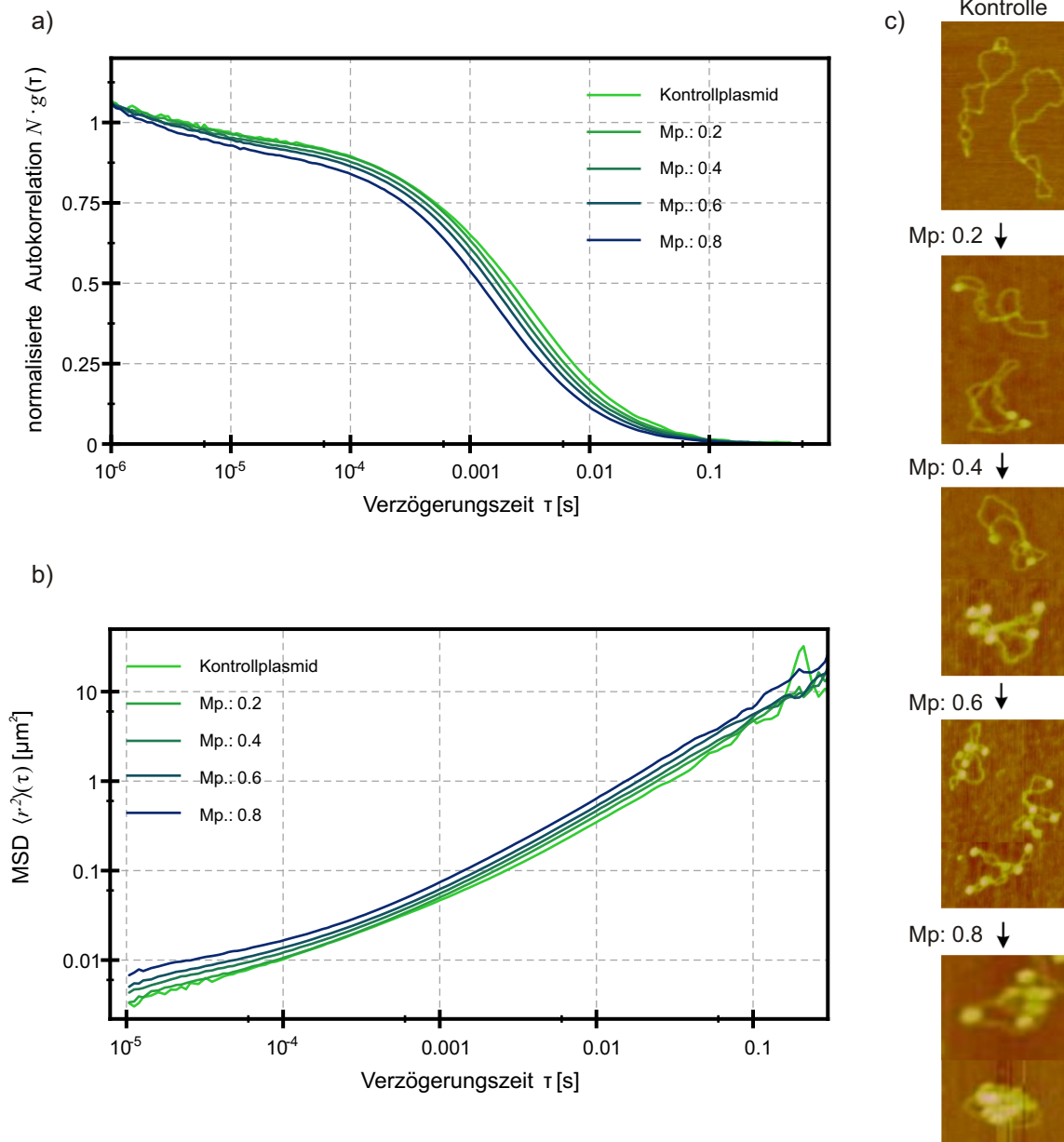


Abbildung 3.19.: Ergebnisse der Messungen zur internen Dynamik von Plasmiden mit einer Torsionsspannung von $\sigma = -0.046$ und auf ihnen rekonstituierten Nukleosomen. : (a) zeigt die normalisierten Autokorrelationsdaten für Alexa-488-markierte Plasmide mit ansteigender Nukleosomenzahl. (b) zeigt die normalisierten, mittleren quadratischen Verschiebungen (MSD). (c) zeigt beispielhafte Rasterkraftaufnahmen der vermessenen Proben. Die Massenproportion, und somit die Nukleosomenzahl, (Massenproportion: 0-0,8) steigt von oben nach unten.

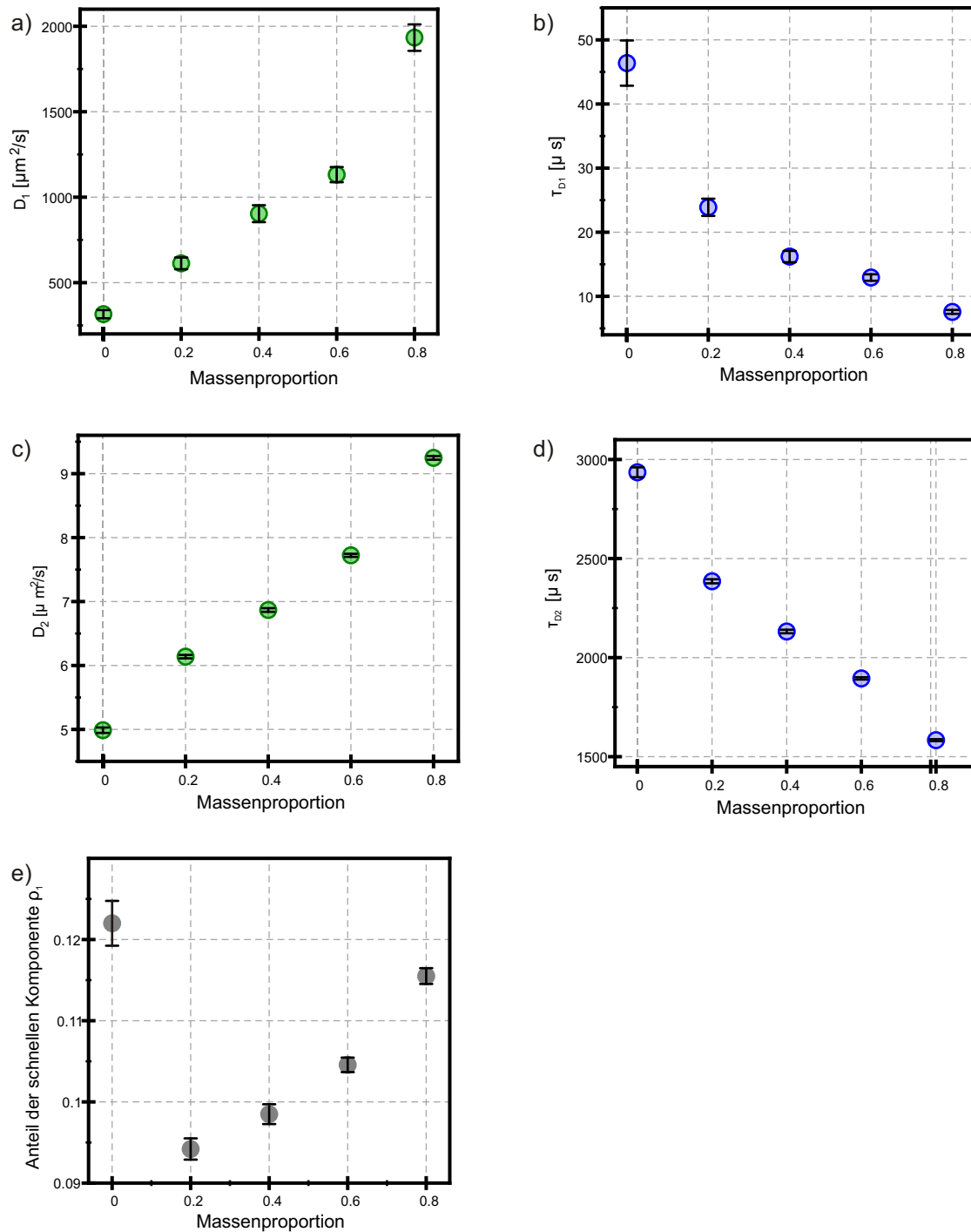


Abbildung 3.20.: Fitergebnisse der Autokorrelationsdaten der Plasmide ($\sigma = -0.046$) mit steigender Nukleosomenzahl : (a) und (c) zeigen die Diffusionskoeffizienten der beiden diffundierenden Komponenten aus dem FCS-Fit (a: schnelle Komponente, c: langsame Komponente). (b) und (d) zeigen die entsprechenden Diffusionszeiten. (e) gibt den Anteil ρ_1 der schnell diffundierenden Komponente in Abhängigkeit der Nukleosomendichte wieder. Die Fehler in den einzelnen Graphen stammen aus dem FCS-Fit.

rende Komponente. Hier ist ebenfalls ein Anstieg der Werte von Anfangs $D_1 = (316 \pm 24) \mu\text{m}^2/\text{s}$, für die Kontrollprobe, auf $D_1 = (1933 \pm 77) \mu\text{m}^2/\text{s}$, für die Probe bei einer Massenproportion von 0,8. Die in allen Plots gezeigten Fehler stammen aus dem FCS Fit der Daten.

Abbildung 3.20 (e) zeigt Änderungen im Anteil von ρ_1 . Hier fällt zunächst der starke Unterschied zwischen der Kontrollprobe und der ersten Massenproportion von 0,1 auf. Der Anteil ρ_1 von anfänglich $\rho_1 = (0,12 \pm 0,003)$ bei der Kontrollprobe auf $\rho_1 = (0,094 \pm 0,001)$ bei $Mp.0,2$. Ab der ersten Massenproportion steigt der Anteil ρ_1 schrittweise auf $\rho_1 = (0,11 \pm 0,001)$ und liegt damit wieder im Bereich der Kontrollprobe.

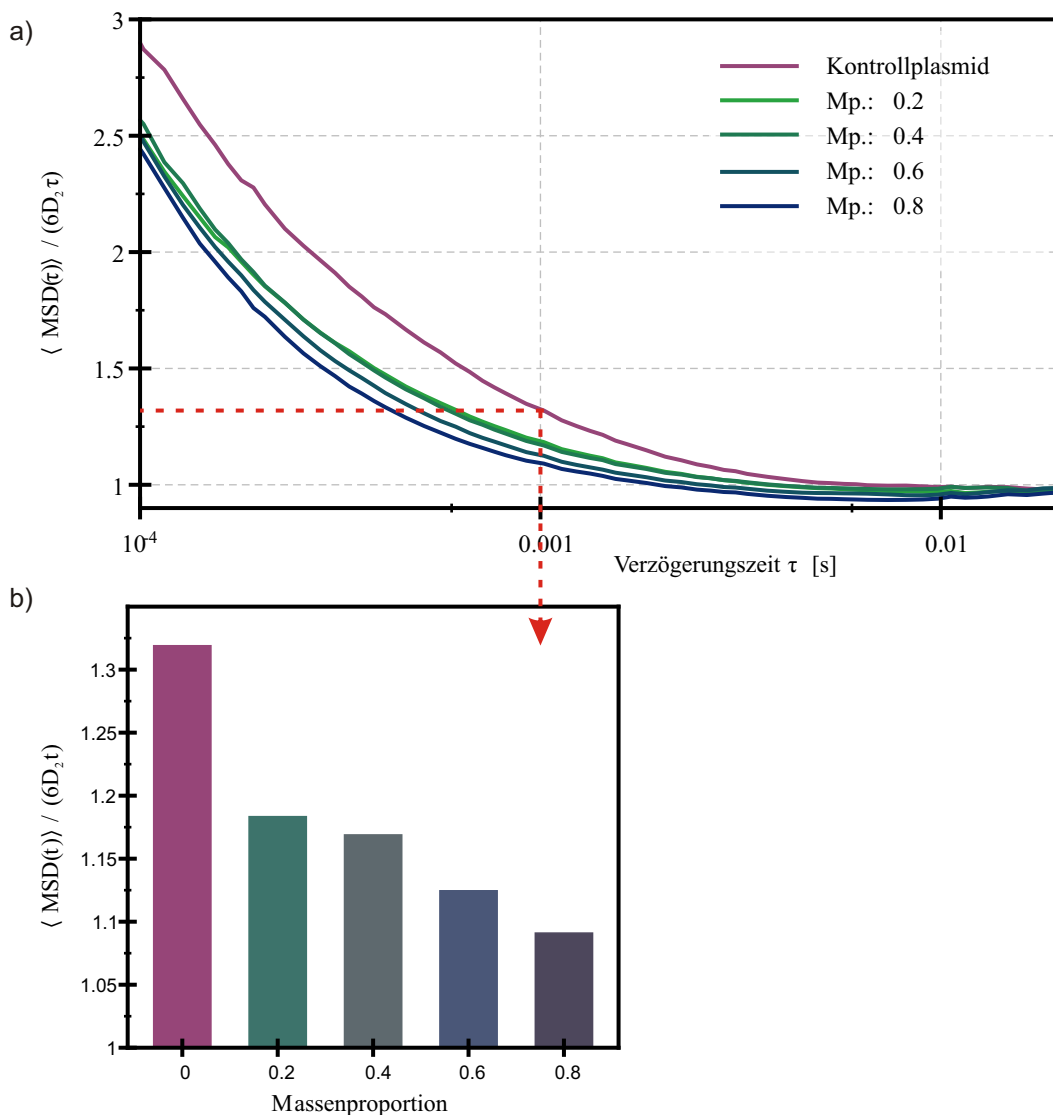


Abbildung 3.21.: Ergebnisse der Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik der MSD Daten von Nukleosomen auf Plasmiden (Teil 1) : (a) zeigt die Daten aus der Berechnung der relativen Änderung der internen Dynamik mittels $\text{MSD}/6D\tau$. (b) zeigt einen Ausschnitt der Daten bei $\tau = 0,001$ s (roter Pfeil).

3.5.4. Messung der internen Dynamik über MSD

Wie auch zuvor, (z.B. Abschnitt 3.4.4) wird die interne Dynamik von der globalen Dynamik mathematisch getrennt. Abbildung 3.21 (a) zeigt die Ergebnisse.

Abbildung 3.21 (b) zeigt die relative Beschleunigung gegenüber der globalen Diffusion bei $\tau = 0,001$ s. Hier wird der schrittweise Abfall der relativen Beschleunigung deutlich. Sie sinkt hier von Anfangs 1,32 bei der Kontrollprobe (violett) auf 1,1 bei einer Massenproportion von 0,8 ab. Auffällig ist der relativ große Abstand zwischen der Kontrollprobe und den restlichen Proben. Der Schritt zwischen der Kontrollprobe und der ersten Massenproportion, mit 1 bis 2 Nukleosomen pro Plasmid, ist der größte. Hier sinkt der Wert von 1,32, bei der Kontrollprobe, auf 1,18 bei der Massenproportion von 0,2 ab.

In der Darstellung der relativen Änderungen der internen Dynamik gegenüber der globalen, wird eine Verlangsamung der internen Dynamik mit steigender Massenproportion (Kontrolle: violett, Mp. 0,2 bis 0,8: grün nach blau) sichtbar. Dies kann erklärt werden durch die steigende Verpackung der Plasmid-DNA mit Zunahme der Nukleosomenzahlen pro Plasmid (siehe Abbildung 3.19).

Abbildung 3.22 (a) zeigt die Amplitude $\sqrt{\text{MSD} - 6D_2\tau}$ der internen Bewegung, also die absolute interne Bewegung des Polymers. Hier fällt zunächst die Form der Amplitude für die Kontrollprobe (violett) auf. Sie hat ihr Maximum zwischen $\tau = 5 \cdot 10^{-4}$ s und $\tau = 5 \cdot 10^{-3}$ s. Dieses erreicht im Vergleich zu allen anderen Kurven den höchsten Wert. Für $\tau \geq 5 \cdot 10^{-3}$ s übersteigt die globale Dynamik die interne und überdeckt sie damit. Die aus $\sqrt{\text{MSD} - 6D_2\tau}$ berechnete Amplitude geht damit gegen 0 (nicht gezeigt). Der Bereich der maximalen Amplitude ist auf der Zeitskala im Vergleich mit den anderen Proben nach rechts verschoben.

Vergleicht man die Kurve der Kontrollprobe mit der Kurve der Probe mit Mp. 0,2 (Mp.: Massenproportion) so sieht man ein gleiches Verhalten mit gleicher Amplitudenhöhe im Bereich zwischen $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 10^{-4}$ s für beide Kurven. Auf dieser kurzen Zeitskala scheint es zwischen dem reinen Plasmid und den Proben mit 1 bis 2 Nukleosomen pro Plasmid keinen Unterschied zu geben. Wie man in Abbildung 3.19 (b) erkennen kann erhält man bei der Rekonstitution der Nukleosomen immer eine heterogene Verteilung der Nukleosomenzahlen pro Plasmid. Bei jeder Messung wird also über Plasmide unterschiedlicher Packungsdichte gemittelt. Auf sehr kurzen Zeitskalen wird die Bewegung des Plasmids durch geringe Nukleosomenzahlen (grün) im Vergleich zum Kontrollplasmid (violett) wohl nicht oder nur unmerklich beeinflusst.

Auf etwas längeren Zeitskalen, also zwischen $\tau = 5 \cdot 10^{-4}$ s und $\tau = 5 \cdot 10^{-3}$ s ist der Einfluss der Nukleosomen zu beobachten: Die Amplituden haben unterschiedliche Höhen in diesem Bereich. Im Vergleich zu der Kontrollprobe kommt es zu einer Verlangsamung der internen Dynamik in diesem Zeitabschnitt für die Probe mit Mp. 0,2. Betrachtet man den Rest der Kurven

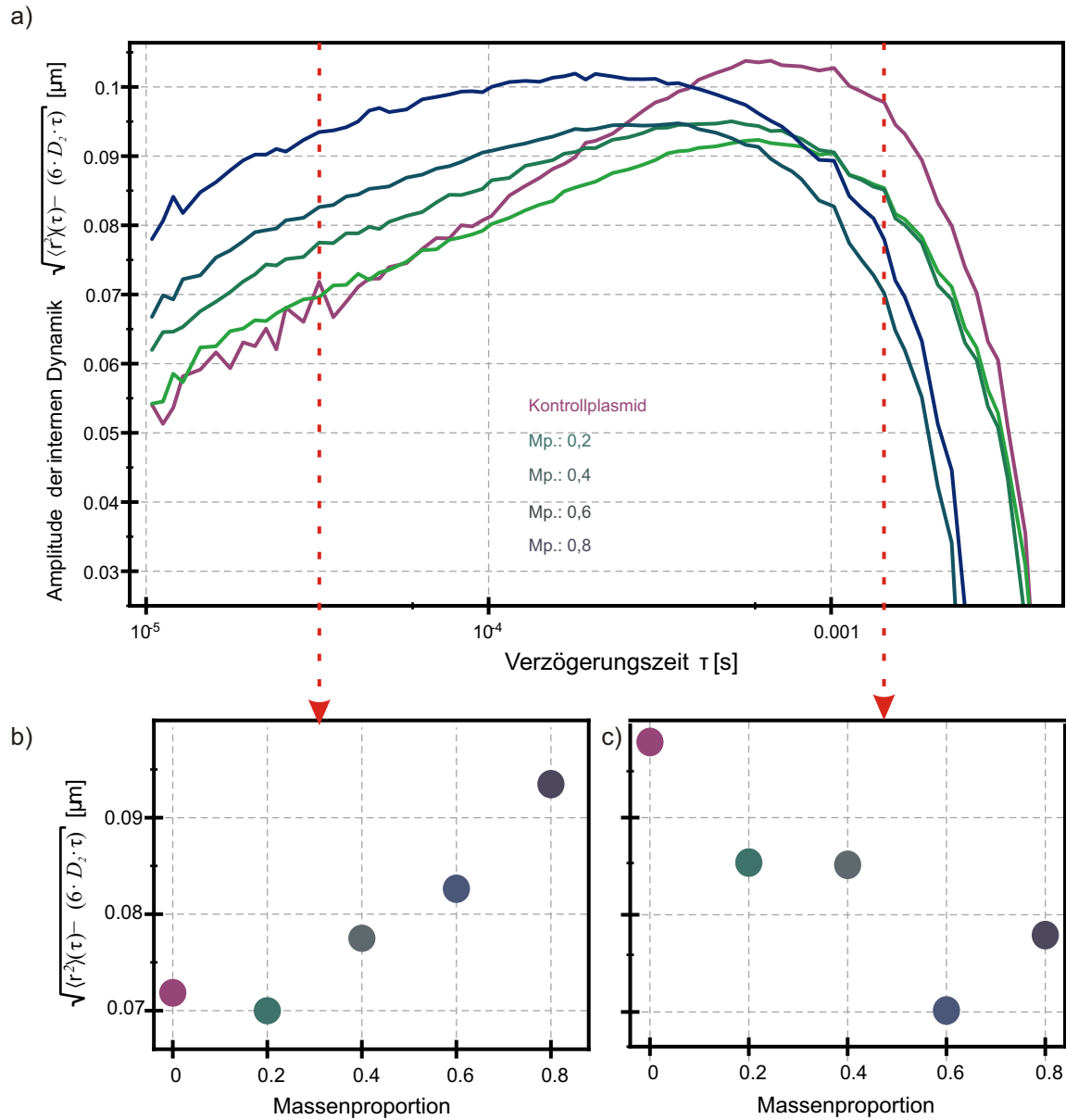


Abbildung 3.22.: Ergebnisse der Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik der MSD Daten von Nukleosomen auf Plasmiden (Teil 2) : (a) zeigt die Daten nach dem Abziehen der globalen Dynamik durch $\text{MSD} - 6D\tau$. (b) zeigt zwei Ausschnitte der Daten bei $\tau = 0,00032 \text{ s}$ und (c) $\tau = 0,0015 \text{ s}$ (roter Pfeil).

im Vergleich, so wird eine Erhöhung der Amplitude der internen Dynamik im Bereich zwischen $\tau = 10^{-5}$ s und $\tau = 5 \cdot 10^{-4}$ s mit steigender Massenproportion der Proben sichtbar. Die Kurven spalten sich mit steigender Nukleosomenzahl nach oben in der Reihenfolge Mp. 0,2; Mp. 0,4; Mp. 0,6; Mp. 0,8 auf. Mit steigender Nukleosomenzahl steigt also auch die Amplitude der internen Dynamik auf kürzerer Zeitskala.

Beim Vergleich von Abbildung 3.21 und Abbildung 3.22 wird ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden mathematischen Verfahren zur Herausstellung der internen Dynamik deutlich: Abbildung 3.21 (a) suggeriert eine Abnahme der internen Dynamik gegenüber der globalen Dynamik. Insgesamt sinkt der Anteil der internen Dynamik mit steigender Nukleosomenzahl. Andererseits steigt auf kurzen Zeitskalen die Amplitude mit steigender Nukleosomenzahl, wie in Abbildung 3.22 sichtbar wird, an.

Abbildung 3.22 (b) zeigt einen Ausschnitt der Daten bei $\tau = 3,2 \cdot 10^{-4}$ s, bei diesem Beispiel wird der Beschleunigungseffekt nochmals verdeutlicht. Ab einer Verzögerungszeit von $\tau = 5 \cdot 10^{-4}$ s sinken die Kurven der Proben mit Nukleosomen. Die Kurven für die ersten beiden Massenproportionen (Mp. 0,2 und Mp. 0,4) verhalten sich ab $\tau = 10^{-3}$ s gleich. Im Vergleich zu den beiden höheren Massenproportionen sinken die Kurven der beiden niedrigeren Massenproportionen bei späteren Verzögerungszeiten τ auf 0. Dies ist der Wert, ab dem keine interne Dynamik mehr messbar ist. Um dies genauer zu untersuchen wird im Folgenden die Übergangszeit aus Potenzgesetz-Fits an die vollen MSD-Kurven ermittelt (siehe Abbildung 3.23).

Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse aus der Analyse der MSD Daten mit Potenzgesetz-Fits auf unterschiedlichen Zeitskalen. Abbildung 3.23 (b) zeigt den Übergangszeitpunkt $\tau_{\text{int} \rightarrow \text{global}}$ bei dem die interne Dynamik in die globale Dynamik übergeht. Hier sieht man eine Verschiebung der Übergangszeitpunkte zwischen den beiden Dynamikregimen (intern-global) in Richtung kleinere Verzögerungszeiten $\tau_{\text{int} \rightarrow \text{global}}$. Auf der Zeitachse verschiebt sich also der Übergangszeitpunkt mit steigender Massenproportion nach links.

Abbildung 3.23 (c) zeigt Änderungen im Anomaliekoeffizienten α , der die Steigung im doppelt logarithmischen Plot auf kurzen Zeitskalen der Kurve angibt. Hier ist ein leichtes Absinken der Steigung von anfänglich 0,57 für die Kontrollprobe auf 0,416 für die Probe mit der höchsten Massenproportion sichtbar.

Von der Plasmid-DNA, mit einer Gesamtlänge von ca. 2,6 kb, werden im Nukleosom jeweils ca. 147 bp in einer linksgängigen Windung um das Histonoktamer verpackt. Je mehr DNA in Nukleosomen auf diese Weise verpackt vorliegt, desto weniger DNA kann sich frei bewegen. Erstaunlicherweise scheint die stufenweise Verpackung der DNA auf sehr kurzen Zeitskalen zu einer Beschleunigung der Dynamik zu führen. Es kommt aber relativ zur globalen Dynamik zu einer Abnahme der relativen Beschleunigung durch die interne Dynamik, wie aus Abbildung 3.21

ersichtlich wird. Absolut findet die interne Dynamik mit steigender Verpackung auf kürzer werdenden Zeitskalen statt, der Übergang in die globale Diffusion geschieht desto früher, je größer die Nukleosomenzahl ist.

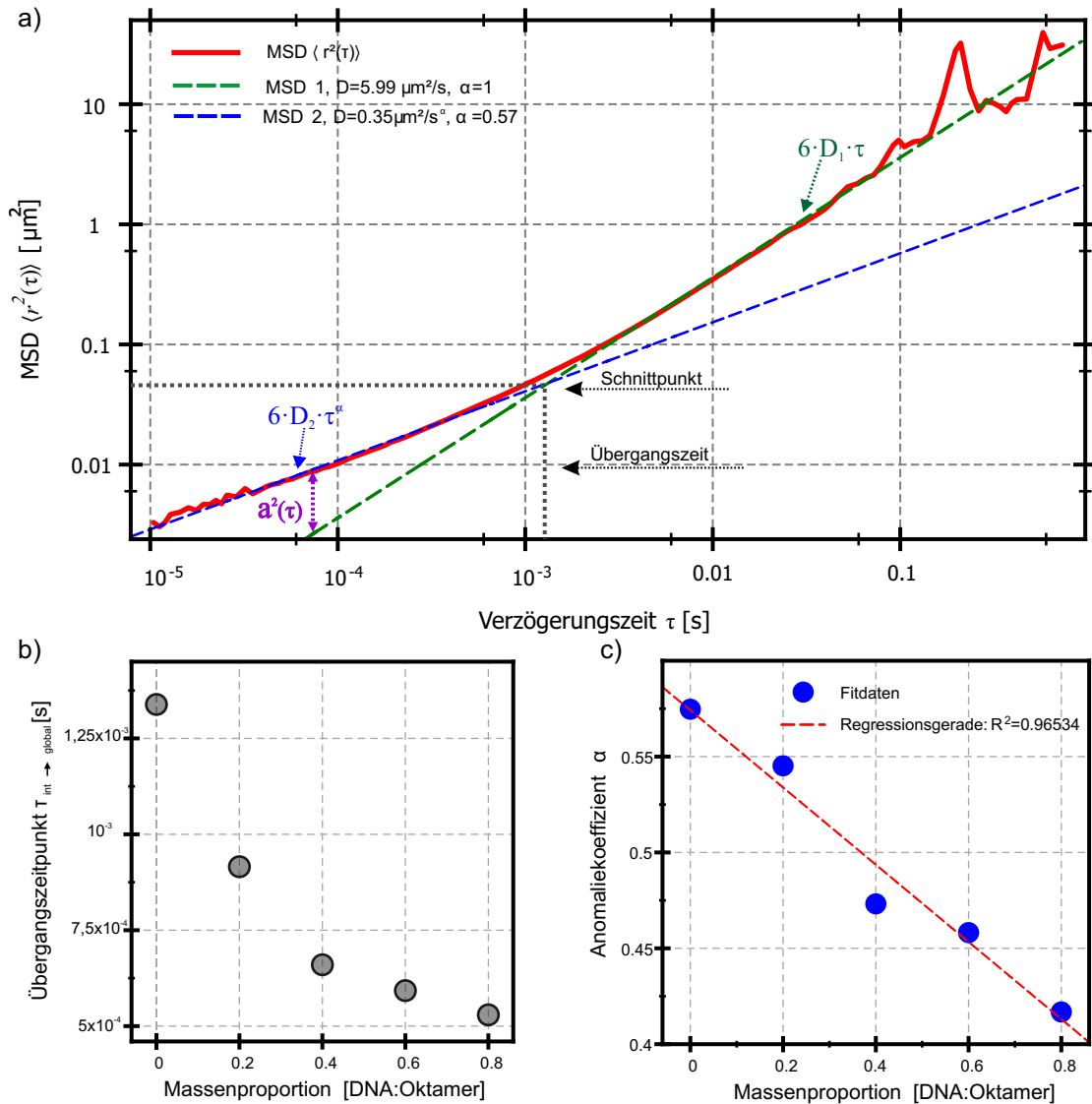


Abbildung 3.23.: Fitergebnisse der MSD Daten von Plasmiden mit steigenden Nukleosomenzahlen : a) zeigt den Übergang aus den Fitergebnissen an der MSD Kurve für das Kontrollplasmid als Beispiel. b) zeigt die Änderungen des Übergangzeitpunkts der beiden Dynamikregime für Plasmide mit steigender Nukleosomenzahl. (c) zeigt den Anomaliekoeffizienten α .

4. Nukleosomenstruktur und Stabilität

4.1. Einleitung

Die effiziente Verpackung von 2 Meter humaner diploider genomischer DNA in den Zellkern wird stufenweise erreicht. Die erste Stufe der Kompaktierung ist die Bildung von Nukleosomen, diese werden in Strukturen höherer Ordnung organisiert bis hin zu hoch kondensiertem Chromatin. Komplexierte und kondensierte DNA muss für Prozesse wie Transkription, Replikation und andere zelluläre Prozesse zugänglich gemacht werden [61, 62]. Viele Mechanismen ermöglichen den Zugang zu nukleosomaler DNA. Dazu gehören die Repositionierung oder der Verlust von Histonen durch Histonchaperone, Remodellierungsfaktoren, wie auch Transkriptionsfaktoren. Auch das Gleiten von Nukleosomen, sowie thermale Fluktuationen der nukleosomalen DNA (sog. Breathing/Atmen), sorgen für ihre Zugänglichkeit [68–70].

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass mechanische Kräfte die auf die DNA wirken wie z.B. die Torsionsspannung, ebenfalls Einfluss auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen haben [71–73].

Das Zwillingshelixmodell [74] beschreibt Veränderungen in der Torsionsspannung, wie sie z.B. während der Transkription stattfinden (siehe auch Abschnitt 1.7.2). Hier entsteht während der Elongationsphase rund um den Polymerasekomplex eine DNA-Domäne mit entgegengesetzter Torsionsspannung. Vor der Polymerase entsteht durch die Überwindung der DNA positive Torsionsspannung und hinter dem Polymerasekomplex negative Torsionsspannung durch die Unterwindung der DNA. Diese Domäne wandert mit dem Polymerasekomplex durch das Chromatin. Es konnte gezeigt werden, dass die positive Torsionsänderungen in der DNA die Dislokation der Nukleosomen vor dem Polymerasekomplex unterstützen. Dies kann zur Ablösung von einzelnen Histonteilen oder den ganzen Histonoktameren führen. Die negative Torsionsspannung hinter dem Komplex fördert die erneute Bildung von Nukleosomen [79–81].

Die genaue Rolle der Torsionsspannung ist allerdings bis jetzt nicht geklärt. Aktuelle Daten aus in vivo Studien konnten Zweifel über die Existenz von uneingeschränkter, Transkriptionsabhängiger Superspiralisierung in eukaryotischen Zellen ausräumen. Es konnte gezeigt werden, dass der Polymerase Komplex schnell genug ist um positive Torsionsspannung zu erzeugen,

obwohl parallel die Strangrelaxation durch Topoisomerasen abläuft [75–78].

In einer aktuellen Studie zu dynamischer Kraftspektroskopie, wurde Torsionsspannung als Parameter genutzt um das Stabilitätsverhalten von Nukleosomen indirekt zu beobachten. Hierzu wurde ein DNA-Strang mit Nukleosomen verdreht um Torsionsspannung zu erzeugen, gefolgt von der Streckung der DNA [82]. Der beobachtete zweistufige Kraftabfall bei ansteigender Zugkraft wurde als Loslöseprozess der Nukleosomen interpretiert. Dieser zweistufige Prozess konnte bereits in Simulationen und anderen Zugkraftexperimenten gezeigt werden [136, 137].

Die Experimente, die im nächsten Kapitel vorgestellt werden, zeigen die Ergebnisse der ersten direkten Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Torsionsspannung auf die Nukleosomenstruktur wie auch auf ihre Stabilität. Die Nukleosomen wurden hier auf Plasmiden rekonstituiert, die eine biochemisch voreingestellte Torsionsspannung aufwiesen. Die vier untersuchten Torsionsspannungen waren $\sigma \in \{-0.046, -0.02, 0, 0.031\}$. Der Einfluss der Torsionsspannung auf die Nukleosomenstruktur wurde durch die direkte Abbildung der Moleküle mittels Rasterkraftmikroskopie erreicht.

Der Einfluss der Torsionsspannung auf die Stabilität von Nukleosomen wurde mittels FCS untersucht. Hierzu wurden Nukleosomen verwendet, die entweder am äußeren Dimer des Histon-oktamers fluoreszent markiert waren oder am inneren Histon-Tetramer. Durch Salz-induzierte Destabilisierung wurde der Zerfall der Nukleosomen bei steigenden NaCl-Konzentrationen beobachtet.

4.2. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zum Einfluss der DNA Superspiralisierung auf den Nukleosomenöffnungswinkel

4.2.1. Experimentdurchführung

Um den Einfluss der Torsionsspannung auf die Struktur der Nukleosomen zu untersuchen, wurden Rasterkraftaufnahmen von Nukleosomen auf Plasmiden unterschiedlicher Torsionsspannung gemacht. Dies ermöglicht es die unmittelbare Abbildung des Einflusses von Torsionsspannung auf die Struktur von Nukleosomen (siehe Abschnitt 4.2) zu untersuchen.

Die Torsionsspannungen der Plasmide wurden biochemisch eingestellt (siehe Abschnitt 2.4). Ausgewählt wurden Plasmide mit Torsionsspannungen von $\sigma = -0,046$ (nativ), $\sigma = -0.02$, $\sigma = 0$ und $\sigma = 0,031$. Plasmide mit der schwächeren negativen Torsionsspannung von $\sigma = -0.02$ wurden ausgehend von der nativen Form mittels Ethidiumbromid und Topoisomerase I erzeugt (siehe Abschnitt 2.4.2). Relaxierte Plasmide, mit einer Torsionsspannung von $\sigma = 0$ wurden

enzymatisch mittels Topoisomerase relaxiert (siehe Abschnitt 2.4). Ebenso wurden Plasmide mit positiver Torsionsspannung $\sigma = 0.031$ erzeugt. Diese wurde ausgehend von der nativen Form des Plasmids mit divalenten Kationen (MgCl_2) und Topoisomerase I hergestellt (siehe Abschnitt 2.4).

Die Massenproportionen von DNA zu Histonproteinen wurde bei der Rekonstitution (siehe Abschnitt 2.7.2) so gewählt, dass die meisten Plasmide ein oder zwei Nukleosomen trugen. Die Kontrollen hierzu erfolgten im Agarosegel und mittels SFM-Messungen (siehe Abschnitt 2.5.2 und 2.9).

Um den Einfluss der Torsionsspannung auf die DNA Struktur zu untersuchen kann der Öffnungswinkel des Nukleosoms vermessen werden (siehe Abbildung 2.11 (a)). Dieser Öffnungswinkel, im folgenden α genannt, variiert mit der Menge an DNA, die um das Histonoktamer gebunden vorliegt. Aus den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurde für ausgewählte Nukleosomen die Größen von α vermessen (siehe Abbildung 2.11 (b-e) für Beispielbilder).

Für die Winkelbestimmung wurden nach den Bild-Aufnahmen etwa 100 Moleküle ausgewählt, die bestimmte Kriterien erfüllten. Die Moleküle mussten einzeln auf der Glimmeroberfläche liegen und sich nicht mit anderen Molekülen überlagern. Ebenso mussten die Moleküle eine, für eine zweidimensionale Bindefläche, equilibrierte Struktur aufweisen (siehe Abschnitt 2.9). Die Erscheinungsform für superhelikale Plasmide sollte plectonem also geflochten sein (siehe Abbildung 2.11 (b, c, e), DNA ohne Torsionsspannung sollte ringförmig vorliegen (siehe Abbildung 2.11 (d)). Hinweis: Ein Teil der SFM-Messungen wurde bereits während meiner Diplomarbeit [138] aufgenommen. Etwa die Hälfte der SFM-Daten für Plasmide mit Torsionsspannungen von $\sigma = (-0,046; 0; 0,031)$ wurden während der Zeit aufgenommen. Die Messungen wurden während meiner Promotion vervollständigt und um ein weiteres Topoisomer ($\sigma = -0,02$) ergänzt.

4.2.2. Ergebnisse der SFM-Messungen

Abbildung 4.1 a-d zeigt die Verteilungen der gemessenen Winkel für alle Plasmidtopoisomere. Die vier Histogramme zeigen die Verteilung der gemessenen Winkel für jedes Topoisomer. Eine Tendenz zu größeren Öffnungswinkeln ebenso wie die Verbreiterung der Verteilung von $\sigma = -0.046$ nach $\sigma = 0.031$ ist zu sehen.

Abbildung 4.2 zeigt die Mittelwerte der Verteilungen sowie ihre Standardabweichung in Abhängigkeit der Torsionsspannung σ . Die kleinsten Öffnungswinkel finden sich bei der höchsten negativen Torsionsspannung ($\sigma = -0.046$). Die Größe der Winkel vergrößert sich mit steigendem σ und levelt bei $\sigma = 0$ ab.

Je höher die negative Torsionsspannung auf dem Plasmid ist, desto kleiner der Öffnungswinkel und desto größer ist die Menge an gebundener DNA. Die größere Menge an gebundener DNA

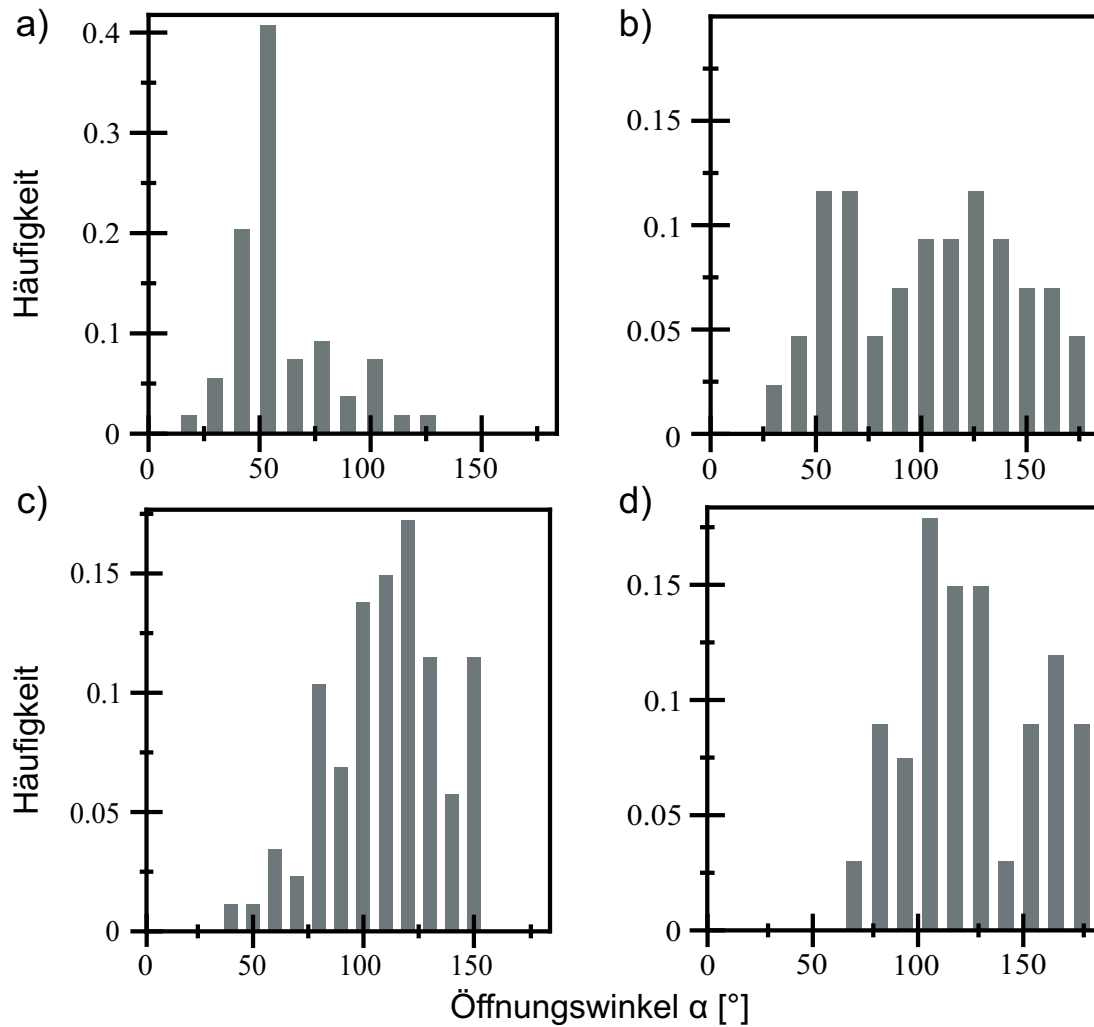


Abbildung 4.1.: Ergebnisse der SFM-Topographieanalyse für die Öffnungswinkelgröße α .
Gezeigt werden die Verteilungen der gemessenen Öffnungswinkel bei den verwendeten vier superhelikalen Dichten $\sigma \in \{-0,046, -0,02, 0, 0,031\}$.

bedeutet eine größere Zahl an Kontaktstellen zwischen der DNA und dem Histonoktamer. Dieser Effekt lässt eine höhere Stabilität des Komplexes bei negativer Torsionsspannung vermuten. Die Stabilität kann mit SFM allerdings nicht direkt vermessen werden, da die Moleküle an eine Oberfläche gebunden vorliegen. Die Stabilität wurde daher mittels Salz-induzierter Destabilisierung von Nukleosomen in FCS-Experimenten untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

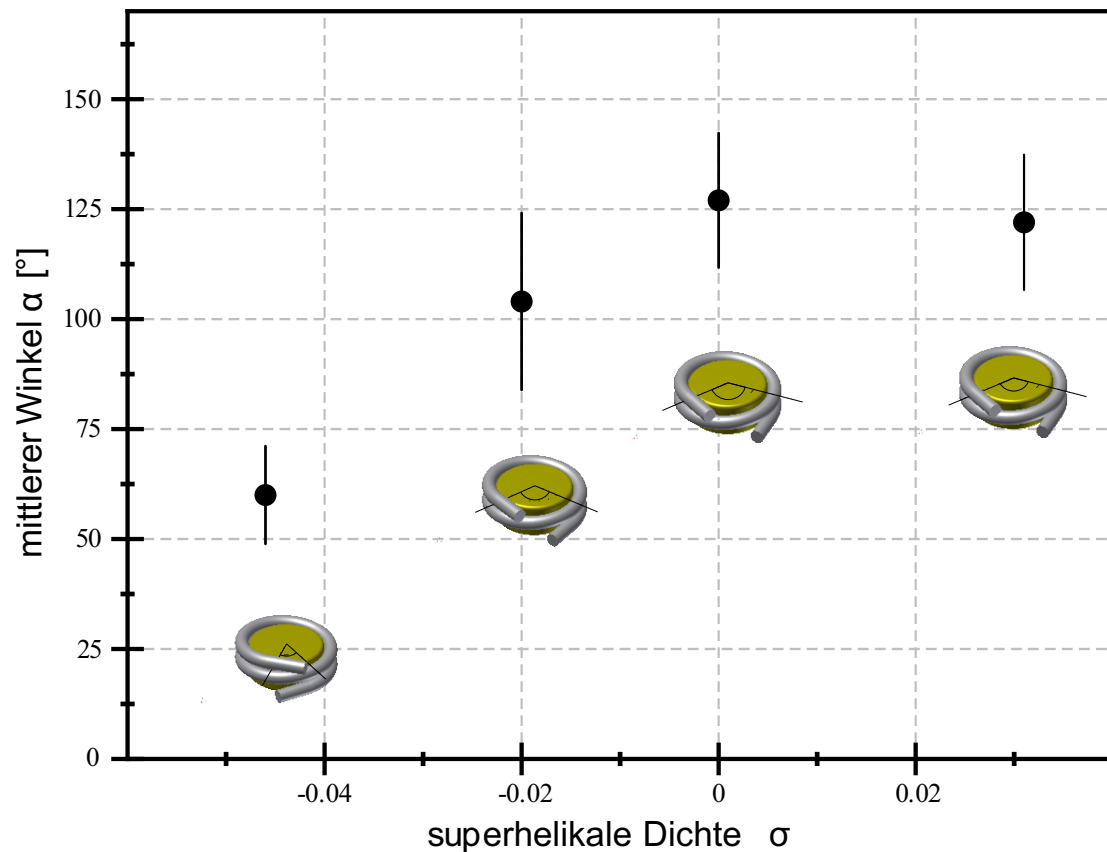


Abbildung 4.2.: Ergebnisse der SFM Topographieanalyse für die Öffnungswinkelgröße α . Gezeigt sind die mittleren Öffnungswinkel für Nukleosomen auf Plasmiden mit (a-d) $\sigma \in \{-0,046; -0,02; 0; 0,031\}$. Die eingefügten Grafiken zeigen eine grobe Illustrierung der Nukleosomenkonformation (Histone: gelb, DNA: grau).

4.3. FCS-Messungen der Salz-induzierten Destabilisierung von fluoreszent-markierten Nukleosomen

4.3.1. Experimentdurchführung

Im letzten Abschnitt wurde der Einfluss der Torsionsspannung auf die Nukleosomenstruktur rasterkraftmikroskopisch untersucht. In diesem Abschnitt wird nun die Stabilität der Nukleosomen direkt vermessen. Hierzu wird die Salz-induzierte Destabilisierung angewendet ([139]), bei der die Proben steigenden Salzkonzentrationen ausgesetzt werden. Durch die steigende Ionenstärke des Puffers, werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonoktamer schrittweise geschwächt. Hierdurch lassen sich auch leichte Unterschiede in der Stabilität darstellen.

Es wurden die gleichen Plasmidtopologien verwendet wie auch für die Rasterkraftaufnahmen. Die Massenproportionen für die Nukleosomenrekonstitutionen wurden auch hier so gewählt, dass die Plasmide maximal ein oder zwei Nukleosomen trugen. Dies wurde mit SFM Messungen kontrolliert.

Vor der Rekonstitution wurden die Histonoktamere entweder am H2B Histon (äußeres Dimer

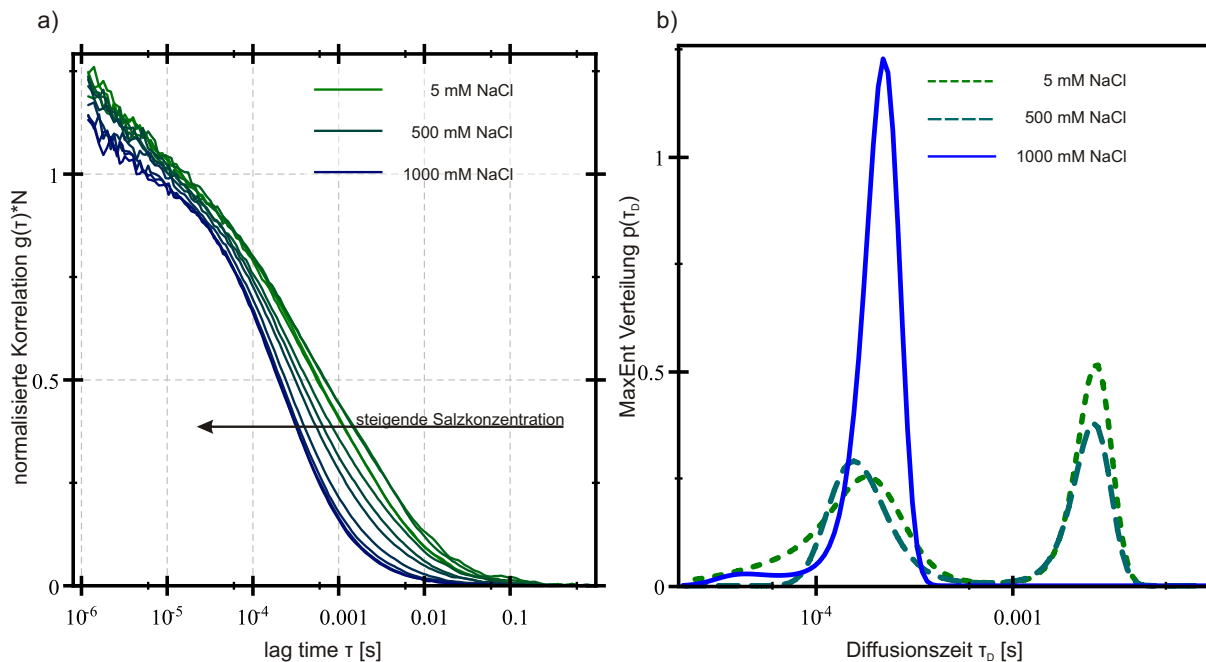


Abbildung 4.3.: Beispiele der Salz- induzierten Destabilisierung von H2B auf einem superhelikalen Plasmid mit $\sigma = -0.02$: (a) Normalisierte Autokorrelationskurve bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. (b) MaxEnt Verteilungen der Diffusionszeit τ_D für drei ausgewählte Salzkonzentrationen $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$ (gestrichelte grüne Linie), $[\text{NaCl}] = 500 \text{ mM}$ (gestrichelte dunkelgrüne Linie) und $[\text{NaCl}] = 1000 \text{ mM}$ (blaue Linie).

des Oktamerkomplexes) oder am Histone H4 (inneres Tetramer des Oktamerkomplexes) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 markiert. Dies ermöglicht es die Stabilität verschiedener Nukleosomenbestandteile einzeln zu untersuchen.

Die für die Destabilisierung gewählten Salzkonzentrationen lagen in 100 mM Schritten zwischen 100mM und 1000mM. Die Destabilisierung selbst, wurde mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ausgelesen. Für die FCS Messungen wurden die Proben auf eine Endkonzentration von etwa ~ 2 nM verdünnt. Für jede Probe wurden 20 aufeinanderfolgende Messungen à 60 s aufgenommen. Dieses Messschema ermöglicht die Eliminierung von Artefakten durch aggregierte Moleküle, indem die betroffenen Autokorrelationskurven vor der Auswertung aussortiert werden. An den Mittelwert der verbliebenen Messkurven wurden verschiedene theoretische FCS-Modellfunktionen gefittet (siehe Abschnitt 2.11.3).

Die Dissoziation der markierten Histone wurde über den Abfall der charakteristischen Zerfallszeiten der Autokorrelationskurven aus den FCS Messungen ermittelt. Ein Abfall der Zerfallszeit weist auf einen größer werdenden Anteil kleinerer, schneller diffundierender Teilchen hin. Abbildung 4.3a) zeigt als Beispiel normalisierte Autokorrelationskurven für die Salz-induzierte Destabilisierung der H2B-markierten Nukleosomen bei mittlerer negativer superhelikaler Dichte ($\sigma = -0.02$). Mit steigender Salzkonzentration zeigen die Autokorrelationskurven eine Verschiebung zu kleineren Verzögerungszeiten τ , ausgelöst durch den steigenden Anteil schnell diffundierender, freier H2B Histone. Die Daten wurden mit der Maximum-Entropie-Methode (MaxEnt, siehe Abschnitt 2.11.3) analysiert, um die Diffusionszeiten τ_D der fluoreszierenden Komponenten für jede Probe und jede Messung zu bestimmen.

4.3.2. FCS-Ergebnisse der Destabilisierung H2B-markierter Nukleosomen

Abbildung 4.3b) zeigt die Ergebnisse der MaxEnt Analyse bei drei verschiedenen Salzkonzentrationen. Die MaxEnt Kurven zeigen zwei diffundierende Komponenten bei $[\text{NaCl}] = 100$ mM und $[\text{NaCl}] = 500$ mM. Bei $[\text{NaCl}] = 1000$ mM ist nur noch eine schnell diffundierende Komponente zu sehen. Die schnell diffundierende Komponente hat eine Diffusionszeit von ungefähr $\tau_{D1} = 200 \mu\text{s}$, die langsamer diffundierende Komponente hat eine Diffusionszeit von ungefähr $\tau_{D2} = 2000 \mu\text{s}$. Aus diesen Zerfallszeiten τ_{Di} kann der hydrodynamische Radius der Teilchen, wie in Abschnitt 2.11.3 beschrieben, berechnet werden. Für die schnell diffundierende Komponente ergab sich $d_{\text{sphere}} = 3.6$ nm und für die langsame Komponente $d_{\text{sphere}} = 60$ nm. Der Wert der schnellen Komponente stimmt in etwa mit der Größe eines H2A/H2B Dimers überein, die aus der Kristallstruktur des Nukleosoms [140] mit Hilfe der Software PyMOL abgeschätzt wurde. Der hydrodynamische Radius der langsamer diffundierenden Komponente ist mit der Größe des Plasmids vergleichbar.

Für die weitere Analyse wurde ein einfacher zwei-Komponenten Fit ausgeführt, in welchem die schnelle Diffusionszeit auf $\tau_{D1} = 200 \mu s$ festgelegt wurde. Dieses Fit-Modell beschreibt die zwei Peaks der MaxEnt-Verteilung als zwei Korrelationszeiten τ_{D1} und τ_{D2} und gibt deren relatives Gewicht über den Parameter ρ_2 als Anteil der langsameren Komponente wieder.

Abbildung 4.5 zeigt die Ergebnisse für die Destabilisierung der H2B markierten Nukleosomen für alle DNA Topologien. Für jede Salzkonzentration ist der Anteil an intakten Nukleosomen aufgetragen, wie sie aus der Fraktion ρ_2 der langsamer diffundierenden Komponente berechnet wurde. Die Fraktionen wurden auf das mittlere ρ_2 bei geringer Salzkonzentration normalisiert. Dieses Vorgehen schließt bei $[NaCl] = 0 \text{ mM}$ schon vorhandene Dimere aus der Auswertung aus. Zur Normalisierung wurde ρ_2 über die Salzkonzentrationen $[NaCl] = 100 \text{ mM}$ bis $[NaCl] = 400 \text{ mM}$ gemittelt.

Jeder Datenpunkt wurde über sechs unabhängige Wiederholungen des Experiments gemittelt. Dafür wurden an unterschiedlichen Tagen jeweils frische Rekonstitutionsproben vermessen. Die durchgängigen Linien zeigen sigmoidale Fits an die Fraktion intakter Nukleosomen. Die Fits liefern eine halbmaximale Salzkonzentration von $c_{1/2}(\sigma = -0.046) = 576 \text{ mM}$, $c_{1/2}(\sigma = -0.02) = 591 \text{ mM}$, $c_{1/2}(\sigma = 0) = 515 \text{ mM}$, $c_{1/2}(\sigma = 0.031) = 538 \text{ mM}$. Diese sind vergleichbar mit den Daten, welche für Experimente mit Salz-induzierten Destabilisierungen von Nukleosomen auf kurzen DNA Fragmenten von Böhm et al. gefunden wurden [139].

Wie aus Abbildung 4.5 ersichtlich, ist bei einer Salzkonzentration von $[NaCl] = 600 \text{ mM}$ eine Trennung zwischen den beiden negativ superhelikalen Topologien ($\sigma = -0.046$, $\sigma = -0.02$) und den anderen Topologien ($\sigma = 0$, $\sigma = 0.031$) zu sehen. Die Kurven für $\sigma = 0$ und $\sigma = 0.031$ verhalten sich ähnlich und sinken schneller gegen Null als die negativ superhelikalen Proben. Dies weist auf einen Verlust intakter Nukleosomen hin. Bei einer Salzkonzentration von $[NaCl] = 700 \text{ mM}$ wird der Effekt deutlich stärker und ebenso steigt die Signifikanz des Unterschieds. Bei $[NaCl] = 800 \text{ mM}$ ist die Fraktion intakter Nukleosomen für $\sigma = 0$ und $\sigma = 0.031$ auf Null gesunken. Die Kurve für $\sigma = -0.046$ sinkt zwischen $[NaCl] = 900 \text{ mM}$ und $[NaCl] = 1000 \text{ mM}$ auf Null ab, während die Fraktion für $\sigma = -0.02$ erst zwischen $[NaCl] = 800 \text{ mM}$ und $[NaCl] = 900 \text{ mM}$ auf 0 sinkt. Abbildung 4.4 zeigt beispielhaft an vier Salzkonzentrationen wie sich die normalisierte Fraktion intakter H2B-markierter Nukleosomen für alle Plasmid-Topologien verhält.

4.3.3. FCS-Ergebnisse der Destabilisierung H4-markierter Nukleosomen

Die gleichen Experimente, wie im letzten Abschnitt, wurden auch für H4-markierte Nukleosomen durchgeführt. Abbildung 4.7 zeigt die Daten für die normalisierte Fraktion intakter H4-markierter Nukleosomen. Die durchgehenden Linien zeigen die Daten von je 3-4 Proben, die alle zwanzig

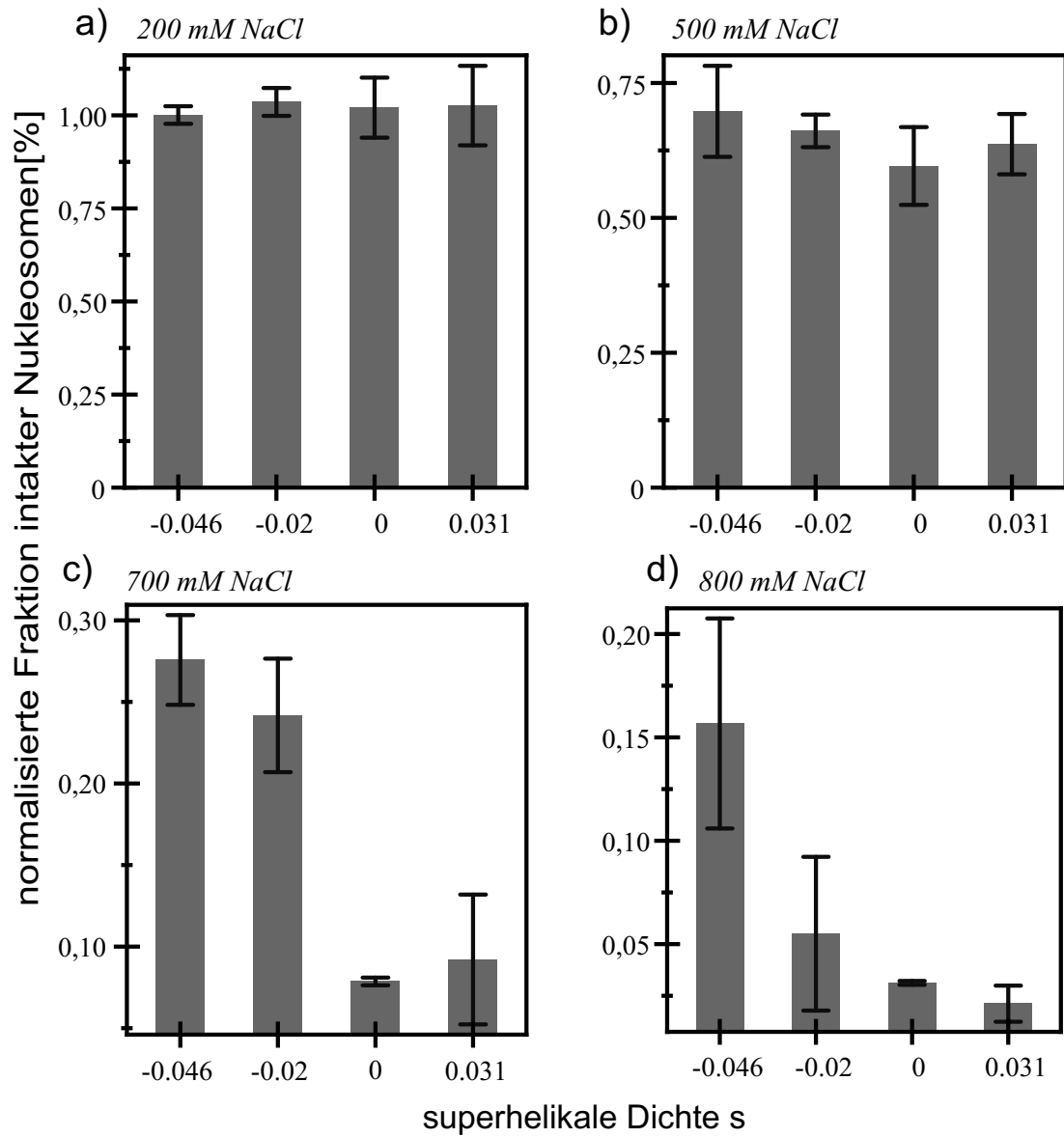


Abbildung 4.4.: Ergebnisse der Salz-induzierten Destabilisierung von H2B markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$: Gezeigt werden Beispiele für den Anteil intakter Nukleosomen für alle σ , bei verschiedenen Salzkonzentrationen: (a) $[\text{NaCl}] = 200 \text{ mM}$, (b) $[\text{NaCl}] = 500 \text{ mM}$, (c) $[\text{NaCl}] = 700 \text{ mM}$, (d) $[\text{NaCl}] = 800 \text{ mM}$.

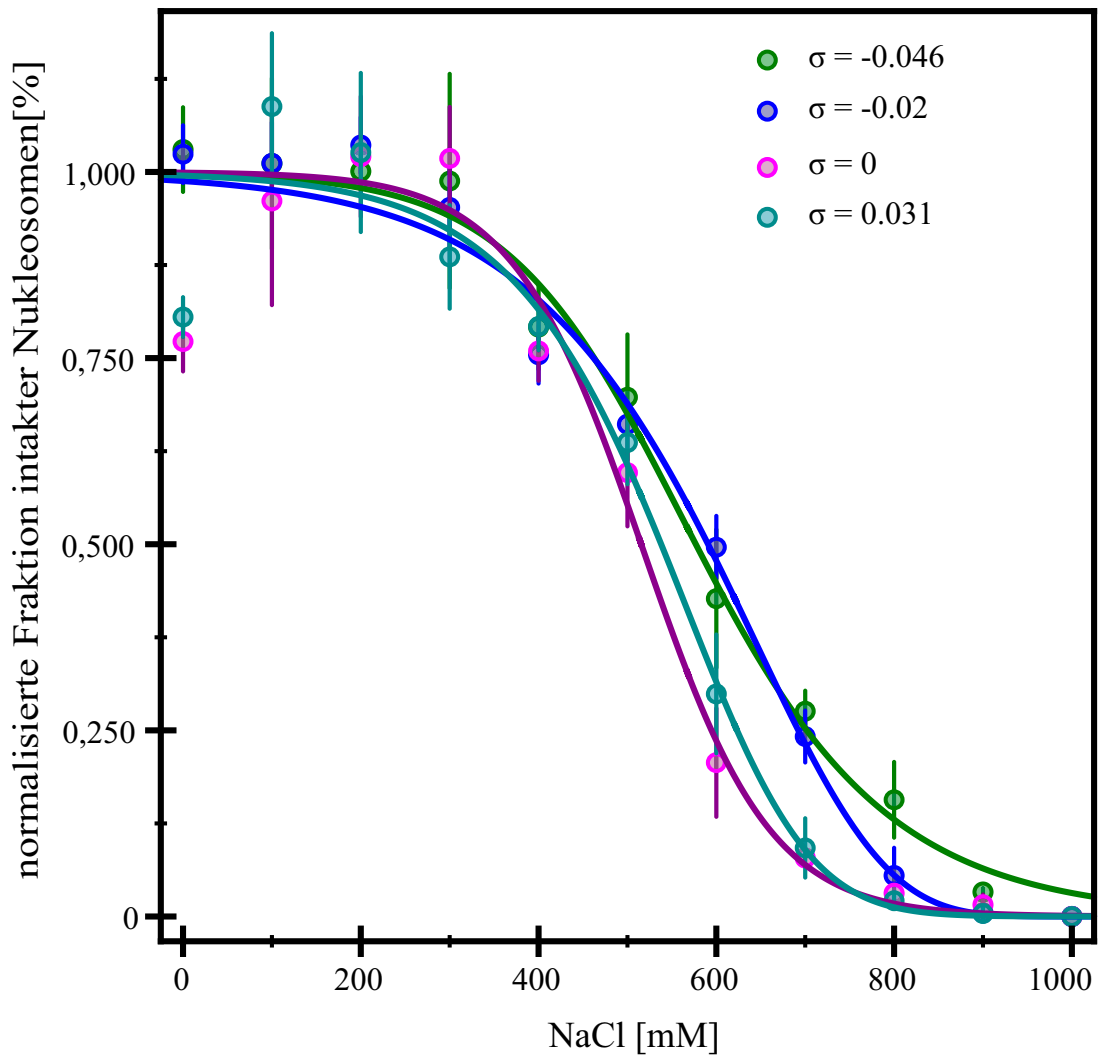


Abbildung 4.5.: Ergebnisse der Salz-induzierten Destabilisierung von H2B markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$: Gezeigt werden die normalisierten Anteile intakter Nukleosomen für H2B markierte Nukleosomen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.

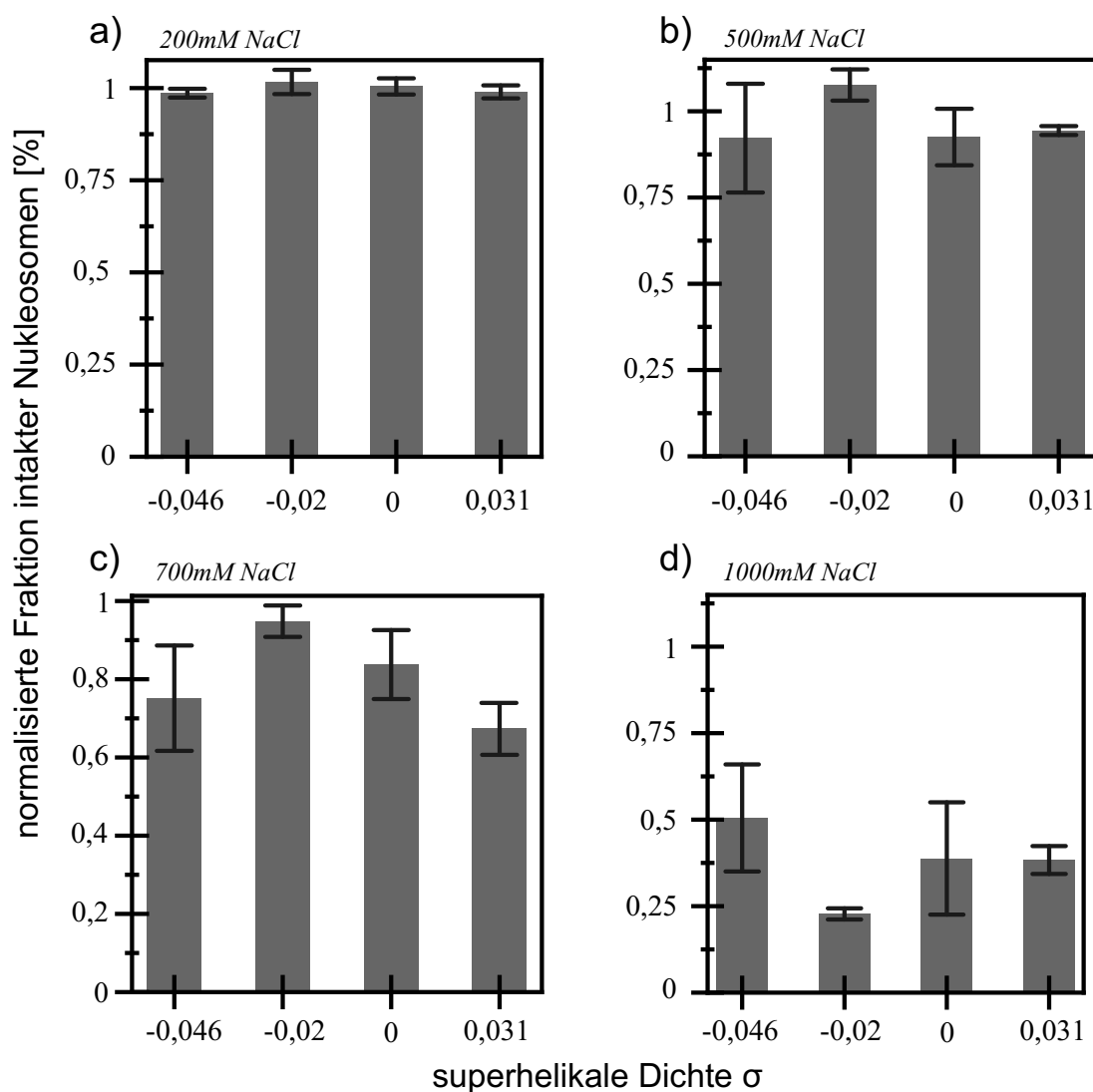


Abbildung 4.6.: Ergebnisse für die Salz-induzierte Destabilisierung von H4 markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$: Gezeigt werden die Daten für alle Topologien bei verschiedenen Salzkonzentrationen, [NaCl] = 200 mM, (b) [NaCl] = 500 mM, (c) [NaCl] = 700 mM, (d) [NaCl] = 1000 mM.

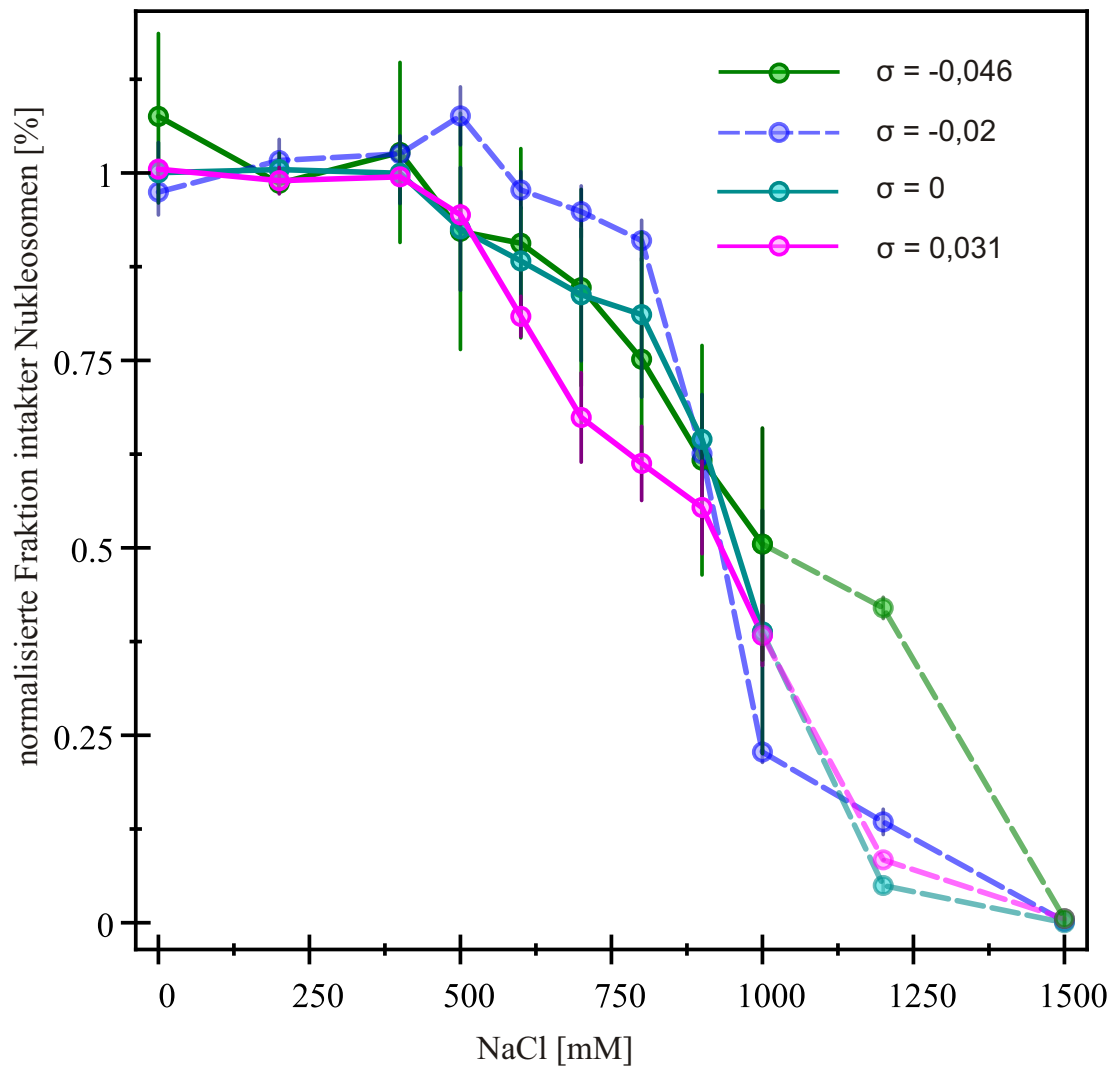


Abbildung 4.7.: Ergebnisse für die Salz-induzierte Destabilisierung von H4 markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$: Gezeigt werden die normalisierten Fraktion intakter Nukleosomen für H4 markierte Nukleosomen bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Die gestrichelten Linien zeigen die normalisierten Daten von zwanzig Messungen einer einzigen Probe, die durchgehende Linien zeigen die Daten von jeweils drei Proben, die ebenfalls zwanzig Mal gemessen wurden. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung aus den Wiederholungen der Experimente.

mal 60 s lang vermessen wurden. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung über alle normalisierten Messungen.

Die gestrichelte Linie zeigt die Daten einer einzelnen Probe (ohne Wiederholungen), die ebenfalls zwanzig Mal 60 s vermessen wurde. Die Fehlerbalken hier resultieren aus dem FCS-Fit. Ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten DNA Topologien ist nicht zu sehen. Bei einer Salzkonzentration von $[\text{NaCl}] = 1000 \text{ mM}$ sind, im Vergleich zu den H2B markierten Proben aller Topologien, immer noch etwa 30% der Nukleosomen intakt.

Messungen bei Salzkonzentrationen über $[\text{NaCl}] = 1000 \text{ mM}$ wurden ausgeführt, um zu untersuchen ab welcher Salzkonzentration die Kurven auf Null absinken. Wie Abbildung 4.7 zeigt, geschieht dies erst bei $[\text{NaCl}] = 1500 \text{ mM}$. Die halbmaximalen Salzkonzentrationen für die Destabilisierung H4 markierter Nukleosomen liegt zwischen 900 – 1000 mM, dies stimmt wieder mit den Daten aus Ref. [139] für Nukleosomen auf kurzen, linearen DNA-Stücken überein.

Abbildung 4.6 zeigt beispielhaft an vier Salzkonzentrationen wie sich die normalisierte Fraktion intakter H4-markierter Nukleosomen für alle Plasmid-Topologien verhält. Das innere Tetramer scheint gegenüber Änderungen der Torsionsspannung der DNA weniger empfindlich zu sein. Das Loslösen des inneren Histontetramers findet, im Vergleich zum Verhalten des äußeren Dimers, erst bei höheren Salzkonzentrationen statt. Die Daten erweitern die in Ref. [82] vorgestellten Daten aus den Zugkraftexperimenten von Sheinin et al., in denen im Vergleich zu den hier vorgestellten Daten das Schicksal des Histonoktamers nur indirekt beobachtet werden konnte. Die hier vorgestellten Daten wurden am 07.02.2015 veröffentlicht [141].

Teil IV.

Diskussion und Ausblick

5. Abschließende Diskussion und Ausblick

5.1. DNA-Struktur und Genregulation

Das in den 1980ern von [Liu und Wang](#) [74] postulierte Modell einer, durch die Elongationsbewegung der RNA-Polymerase, induzierten gegenläufigen Torsionsspannungs-Domäne um den Enzymkomplex herum („twin-helix“-Modell siehe Abschnitt [1.7.2](#)), hat in den letzten Jahren wieder an Aktualität gewonnen. Neuere Studien, die die Torsionsspannung sowie die Geschwindigkeit ihres Aufbaus quantifizierten, gaben ihr erneut Gewicht [[73](#), [77](#), [142](#)]. Es wurde gezeigt, dass sich bei der Transkription die Topologie, wie auch die Struktur der DNA verändern [[143](#)] und Torsionsspannung aufgebaut wird. Ebenso werden Nukleosomen repositioniert, wodurch sich die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA erhöht [[144–146](#)]. Diese Modifikationen wiederum können direkt auf die Transkriptionsmaschinerie rückkoppeln.

Der Transkriptions-abhängige Aufbau von Torsionsspannung wurde unter anderem in Burkitt-Lymphom Zellen gemessen [[77](#)]. Hierbei wurde die bevorzugte Bindung des Interkalators Psoralen an unterwundene DNA genutzt um die DNA Topologie in der Zelle zu untersuchen. Es zeigte sich, dass sich die Torsionsspannung als superhelikale Windungen von den Startpunkten aktiver Transkription etwa 1,5 kb weit ausbreitete [[77](#)].

Torsionsspannung wirkt genregulatorisch über die Konformationsänderungen struktureller und regulatorischer DNA-Elemente, wie z.B. dem, von dem Protoonkogen MYC-abhängigen, „far-upstream-element“ (FUSE) [[132](#), [133](#)]. Die Funktion der FUSE-Sequenz ist abhängig von ihren strukturellen Eigenschaften. So wird sie z.B. von dem Protein FBP (FUSE binding protein) nur erkannt und gebunden, wenn sie nicht in der normalen B-Konformation der DNA vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass die B-Konformation temporär durch die negative Torsionsspannung, die von Polymerasen stromaufwärts vom Promotor (upstream) aufgebaut wird, aufgelöst werden kann [[132](#), [147](#)]. Die FUSE-Sequenz und die mit ihr interagierenden Proteine sind von großem Interesse, auch in der Krebsforschung, da sie an der Expression von ~ 15% der Proteine in einer menschlichen Zelle beteiligt sind [[148](#)]. Mutationen dieser Sequenz konnten zudem in vielen

Krebszellen nachgewiesen werden [149, 150].

Auch die, unter Anderem von der Superhelizität beeinflusste, interne Dynamik der DNA (siehe Abschnitt 1.4), also die Bewegung einzelner größerer oder kleinerer DNA-Abschnitte, spielt in der Transkription eine Rolle. Sie ist z.B. von Bedeutung, wenn genomisch weit entfernte Stellen auf der DNA, wie z.B. eine Promotor- und eine „enhancer“-Sequenz eines Gens, in räumliche Nähe treten müssen, um die Transkription zu starten. So konnte etwa in einigen Simulationen und Experimenten gezeigt werden, dass die Aktivierungsraten des RNA-Polymerase-Holoenzym (komplexiert mit dem Protein σ -Faktor 54) in superhelikalen Plasmiden deutlich höher waren als in relaxierten Plasmiden [22–25]. Diese Beschleunigung wird vermutlich ausgelöst durch eine Kombination aus der Kompaktierung des superhelikalen Plasmids und durch die Torsionsspannungs-bedingte Beschleunigung der internen Bewegung (siehe Abschnitt 1.4) [9, 86].

Der Auf- und Abbau von Nukleosomen und damit auch die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA wird ebenfalls von Änderungen der Torsionsspannung, die vor und hinter der RNA-Polymerase entsteht, beeinflusst [144–146]. So konnte Anfang der 1990er Jahre gezeigt werden, dass es während der Transkription des Hitzeschock-Proteins HSP82 zu einer Spaltung von Nukleosomen kam [145]. Dies wurde mittels Gelelektrophorese indirekt über das Laufverhalten der Produkte eines DNaseI Verdau der DNA gezeigt. Teves und Henikoff zeigten in einer aktuellen Studie von 2014 [146] indirekt über die Genexpression in *Drosophila melanogaster* Zellen, dass die sich, durch die Abwesenheit von Topoisomerase I, ansammelnde Torsionsspannung zu erhöhten Transkriptionsraten führte. Aus der Interpretation der Daten schlussfolgerten die Autoren, dass die Nukleosomen vor der Polymerase durch die positive Torsionsspannung destabilisiert werden. Ein direkter Nachweis der Destabilisierung war mit dieser Methode allerdings nicht möglich [146].

Diese Beispiele zeigen, dass die Torsionsspannung der DNA für viele zelluläre Prozesse eine wichtige Rolle spielt. Um ihre Wirkung detaillierter zu verstehen wurden in dieser Arbeit zwei durch sie ausgelöste Effekte näher untersucht: Zum einen die interne Dynamik von DNA am Modellsystem frei diffundierender Plasmide mit unterschiedlichen Torsionsspannungen und zum anderen der strukturelle und (de-)stabilisierende Einfluss von Torsionsspannung auf Nukleosomen.

5.2. Torsionsspannung und interne DNA-Dynamik

Die ersten Messungen der Struktur und der Dynamik von in Lösung frei diffundierenden superhelikalen DNA-Plasmiden wurden, mittels Kleinwinkel-Neutronenstreuung (SANS) [10, 151],

Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) [152] und dynamischer Lichtstreuung (DLS) [9, 151, 153] durchgeführt. Hierbei konnten die translationalen Diffusionskoeffizienten in Lösung bestimmt werden und mit den bis dahin vorhandenen Daten aus Gel-Studien verglichen werden [91, 154]. Ebenso konnten aus diesen Arbeiten Rückschlüsse auf die Strukturen der Plasmide in Lösung gezogen werden [153] und mit Simulationsdaten [151] und elektronenmikroskopischen Aufnahmen [155] verglichen werden. Es zeigte sich, dass zur Beschreibung der DLS-Daten ein einzelner Diffusionskoeffizient (D_t) nicht ausreichte und eine zweite Komponente berücksichtigt werden musste. Diese Komponente wurde einer Mischung aus der Rotationsbewegung des anisotrop geformten Plasmids und der internen Dynamik, also der Bewegung von DNA-Segmenten innerhalb des Plasmids zugeschrieben. Ihr konnte zur Quantifizierung ein zweiter Diffusionskoeffizient (D_i) zugeordnet werden [9, 86]. Eine genauere Charakterisierung dieser internen Dynamik war nicht möglich, da bei DLS immer über die Bewegung aller DNA-Segmente innerhalb des Plasmids gemittelt wird. Mit vergleichbaren DLS-Messungen wurde auch der Einfluss der DNA-Länge [9], der Topologie [35], sowie Salzeffekte [156] auf die DNA-Dynamik untersucht.

Eine genauere Untersuchung der Segmentdynamik wurde erst durch den Einsatz von Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) möglich. Dazu ist das spezifische Anbringen einer einzelnen fluoreszenten Markierung in die Plasmid-DNA nötig. Hierdurch darf jedoch die Topologie der DNA nicht gestört werden. Dies ist, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, durch Triplex-bildende Oligonukleotide möglich (TFO), die spezifisch an eine einklonierte Bindesequenz im Plasmid ($pu \bullet py$: Purin/Pyrimidin Sequenz) binden und durch Psoralen kovalent verankert werden [157]. Diese Art der Plasmidmarkierung erlaubte es nun FCS-Messungen der Dynamik einzelner DNA-Segmente durchzuführen. Alle in dieser Arbeit dargestellten FCS-Messungen zur internen DNA-Dynamik basieren auf dieser Technik und einer Auswertungsmethode, die zuerst von Shusterman et al. [32, 158] beschrieben wurde. Dabei werden die FCS-Autokorrelationskurven in mittlere quadratische Verschiebungen (MSD) umgerechnet, die die Dynamik des markierten Segments auf verschiedenen Zeitskalen darstellen. Dies ermöglicht eine wesentlich bessere Auflösung der Bewegungen über viele Zeitskalen hinweg und einen direkten Vergleich mit theoretischen Modellen für das Segment (siehe Abschnitt 1.4). Bisher wurde mit der beschriebenen Methode hauptsächlich der Einfluss der Superhelixdichte auf ein Plasmid mit einer DNA-Krümmungssequenz untersucht [32], sowie die Monomerdynamik einzel- und doppelsträngiger linearisierter DNA [158].

Während dieser Dissertation wurden, als Fortführung der oben genannten Arbeiten, der Einfluss der Plasmid-Topologie (siehe Abschnitt 3.2) und der Ionenstärke des Mediums (siehe Abschnitt 3.3) auf die interne Dynamik vermessen. Des weiteren wurden zwei weitere biologisch

relevante Effekte untersucht, der Einfluss der Viskosität des Mediums (siehe Abschnitt 3.4) wie auch der Verpackung der DNA in Nukleosome (siehe Abschnitt 3.5).

Um den Einfluss der DNA-Topologie auf die interne Dynamik zu beobachten, wurden zwei Topoisomere eines Plasmids (pUC18-1A) verwendet: die relaxierte Form mit $\sigma = 0$ und die nativ negativ superhelikale Form $\sigma = -0,046$. Durch die Superhelizität wird das Plasmid kompaktiert. Dies zeigte sich auch in der Vergrößerung des gemessenen translationalen Diffusionskoeffizienten (D_2 , entspricht D_t in den DLS-Messungen) für das superhelikale Plasmid, der einem verkleinerten hydrodynamischen Radius (R_H) entspricht. Die gemessenen Werte stimmen dabei mit anderen Messungen [32, 35] und Brownian-Dynamics (BD) Simulationen [36] des gleichen Plasmids überein. Wie in den DLS-Messungen wurde auch in den FCS-Messungen die interne Dynamik als zweiter Diffusionskoeffizient (hier D_1) sichtbar, bzw. als anomale Beschleunigung des MSD auf kurzen Zeitskalen. Aus der MSD-Kurve konnte für diese kurzen Zeitskalen, wie in [32], ein Anomalieparameter α extrahiert werden, dessen Wert von $\alpha = 0,76$ mit erwarteten Wert für ein semiflexibles Polymer ($\alpha = 0,75$) [159, 160] und mit den BD-Simulationen [36] übereinstimmt. Allerdings zeigt sich in den Messungen hier eine Aufspaltung der internen Dynamik zwischen $\sigma = 0$ und $\sigma = -0,046$, was so in den Simulationen von Wocjan et al. [36] nicht beobachtet wurde. Diese Aufspaltung entspricht nach Korrektur der globalen Bewegung einer Vergrößerung der Bewegungsamplitude durch die Relaxierung des Plasmids (siehe Abbildung 3.5). Dies trat so auch in den DLS-Messungen auf [9, 35, 153] und kann, wie in diesen Veröffentlichungen erklärt werden durch die Einschränkung der Beweglichkeit einzelner Segmente durch die, mit der Superhelizität einhergehende, Ausrichtung der DNA-Stränge zueinander. Im Vergleich zu den von Shusterman et al. [32] veröffentlichten FCS-Daten zeigt sich, dass die hier gemessenen Werte für die Bewegungsamplitude insgesamt kleiner sind und sich deutlich weniger aufspalten, als bei deren Messungen. Die dort verwendeten Plasmide wiesen allerdings auch eine intrinsische Krümmung auf und sind mit den hier gezeigten Daten daher nicht exakt vergleichbar, da bekannt ist, dass Krümmungen zu einer signifikanten Änderung der internen Dynamik durch die Kopplung verschiedener Bewegungsmodi führen können [19, 33].

Der Einfluss der Ionenstärke auf die DNA-Dynamik wurde mit negativ superhelikalen Plasmiden mit $\sigma = -0,046$ untersucht. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration der Lösung kam es zu einem leichten Anstieg des translationalen Diffusionskoeffizienten D_2 bis 100 mM NaCl. Darüber wurde keine weitere Änderung beobachtet. In den DLS-Messungen zum Salzeinfluss auf superhelikale Plasmide [87] wurde keine signifikante Änderung des translationalen Diffusionskoeffizienten für Salzkonzentrationen zwischen 10 mM und 1 M beobachtet. Dort wurde allerdings keine Messung bei 0 mM NaCl durchgeführt. Auch das verwendete Plasmid war hier kleiner (1868 bp statt 2700 bp). Der Diffusionskoeffizient für die interne Dynamik (D_1)

steigt mit steigender Salzkonzentration an. Es kommt also zu einer Beschleunigung der internen Bewegungen. Dies ist vergleichbar mit DLS-Messungen für das Plasmid pUC8 [156]. Ebenso steigt die Amplitude der internen Bewegung. Beides stimmt überein mit den erwähnten DLS-Messungen sowie den Simulationen in [87]. Wie sich in Experimenten mit Kleinwinkelstreuung und Simulationen [10] zeigte, werden durch die Erhöhung der Salzkonzentrationen die ionischen Abstoßungskräfte innerhalb des Phosphatrückgrats geschwächt. Daher vergrößert sich die Flexibilität der DNA und ihre Persistenzlänge verringert sich [161–163]. Dieser Effekt macht sich in einer verstärkten Beweglichkeit der DNA auf kleineren Zeitskalen bemerkbar. Auch verschiebt sich der Anomaliekoeffizient α von 0,78 bei 0 mM NaCl zu $\alpha = 0,65$ bei 1 M NaCl, was eher mit dem, nicht von der Persistenzlänge dominierten, Zimm-Modell als mit dem Modell eines semiflexiblen Polymers vereinbar ist.

Insgesamt zeigt sich, dass die Daten der FCS-Messungen mit einer einzelnen Fluoreszenzmarkierung sehr gut mit den vorangegangenen Studien mit DLS und Kleinwinkelstreuung, sowie diversen Simulationen übereinstimmen. Außerdem bestätigt dies, dass das gewählte Verfahren MSDs aus FCS-Daten zu extrahieren in Verbindung mit der Markierung einzelner Segmente detaillierte und verlässliche Daten über die interne DNA-Dynamik liefert.

Um die Bewegung von DNA-Plasmiden in komplexen Umgebungen zu studieren, wurden für diese Dissertation erste Testmessungen von superhelikalen DNA-Plasmiden in verschiedenen hochkonzentrierten Lösungen eines hoch-verzweigten Polysaccharids (Ficoll400), mit entsprechend erhöhter Viskosität, durchgeführt. Aus diesen Messungen ergab sich zunächst ein wie erwartet stark absinkender translationaler Diffusionskoeffizient D_2 mit ansteigender Viskosität des Mediums. Die interne Dynamik blieb dagegen im vermessenen Ficoll400-Konzentrationsbereich in ihrer Amplitude innerhalb der Fehler unbeeinflusst (siehe Abbildung 3.17). Allerdings verschob sich durch die langsamere translationale Diffusion der Übergangzeitpunkt zwischen den Regimen der internen und globalen Dynamik deutlich hin zu größeren Zeiten. Eine Viskositätssteigerung durch Ficoll400 wirkt sich also nicht unbedingt auf die interne Dynamik aus, macht sie aber über einen größeren Zeitraum sichtbar. Ficoll400 könnte daher in zukünftigen Messungen dieser Art genutzt werden, um die Regime voneinander zu trennen und dadurch Einflüsse auf die interne Dynamik noch besser aufzulösen.

Bei den Ficoll400- und Salzreihen ergab sich noch ein interessantes Nebenergebnis: Für diese Messungen wurde zunächst das FCS-Fokusvolumen bei jeder gemessenen Ficoll400-/NaCl-Konzentration bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.4.2). Interessanterweise nahm dabei das Fokusvolumen mit steigender Ficoll400-/NaCl-Konzentration ab, bei Ficoll400 deutlich stärker als bei NaCl. Dies lässt sich wohl, wie in [164] vorgeschlagen, auf eine Änderung des Brechungsindex zurückführen.

Abschließend wurde die Dynamik von superhelikalen Plasmiden untersucht, auf denen unterschiedliche viele Nukleosomen rekonstituiert wurden. Neben den FCS-Messungen wurden die Plasmide auch mittels SFM abgebildet, um ihre Struktur zu beobachten. Bei einer Massenproportion von 0,8 ist der größte Teil der Plasmid-DNA in Nukleosomen verpackt (in $\sim 5 - 8$ Nukleosomen pro Plasmid). Die Plasmide sind nun nicht mehr länglich und plektonemisch sondern eher kugelförmig und deutlich kleiner. Dies erklärt den in den Messungen mit der Nukleosomenzahl steigenden translationalen Diffusionskoeffizient D_2 . In den Messungen verschob sich mit steigender Massenproportion auch der Übergang zwischen interner und globaler Dynamik hin zu kürzeren Zeiten. Dies deutet darauf hin, dass sich die DNA-Segmente, durch die Verpackung eines Teils der Plasmid-DNA in Nukleosomen weniger weit bewegen können. Erstaunlicherweise scheint die stufenweise Verpackung der DNA auf sehr kurzen Zeitskalen zu einer Beschleunigung der Dynamik zu führen (siehe Abbildung 3.22). Da dies die ersten Messungen ihrer Art sind, gibt es bislang weder theoretische Vergleichsdaten noch vergleichbare Messdaten. Brownian dynamics Simulationen der Segmentdynamik mit Nukleosomen könnten hier weiteren Aufschluss geben. Dazu könnte z.B. die Software aus Referenz [165] auf Nukleosomen erweitert werden, wie in [166] für Pulling-Experimente durchgeführt.

5.3. Torsionsspannung und Nukleosomen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der Superhelizität auf die Struktur und Stabilität von Nukleosomen untersucht. Eine mögliche Technik um direkte Einflüsse auf die Nukleosomenstabilität zu untersuchen ist die Destabilisierung der Nukleosomen-Komplexe durch Erhöhung der Ionenstärke der Lösung mit monovalenten Natriumionen. Hierdurch werden die ionischen Bindungen zwischen Histonen und der DNA geschwächt, bis sich die Komplexe bei hohen Salzkonzentrationen voneinander lösen. Unterschiede in der Stabilität der Nukleosome lassen sich dann durch die unterschiedlich hohen Salzkonzentrationen auslesen, bei denen der Komplex zerfällt. Diese Technik wird auch Salz-induzierte Destabilisierung genannt. Um den Zustand der Komplexe zu detektieren, werden häufig Fluoreszenz-spektroskopische Techniken verwendet [139, 167, 168]. Die fluoreszente Markierung verschiedener Bestandteile des Oktamerkomplexes und der DNA, erlaubten es z.B. mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) Veränderungen der Abstände zwischen Fluorophorpaaren zu messen [167]. FRET-Fluorophorpaare können dabei z.B. so gesetzt werden, dass sich das Ablösen des äußeren Histondimers mit dem Ablösen des inneren Histontetramers vergleichen lässt [139]. Fluorophorpaare zwischen DNA und Histon erlauben es detailliertere Informationen über die Öffnung des Nukleosoms und auch über Zwischenstrukturen der Destabilisierung zu sammeln. In einigen dieser Arbeit vorausgehen-

den Studien [139, 168] konnte mit dieser Methode in Einzelmolekülmessungen gezeigt werden, dass sich bei der Destabilisierung des Nukleosoms zunächst die äußeren Dimere (H2A-H2B) von dem Kern lösen und in einen offenen Zustand („butterfly-state“) übergehen. Erst nach einer weiteren Erhöhung der Salkonzentration lösten sich die Dimere schließlich vollständig vom DNA-Strang. Ebenfalls konnten mit diesem Verfahren Unterschiede zwischen Histonvarianten des Histons H2A aufgezeigt (konkret zur Histonvariante H2A-Z) [139, 169–171] und der Einfluss der Histonacetylierung untersucht werden [172].

Die meisten dieser Einzelmolekül-Messungen, die sich mit strukturellen Änderungen oder der Stabilität von Nukleosomen beschäftigen, werden mit vereinzelt Nukleosomen ausgeführt, die aus einem Histonoktamer bestehen um das ein kurzer DNA-Strang (~ 170 bp) gebunden wird. Diese Messungen sind daher darauf beschränkt Änderungen am DNA-Protein-Komplex zu untersuchen. Der Einfluss von strukturelle Änderungen der DNA, durch den Aufbau oder Abbau von Torsionsspannung, können hier nicht berücksichtigt werden. Da die DNA durch ihre Struktur und ihre Bewegungen aber an der Stabilität der Nukleosomen einen wichtigen Anteil hat, ist es wichtig das zu untersuchende System um diesen Aspekt zu erweitern.

Ein Ansatz, der die Vermessung der Stabilität von Nukleosomen in Abhängigkeit der Torsion der DNA ermöglicht, ist die Kraftspektroskopie in optischen Fallen. Während dieser Arbeit wurde dazu eine Studie veröffentlicht [82]. Dort wurde ein mit Histonoktameren komplexierter DNA-Strang zwischen einer Glasoberfläche und einem nanoskopischen Glaszylinder in einer optische Falle festgehalten. Um Torsionsspannung auf der DNA zu erzeugen wurde der Glasmikrozylinder mittels einer helikalen optischen Falle gedreht [173, 174]. Die Drehung wurde dabei auf den DNA-Strang übertragen. Durch ein anschließendes Ziehen an der DNA mit der optischen Falle, konnte ein zweistufiger Kraftabfall bei ansteigender Dehnung beobachtet werden. Dieser wurde als Loslöseprozess der Nukleosomen interpretiert. Ein solcher zweistufiger Prozess konnte bereits in Simulationen und anderen Zugkraftexperimenten gezeigt werden [136, 137]. Der erste Kraftabfall trat bei niedriger Dehnung auf und wurde interpretiert als das Loslösen der DNA, die um das äußere Dimer (H2B, H2A) herumgewunden ist. Der zweite Kraftabfall, der bei größerer Dehnung auftrat, wurde interpretiert als das Loslösen der DNA, die um das innere Tetramer gewunden vorliegt (H3,H4). In der zitierten Studie [82] wurde sowohl positive als auch negative Torsionsspannung auf den DNA-Strängen erzeugt. Im Vergleich zu negativer Torsionsspannung, wurde der erste Kraftabfall bei positiver Torsionsspannung bei geringeren Dehnungen beobachtet. Dies wurde als Destabilisierung der Nukleosomen durch positive Torsionsspannung, im Vergleich zu negativer Torsionsspannung interpretiert. Der Nachteil dieser indirekten Methode zur Untersuchung der Destabilisierung der Nukleosomen durch Torsion ist, dass nicht direkt beobachtet werden kann welche strukturellen Änderungen an Nukleosomen auftreten und ob

sich Histonbestandteile komplett lösen. Solche Aussagen können nur indirekt durch Vergleiche mit Simulationen gewonnen werden.

In dieser Arbeit wurde ein Weg zur Untersuchung der Nukleosomen-Stabilität in Abhängigkeit der DNA-Superhelikalität gewählt, der direkte Beobachtungen einzelner Nukleosomen und ihrer Bestandteile zulässt. Zunächst wurde der Einfluss der DNA-Torsionsspannung auf die Struktur von Nukleosomen mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie (SFM) als bildgebender Methode untersucht. Mittels SFM konnte in anderen Studien bereits gezeigt werden, dass es z.B. während der Remodellierung von Nukleosomen durch den humanen Swi-Snf (Switch/Sucrose NonFermentable) Remodellierungsfaktor, zum Verlust der äußeren Histone kam (H2A-H2B) [175]. Dabei wurde die Höhe der Nukleosomen vor und nach der Remodellierung verglichen. Ebenso wurde die DNA-Schleifenbildung an Nukleosomen untersucht, die auf negativ superhelikalen Plasmiden rekonstituiert waren [176]. Diese Betrachtung der direkten strukturellen Unterschiede von einzelnen Nukleosomen auf DNA unterschiedlicher Torsionsspannung wurde, in der in dieser Arbeit (und in den Voruntersuchungen meiner Diplomarbeit [138]) vorgestellten Form meines Wissens bis jetzt noch nicht durchgeführt.

Die lokale Nukleosomenstruktur wurde mittels SFM-Bildgebung von 2.7 kB langen pUC18 Plasmiden mit unterschiedlichen superhelikalen Dichten untersucht, die ein oder zwei Nukleosomen pro Plasmid trugen. Der Winkel zwischen den beiden flankierenden DNA Abschnitten (der nukleosomale Öffnungswinkel, siehe Abschnitt 4.22.9) wurde als Maß für den Einfluss der DNA-Superhelikalität auf die Nukleosomenstruktur herangezogen. Mit abnehmender negativer Torsionsspannung kam es zu größeren Öffnungswinkeln und somit zu einer Öffnung der Nukleosomenstruktur. Die größten Öffnungswinkel traten bei Superhelixdichten von $\sigma = 0$ und $\sigma = +0.03$ auf. In Bezug auf die Verteilung und Größe der Öffnungswinkel bei relaxierter und positiv superhelikaler DNA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Topologien festgestellt werden. Die kleinsten Öffnungswinkel waren bei $\sigma = -0.046$ zu finden und die Öffnungswinkel, die für $\sigma = -0.02$ gemessen wurden lagen im Mittel zwischen denjenigen für $\sigma = -0.046$ und $\sigma \geq 0$. Die gemessenen Öffnungswinkel sind allerdings kein direktes Maß für die Nukleosomen-Stabilität. Dennoch lässt sich vermuten, dass ein größerer Öffnungswinkel bedeutet, dass die DNA an weniger Bindestellen, also auch weniger stark, an den Nukleosomenkomplex gebunden vorliegt.

Die beobachtete Öffnung des Nukleosoms mit abnehmender Torsionsspannung, führte zu der Frage in welcher Art die Stabilität der Nukleosomen dadurch beeinflusst wird. Diese Frage wurde durch Salz-induzierte Destabilisierung der Nukleosomen untersucht, die durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) gemessen wurde (siehe Abschnitt 4.3). Die Nukleosomen waren entweder am äußeren Dimer (H2B) oder am inneren Tetramer (H4) fluoreszent markiert. Die-

se Form der Markierung erlaubte es den Zerfall der Nukleosomen direkt zu untersuchen. In den FCS-Messungen lassen sich hierbei zwei Fraktionen detektieren und quantifizieren: die schnell diffundierenden freien Histon-Proteine und die durch Bindung mit den deutlich größeren Plasmiden verlangsamt, mehr oder weniger intakten Nukleosomen. Diese Technik hat gegenüber den bereits erläuterten kraftspektroskopischen Verfahren [82, 177] Vorteile: Da das DNA-Molekül nicht an Oberflächen gebunden ist, sondern frei in Lösung diffundiert, sind die Messungen näher an physiologischen Bedingungen. Vor Allem lässt es aber die Markierung einzelner Histonproteine zu, um die strukturellen Änderungen an Nukleosomen direkt zu beobachten, vergleichbar mit den früheren Studien an Nukleosomen auf kurzen DNA-Strängen [139, 167, 168].

In dieser Arbeit konnte ein Abfall der Nukleosomenstabilität mit sinkender negativer Torsionsspannung beobachtet werden. Der größte destabilisierende Effekt wurde bei positiv superhelikaler DNA gefunden. Hier wuchs, im Vergleich zu den anderen Plasmid-Topologien, die schnell diffundierende Fraktion der abgelösten H2A-Histone schon bei geringeren Salzkonzentrationen an. Auch die vollständige Ablösung aller H2A-Histone wurde bei einer niedrigeren Salzkonzentration erreicht. Der hier nachgewiesene Effekt ist signifikant aber recht klein. Eine ähnlich kleine Verschiebung der Dimer-Ablösung wurde auch in der Studie von [Sheinin et al.](#) beobachtet [82]. Bei der Ablösung des inneren Tetramers (H4-Markierung) konnte kein signifikanter Einfluss der DNA-Torsionsspannung auf die Ablösung festgestellt werden, was sich wiederum ähnlich für den zweiten Kraftabfall in den Experimenten von [Sheinin et al.](#) ergab. Die Salzkonzentration bei denen sich die äußeren Dimere und das innere Tetramer von Nukleosomen lösen, stimmen auch ungefähr mit entsprechenden Salzkonzentrationen beim Zerfall eines Nukleosoms auf einem kurzen DNA-Strang überein, die von [Böhm et al.](#) gefunden wurden [139].

Die Messungen und Ergebnisse zur Nukleosomenstabilität in Abhängigkeit der Torsionsspannung wurden auch in folgender Publikation zusammengefasst und veröffentlicht [141]:

Tabea Elbel und Jörg Langowski. The effect of dna supercoiling on nucleosome structure and stability. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(6):064105, 2015

Die Torsions-assozierte Destabilisierung der Bindungen zwischen dem H2A/H2B Dimer und dem H4 Tetramer könnte unterschiedliche Konsequenzen für in-vivo Systeme haben. Wie in [82, 178] spekuliert, könnte sie den Enzym-vermittelten Histon-Dimer-Austausch unterstützen. In diesem schnell ablaufenden Prozess wird H2A gegen seine Variante H2A-Z ausgetauscht, von der man weiß, dass sie regulatorische Aufgaben bei der Transkription übernimmt [178]. Es wurde ebenfalls spekuliert, dass Torsion direkt zum Verlust von Dimeren führen kann [82]. Die Stabilität des inneren Tetramers welche in diesen und den vorangegangenen Messungen (z.B. [82, 139]), beobachtet wurde, könnte den *in vivo* beobachteten eher langsamen H3/H4-Histon Austausches erklären [179].

Um den Einfluss der Torsionsspannung auf die Destabilisierung noch detaillierter zu untersuchen, können Einzelmolekül-FRET Messungen an ähnlichen Plasmid-Histon Konstrukten durchgeführt werden. Dies würde es erlauben, Distanzen zwischen unterschiedlich markierten Histonen im gleichen Histonkern in Abhängigkeit der Torsionsspannung zu vermessen. Hier wäre es in einem ersten Schritt sinnvoll, Histonoktamere zu verwenden, die ein FRET-Fluorophorpaar zwischen H2A und H4 tragen. Auf diese Art und Weise könnten auch intermediäre Strukturen, wie z.B. der oben beschriebene “butterfly-state”, welcher als Zwischenstufe für den Zerfall der Nukleosomen auf kurzen DNA-Stücken vorgeschlagen wurde [139], detektiert werden und dessen physiologische Relevanz so überprüft werden. Des weiteren ließen sich auch Untersuchungen an Histonvarianten um den Aspekt der Torsionsspannung erweitern.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A Adenin

AFM Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*)

ATP Adenosintriphosphat

bp Basenpaare

BD Brownian Dynamics

C Cytosin

DLS Dynamische Lichtstreuung

DNA Desoxy-Ribonukleinsäure

dsDNA doppel-strängige Desoxy-Ribonukleinsäure

DMSO Dimethylsulfoxid

DNase Desoxyribonuklease

DTT 1,4-Dithiothreitol

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

E.coli *Escherichia coli*

FCS Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

g Gramm

G Guanin

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethanosulfonsäure

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*)

FPLC schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (*fast protein liquid chromatography*)

Kb Kilobasen

kD Kilodalton

LK linking number

M molar (g/mol)

mg Milligramm

min Minuten

μg Mikrogramm

ms Millisekunden

nm Nanometer

NtrC *nitrogen regulator protein C*

pH = $-\log_{10} [\text{H}^+]$, negativer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration

pmol Picomol

pu Purin

py Pyrimidin

RNAP RNA-Polymerase

s Sekunde(n)

SANS Neutronen-Kleinwinkelstreuung (*small-angle neutron scattering*)

sc superhelikal (*supercoiled*)

SFM Rasterkraftmikroskopie (*scanning force microscopy*)

T Thymin

TFO Triplexbildende Oligonukleotide (*triplex forming oligonucleotides*)

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tw Twist

U Enzymeinheit (*unit*)

UV Ultraviolett

W Watt

Wr Writhe

„**x**“ Kennzeichnung für Hoogsten-Basenpaarung

„**•**“ Kennzeichnung für Watson-Crick-Basenpaarung

Abbildungsverzeichnis

1.1. DNA-Struktur:	4
1.2. Überblick über die Helixformen der DNA.	5
1.3. Entstehung von Superhelikalität.	7
1.4. Kompaktierung von Plasmiden durch die Ausbildung von Superhelixwindungen.	9
1.5. BD-Simulation eines 3.000 bp großen negativ superhelikalen Plasmid.	10
1.6. Mittlere quadratische Verschiebung eines diffundierenden Teilchen.	12
1.7. DNA-Dynamik betrachtet auf unterschiedlichen Zeitskalen.	13
1.8. Theoretische Modelle für die Berechnung der Polymerdynamik von DNA.	14
1.9. Struktur und Organisation eines Nukleosoms.	17
1.10. Perlenketten-Struktur der Nukleosomen und Chromatin-Modelle der 30 nm-Faser	19
1.11. Kompaktierungsstufen der DNA in Chromatin.	20
1.12. Zwillings-Helix-Modell: Änderungen der DNA-Torsionsspannung während der Transkription.	22
2.1. Plasmid pUC18-1A-H1/H2:	29
2.2. Unterscheidung der Plasmid-Torsionsspannung im Agarosegel	35
2.3. TFO-Aufbau	37
2.4. UV-Crosslinker für die TFO-Bindung an die DNA.	38
2.5. Laserscan eines Agarosegels der Plasmide nach der Fluoreszenzmarkierung mit TFO4.	39
2.6. Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops.	43
2.7. Objektauflösung in der Rasterkraft-Mikroskopie.	44
2.8. Glimmer als Probenoberfläche in der Rasterkraft-Mikroskoie	45
2.9. Polylysinbeschichtung und SFM-Topographie	47
2.10. Vermessung der Nukleosomen.	48
2.11. Illustration der Messung des Öffnungswinkels von Nukleosomen	49
2.12. Jablonski Diagramm	51
2.13. Spektrum der Alexa-Fluorophore	53

2.14. Umwandlung von Fluoreszenz-Fluktuationen in Autokorrelationsdaten.	54
2.15. Das Fokusvolumen und seine Gauß-förmige Ausleuchtung.	56
2.16. Auswertung der MSD-Daten.	59
2.17. Messartefakte in FCS-Autokorrelationskurven.	60
2.18. Schematische Zeichnung des Aufbaus eines konfokalen Mikroskops, wie es für FCS-Messungen verwendet wird.	61
2.19. Aufbau und Bindung der PNA-Sequenzen.	62
2.20. PNA-Bindungsstudie im Gel.	64
2.21. PNA-Bindungsstudie mit FCS.	65
2.22. Strukturformeln der DNA- und PNA-Struktur.	65
3.1. FCS-Autokorrelationskurven für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau).	71
3.2. Beispiele für Rasterkrafttopographien von den verwendeten pUC18 Plasmiden mit Torsionsspannungen von (a) $\sigma = -0.046$ und (b) $\sigma = 0$	72
3.3. Ergebnisse der FCS Fits der Autokorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau).	73
3.4. Ergebnisse der MSD Transformation der Autocorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (grün) und $\sigma = 0$ (blau)	74
3.5. Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik durch zwei mathe- matische Methoden:	75
3.6. Auswertung der MSD-Kurven von Plasmiden mit unterschiedlichen Torsionss- pannungen	77
3.7. Vergleich der gemessenen MSDs mit Brownian Dynamics Simulationen des gleichen Plasmids.	78
3.8. Ergebnisse der FCS-Messungen von Alexa488 in Lösung mit steigender NaCl Konzentration zur Eichung des FCS-Fokusvolumen.	80
3.9. FCS-Messungen von Plasmiden (mit $\sigma = -0,046$) bei verschiedenen Salzkon- zentrationen	81
3.10. Ergebnisse der FCS Fits an die Autokorrelationsdaten für Plasmide mit $\sigma =$ -0.046 bei steigender Salzkonzentration	82
3.11. Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik durch zwei mathe- matische Methoden	85
3.12. Auswertung der MSD-Kurven von Plasmiden mit $\sigma = -0,046$ bei verschiedenen Salzkonzentrationen.	86

3.13. Ergebnisse der FCS-Messungen von Alexa488 in Lösung mit steigender Ficoll400 Konzentration zur Eichung der Plasmiddaten.	88
3.14. Ergebnisse der FCS-Fits von Alexa488 bei steigender Ficoll400 Konzentration zur Eichung der Plasmidmessungen.	89
3.15. Ergebnisse der Autokorrelationsdaten für superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$ bei steigender Ficoll400 Konzentration.	91
3.16. Ergebnisse der Analyse der FCS-Kurven durch 2-Komponenten Fits für superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$	92
3.17. Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik durch zwei mathematische Methoden	93
3.18. Ermittlung der Übergangszeiten zwischen interner und globaler Dynamik aus der MSD-Analyse der Autokorrelationsdaten für superhelikale Plasmide mit $\sigma = -0.046$ (Ficoll400).	95
3.19. Ergebnisse der Messungen zur internen Dynamik von Plasmiden mit einer Torsionsspannungen von $\sigma = -0.046$ und auf ihnen rekonstituierten Nukleosomen.	98
3.20. Fitergebnisse der Autokorrelationsdaten der Plasmide ($\sigma = -0.046$) mit steigender Nukleosomenzahl	99
3.21. Ergebnisse der Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik der MSD Daten von Nukleosomen auf Plasmiden (Teil 1)	100
3.22. Ergebnisse der Trennung der globalen Dynamik von der internen Dynamik der MSD Daten von Nukleosomen auf Plasmiden (Teil 2)	102
3.23. Fitergebnisse der MSD Daten von Plasmiden mit steigenden Nukleosomenzahlen	104
4.1. Ergebnisse der SFM-Topographieanalyse für die Öffnungswinkelgröße α . . .	108
4.2. Ergebnisse der SFM Topographieanalyse für die Öffnungswinkelgröße α . . .	109
4.3. Beispiele der Salz- induzierten Destabilisierung von H2B auf einem superhelikalen Plasmid mit $\sigma = -0.02$	110
4.4. Ergebnisse der Salz-induzierten Destabilisierung von H2B markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$: Gezeigt werden Beispiele für den Anteil intakter Nukleosomen für alle σ , bei verschiedenen Salzkonzentrationen: (a) $[\text{NaCl}] = 200 \text{ mM}$, (b) $[\text{NaCl}] = 500 \text{ mM}$, (c) $[\text{NaCl}] = 700 \text{ mM}$, (d) $[\text{NaCl}] = 800 \text{ mM}$	113
4.5. Ergebnisse der Salz-induzierten Destabilisierung von H2B markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$: Gezeigt werden die normalisierter Anteile intakter Nukleosomen für H2B markierte Nukleosomen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.	114

4.6. Ergebnisse für die Salz-induzierte Destabilisierung von H4 markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$	115
4.7. Ergebnisse für die Salz-induzierte Destabilisierung von H4 markierten Nukleosomen auf Plasmiden mit $\sigma = -0.046, -0.02, 0, 0.031$	116

Tabellenverzeichnis

2.1. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der Histonproteine (<i>X. laevis</i>). . .	41
2.2. Spektroskopische Eigenschaften von Alexa-Fluorophoren.	53

Literaturverzeichnis

- [1] Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D Watson, und AV Grimstone. Molecular biology of the cell (3rd edn). *Trends in Biochemical Sciences*, 20(5):210–210, 1995.
- [2] Jeannine H Riazance, Walter A Baase, W Curtis Johnson, Kathleen Hall, Phillip Cruz, und Ignacio Tinoco. Evidence for z-form rna by vacuum uv circular dichroism. *Nucleic acids research*, 13(13):4983–4989, 1985.
- [3] Pawel Drozdal, Mirosław Gilski, Ryszard Kierzek, Lechosław Lomozik, und Mariusz Jaskolski. High-resolution crystal structure of z-dna in complex with cr^{3+} cations. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20(3):595–602, 2015.
- [4] M Gellert, K Mizuuchi, MH O’dea, H Ohmori, und J Tomizawa. Dna gyrase and dna supercoiling. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 43, pages 35–40. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1979.
- [5] David S Horowitz und James C Wang. Torsional rigidity of dna and length dependence of the free energy of dna supercoiling. *Journal of molecular biology*, 173(1):75–91, 1984.
- [6] Marc Adrian, Beatrice ten Heggeler-Bordier, Walter Wahli, Alicja Z Stasiak, Andrzej Stasiak, und Jacques Dubochet. Direct visualization of supercoiled dna molecules in solution. *The EMBO journal*, 9(13):4551, 1990.
- [7] Jan Bednar, Patrick Furrer, Andrzej Stasiak, Jacques Dubochet, Edward H Egelman, und Andrew D Bates. The twist, writhe and overall shape of supercoiled dna change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix: possible implications for dna structure in vivo. *Journal of molecular biology*, 235(3):825–847, 1994.
- [8] T Christian Boles, James H White, und Nicholas R Cozzarelli. Structure of plectonemically supercoiled dna. *Journal of molecular biology*, 213(4):931–951, 1990.

- [9] Jörg Langowski und Ursula Giesen. Configurational and dynamic properties of different length superhelical dnas measured by dynamic light scattering. *Biophysical chemistry*, 34 (1):9–18, 1989.
- [10] Markus Hammermann, Nathalie Brun, Konstantin V Klenin, Roland May, Katalin Tóth, und Jörg Langowski. Salt-dependent dna superhelix diameter studied by small angle neutron scattering measurements and monte carlo simulations. *Biophysical journal*, 75(6): 3057–3063, 1998.
- [11] C.H. Laundon und J.D. Griffith. Curved helix segments can uniquely orient the topology of supertwisted dna. *Cell*, 52:545–549, 1988.
- [12] T.C. Boles, J.H. White, und N.R. Cozzarelli. Struture of plectonemically supercoiled dna. *J. Mol. Biol.*, 213:931–951, 1990.
- [13] Karsten Rippe, Norbert Mücke, und Jörg Langowski. Superhelix dimensions of a 1868 base pair plasmid determined by scanning force microscopy in air and in aqueous solution. *Nucleic acids research*, 25(9):1736–1744, 1997.
- [14] Yuri L Lyubchenko und Luda S Shlyakhtenko. Visualization of supercoiled dna with atomic force microscopy in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2): 496–501, 1997.
- [15] A.V. Vologodskii, S.D. Levene, K.V. Klenin, M.D. Frank-Kamenetskii, und N.R. Cozzarelli. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled dna. *J. Mol. Biol.*, 227:1224–1243, 1992.
- [16] Jing Huang, Tamar Schlick, und Alexander Vologodskii. Dynamics of site juxtaposition in supercoiled dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3):968–973, 2001.
- [17] K.V. Klenin, M.D. Frank-Kamenetskii, und J. Langowski. Modulation of intramolecular interactions in superhelical dna by curved sequences: A monte carlo simulation study. *Biophys. J.*, 68:81–88, 1995.
- [18] G. Wedemann, G. Münckel Schöppe, und J. Langowski. Kinetics of structural changes in superhelical dna. *Phys. Rev. E*, 58:3537–3546, 1998.
- [19] G. Chirico und J. Langowski. Brownian dynamics simulations of supercoiled dna with bend sequences. *Biophys. J.*, 71:955–971, 1996.

- [20] H. Jian, T. Schlick, und A. Vologodskii. Internal motion of supercoiled dna: Brownian dynamics simulations of site juxtaposition. *J. Mol. Biol.*, 284:287–296, 1998.
- [21] K.V. Klenin und J. Langowski. Diffusion-controlled intrachain reactions of supercoiled dna: Brownian dynamics simulations. *Biophys. J.*, 80:69–74, 2001.
- [22] Eduardo Santero, Timothy R Hoover, Anne K North, David K Berger, Susan C Porter, und Sydney Kustu. Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ 54-dependent nifh promoter. *Journal of molecular biology*, 227(3):602–620, 1992.
- [23] Alexandra Schulz, Joërg Langowski, und Karsten Rippe. The effect of the dna conformation on the rate of ntrc activated transcription of escherichia coli rna polymerase $\cdot \sigma$ 54 holoenzyme. *Journal of molecular biology*, 300(4):709–725, 2000.
- [24] Alexandra Schulz, Norbert Mücke, Jörg Langowski, und Karsten Rippe. Scanning force microscopy of escherichia coli rna polymerase $\cdot \sigma$ 54 holoenzyme complexes with dna in buffer and in air. *Journal of molecular biology*, 283(4):821–836, 1998.
- [25] Sabine K Vogel, Alexandra Schulz, und Karsten Rippe. Binding affinity of escherichia coli rna polymerase $\cdot \sigma$ 54 holoenzyme for the glap2, nifh and nifl promoters. *Nucleic acids research*, 30(18):4094–4101, 2002.
- [26] Robert Brown. A brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *The Philosophical Magazine and Annals of Philosophy*, 4(21):161–173, 1828.
- [27] A. Einstein. über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8):549–560, 1905. doi:[10.1002/andp.19053220806](https://doi.org/10.1002/andp.19053220806).
- [28] Helmut Schiessel. *Biophysics for beginners: a journey through the cell nucleus*. CRC Press, 2013.
- [29] Masao Doi und Howard See. *Introduction to polymer physics*. Clarendon Press Oxford, 1996.
- [30] Klaus Kroy und Erwin Frey. Dynamic scattering from solutions of semiflexible polymers. *Physical Review E*, 55(3):3092–3101, 1997. doi:[10.1103/PhysRevE.55.3092](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.55.3092).

- [31] Ludger Harnau, Roland G. Winkler, und Peter Reineker. Dynamic structure factor of semiflexible macromolecules in dilute solution. *The Journal of Chemical Physics*, 104 (16):6355, 1996. doi:[10.1063/1.471297](https://doi.org/10.1063/1.471297).
- [32] R. Shusterman, T. Gavrinov, und O. Krichevsky. Internal dynamics of superhelical dna. *Phys. Rev. Lett.*, 100:098102, 2008.
- [33] W. Kremer, K. Klenin, S. Diekmann, und J. Langowski. Dna curvature influences the internal motions of supercoiled dna. *EMBO J.*, 12:4407–4412, 1993.
- [34] K. Klenin, M. Hammermann, und J. Langowski. Modeling dynamic light scattering of supercoiled dna. *Macromolecules*, 33:1459–1466, 2000.
- [35] J. Langowski, U. Kapp, K. Klenin, und A. Vologodskii. Solution structure and dynamics of dna topoisomers: Dynamic light scattering studies and monte carlo simulations. *Biopolymers*, 34:639–646, 1994.
- [36] T. Wocjan, J. Krieger, O. Krichevsky, und J. Langowski. Dynamics of a fluorophore attached to superhelical dna: Fcs experiments simulated by brownian dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11(45):10671–10681, 2009. doi:[10.1039/B911857H](https://doi.org/10.1039/B911857H).
- [37] Karolin Luger, Armin W Mäder, Robin K Richmond, David F Sargent, und Timothy J Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–260, 1997.
- [38] Jan Wolfgang Krieger. *Mapping Diffusion Properties in Living Cells*. PhD thesis, Universität Heidelberg, Heidelberg, 2015. URL <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/17187>.
- [39] Richmon TJ und Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *nature*, 423 (6936):145–50, 2003.
- [40] Germond JE, Hirt BE, Oudet P, Gross-Bellark M, und Chambon P. Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *PNAS*, 72(5):1843–7, 1975.
- [41] Thomas Jenuwein und C David Allis. Translating the histone code. *Science*, 293(5532): 1074–1080, 2001.
- [42] Brian D Strahl und C David Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765):41–45, 2000.

- [43] Judd C Rice und C David Allis. Gene regulation: Code of silence. *Nature*, 414(6861): 258–261, 2001.
- [44] Yanming Wang, Wolfgang Fischle, Wang Cheung, Steven Jacobs, Sepideh Khorasanzadeh, und C David Allis. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. In *Novartis Foundation Symposium*, pages 3–21. Chichester; New York; John Wiley; 1999, 2004.
- [45] A Klug, D Rhodes, J Smith, JT Finch, und JO Thomas. A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Natur*, 287:509–516, 1980. doi:[10.1038/287509a0](https://doi.org/10.1038/287509a0).
- [46] Martin Depken und Helmut Schiessel. Nucleosome shape dictates chromatin fiber structure. *Biophysical journal*, 96(3):777–784, 2009.
- [47] Jeffrey C Hansen. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *The EMBO Journal*, 31(7):1621–1623, 2012. doi:[10.1038/emboj.2012.66](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.66).
- [48] Yoshinori Nishino, Mikhail Eltsov, Yasumasa Joti, Kazuki Ito, Hideaki Takata, Yukio Takahashi, Saera Hihara, Achilleas S Frangakis, Naoko Imamoto, Tetsuya Ishikawa, und Kazuhiro Maeshima. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *The EMBO journal*, 31(7):1644–53, 2012. doi:[10.1038/emboj.2012.35](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.35).
- [49] Jeremy M Berg, John L Tymoczko, und Lubert Stryer. Biochemistry. *New York*, 2002.
- [50] Benedetta Dorigo, Thomas Schalch, Alexandra Kulangara, Sylwia Duda, Rasmus R Schroeder, und Timothy J Richmond. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, 306(5701):1571–1573, 2004.
- [51] JT Finch und A Klug. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(6):1897–1901, 1976.
- [52] Sanford H Leuba, Guoliang Yang, Charles Robert, Bruno Samori, Kensal van Holde, Joordanka Zlatanova, und Carlos Bustamante. Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24):11621–11625, 1994.
- [53] Thomas Schalch, Sylwia Duda, David F Sargent, und Timothy J Richmond. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, 436(7047):138–141, 2005.

- [54] Jordanka Zlatanova, Sanford H Leuba, und Kensal van Holde. Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophysical journal*, 74(5): 2554–2566, 1998.
- [55] MPF Marsden und UK Laemmli. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, 17(4):849–858, 1979.
- [56] Jovan Mirkovitch, Marc-Edouard Mirault, und Ulrich K Laemmli. Organization of the higher-order chromatin loop: specific dna attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39 (1):223–232, 1984.
- [57] Johan H. Gibcus und Job Dekker. The hierarchy of the 3d genome. *Molecular Cell*, 49(5): 773–782, 2013. doi:[10.1016/j.molcel.2013.02.011](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.011).
- [58] Gary Felsenfeld und Mark Groudine. Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921): 448–453, 2003.
- [59] Jérémie Capoulade, Malte Wachsmuth, Lars Hufnagel, und Michael Knop. Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells. *Nature biotechnology*, 29:835–839, 2011. doi:[10.1038/nbt.1928](https://doi.org/10.1038/nbt.1928).
- [60] Abraham Worcel, Steven Strogatz, und Donald Riley. Structure of chromatin and the linking number of dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3):1461–1465, 1981.
- [61] Bing Li, Michael Carey, und Jerry L Workman. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4):707–719, 2007.
- [62] Constance Alabert und Anja Groth. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(3):153–167, 2012.
- [63] Melissa W Adkins und Jessica K Tyler. The histone chaperone asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50):52069–52074, 2004.
- [64] Tony Kouzarides. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4):693–705, 2007.
- [65] Anjanabha Saha, Jacqueline Wittmeyer, und Bradley R Cairns. Chromatin remodelling: the industrial revolution of dna around histones. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7 (6):437–447, 2006.

- [66] Karolin Luger. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Research*, 14(1):5–16, 2006.
- [67] WJA Koopmans, R Buning, T Schmidt, und J Van Noort. spfret using alternating excitation and fcs reveals progressive dna unwrapping in nucleosomes. *Biophysical journal*, 97(1): 195–204, 2009.
- [68] Padinhateeri Ranjith, Jie Yan, und John F Marko. Nucleosome hopping and sliding kinetics determined from dynamics of single chromatin fibers in xenopus egg extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34):13649–13654, 2007.
- [69] Andrew J Andrews und Karolin Luger. Nucleosome structure (s) and stability: variations on a theme. *Annual review of biophysics*, 40:99–117, 2011.
- [70] Oliver Bell, Vijay K Tiwari, Nicolas H Thomä, und Dirk Schübeler. Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nature Reviews Genetics*, 12(8):554–564, 2011.
- [71] Brent D Brower-Toland, Corey L Smith, Richard C Yeh, John T Lis, Craig L Peterson, und Michelle D Wang. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4): 1960–1965, 2002.
- [72] Michael A Hall, Alla Shundrovsky, Lu Bai, Robert M Fulbright, John T Lis, und Michelle D Wang. High-resolution dynamic mapping of histone-dna interactions in a nucleosome. *Nature structural & molecular biology*, 16(2):124–129, 2009.
- [73] Christophe Lavelle. Forces and torques in the nucleus: chromatin under mechanical constraints. *Biochemistry and cell biology*, 87(1):307–322, 2009.
- [74] Leroy F Liu und James C Wang. Supercoiling of the dna template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(20):7024–7027, 1987.
- [75] Richard R Sinden, Jonathan O Carlson, und David E Pettijohn. Torsional tension in the dna double helix measured with trimethylpsoralen in living e. coli cells: analogous measurements in insect and human cells. *Cell*, 21(3):773–783, 1980.
- [76] Kuniharu Matsumoto und Susumu Hirose. Visualization of unconstrained negative supercoils of dna on polytene chromosomes of drosophila. *Journal of cell science*, 117(17): 3797–3805, 2004.
- [77] Fedor Kouzine, Ashutosh Gupta, Laura Baranello, Damian Wojtowicz, Khadija Ben-Aissa, Juhong Liu, Teresa M Przytycka, und David Levens. Transcription-dependent dynamic

- supercoiling is a short-range genomic force. *Nature structural & molecular biology*, 20(3):396–403, 2013.
- [78] Fedor Kouzine, Suzanne Sanford, Zichrini Elisha-Feil, und David Levens. The functional response of upstream dna to dynamic supercoiling in vivo. *Nature structural & molecular biology*, 15(2):146–154, 2008.
- [79] Maria L Kireeva, Wendy Walter, Vladimir Tchernajenko, Vladimir Bondarenko, Mikhail Kashlev, und Vasily M Studitsky. Nucleosome remodeling induced by rna polymerase ii: loss of the h2a/h2b dimer during transcription. *Molecular cell*, 9(3):541–552, 2002.
- [80] Olga I Kulaeva, Daria A Gaykalova, Nikolai A Pestov, Viktor V Golovastov, Dmitry G Vassilyev, Irina Artsimovitch, und Vasily M Studitsky. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of rna polymerase ii. *Nature structural & molecular biology*, 16(12):1272–1278, 2009.
- [81] Courtney Hodges, Lacramioara Bintu, Lucyna Lubkowska, Mikhail Kashlev, und Carlos Bustamante. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of rna polymerase ii. *Science*, 325(5940):626–628, 2009.
- [82] Maxim Y Sheinin, Ming Li, Mohammad Soltani, Karolin Luger, und Michelle D Wang. Torque modulates nucleosome stability and facilitates h2a/h2b dimer loss. *Nature communications*, 4, 2013.
- [83] Celeste Yanisch-Perron, Jeffrey Vieira, und Joachim Messing. Improved m13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the m13mpl8 and puc19 vectors. *Gene*, 33(1):103–119, 1985.
- [84] Claudia Pfannschmidt und Jörg Langowski. Superhelix organization by dna curvature as measured through site-specific labeling. *Journal of molecular biology*, 275(4):601–611, 1998.
- [85] Malte Bussiek, Konstantin Klenin, und Jörg Langowski. Kinetics of site–site interactions in supercoiled dna with bent sequences. *Journal of molecular biology*, 322(4):707–718, 2002.
- [86] Jörg Langowski, Ursula Giesen, und Christina Lehmann. Dynamics of superhelical dna studied by photon correlation spectroscopy. *Biophysical chemistry*, 25(2):191–200, 1986.
- [87] Markus Hammermann, Carola Steinmaier, Holger Merlitz, Ulrike Kapp, Waldemar Waldeck, Giuseppe Chirico, und Jörg Langowski. Salt effects on the structure and internal

- dynamics of superhelical dnas studied by light scattering and brownian dynamics. *Bio-physical journal*, 73(5):2674, 1997.
- [88] Ulrike Kapp und Jörg Langowski. Preparation of DNA topoisomers by RP-18 high-performacne liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 206:293–299, 1992.
- [89] Ulrike Kapp und Jörg Langowski. Preparation of dna topoisomers by rp-18 high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 206(2):293–299, 1992.
- [90] Paul Anderson und William Bauer. Supercoiling in closed circular dna: dependence upon ion type and concentration. *Biochemistry*, 17(4):594–601, 1978.
- [91] Mavis Shure und Jerome Vinograd. The number of superhelical turns in native virion sv40 dna and minicol dna determined by the band counting method. *Cell*, 8(2):215–226, 1976.
- [92] Claudia Pfannschmidt, Achim Schaper, Gudrun Heim, Thomas H. Jovin, und Jörg Langowski. Sequence-specific labeling of superhelical DNA by triple helix formation and psoralen crosslinking. *Nucleic Acids Research*, 24(9):1702–1709, 1996.
- [93] VI Lyamichev, SM Mirkin, ON Danilevskaya, ON Voloshin, SV Balatskaya, VN Dobrynin, SA Filippov, und MD Frank-Kamenetskii. An unusual dma structure detected in a telomeric sequence under superhelical stress and at low ph. *Nature*, 339:634–637, 1989. doi:doi:10.1038/339634a0.
- [94] Victor I Lyamichev, Oleg N Voloshin, Maxim D Frank-Kamenetskii, und Valery N Soyfer. Photofootprinting of dna triplexes. *Nucleic acids research*, 19(7):1633–1638, 1991.
- [95] Regina M Santella, Nirmala Dharmaraja, Frank P Gasparro, und Richard L Edelson. Monoclonal antibodies to dna modified by 8-methoxypsoralen and ultraviolet a light. *Nucleic acids research*, 13(7):2533–2544, 1985.
- [96] George D Cimino, HB Gamper, ST Isaacs, und JE Hearst. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 54(1):1151–1193, 1985.
- [97] LED Engin. Datasheet: High efficacy 365nm UV LED emitter LZ1-00U600, 2015. URL <http://docs-europe.electrocomponents.com/webdocs/0fdf/0900766b80fdf888.pdf>. accessed 2015-04-20.

- [98] RECOM Inc. Datasheet: Constant current led driver rcd-24-..., 2015. URL <http://www.recom-power.com/pdf/Lightline/RCD-24.pdf>. accessed 2015-04-20.
- [99] Pamela N Dyer, Raji S Edayathumangalam, Cindy L White, Yunhe Bao, Srinivas Chakravarthy, Uma M Muthurajan, und Karolin Luger. Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and dna. *Methods in enzymology*, 375:23–44, 2003.
- [100] Katalin Tóth, Nathalie Brun, und Jörg Langowski. Chromatin compaction at the mononucleosome level. *Biochemistry*, 45(6):1591–1598, 2006.
- [101] Gerd Binnig und Heinrich Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Surface Science*, 126(1):236–244, 1983.
- [102] Dimas G de Oteyza, Patrick Gorman, Yen-Chia Chen, Sebastian Wickenburg, Alexander Riss, Duncan J Mowbray, Grisha Etkin, Zahra Pedramrazi, Hsin-Zon Tsai, Angel Rubio, et al. Direct imaging of covalent bond structure in single-molecule chemical reactions. *Science*, 340(6139):1434–1437, 2013.
- [103] Gerd Binnig, Calvin F Quate, und Ch Gerber. Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9):930, 1986.
- [104] Sandor Kasas, Neil H Thomson, Bettye L Smith, Helen G Hansma, Xingshu Zhu, Martin Guthold, Carlos Bustamante, Eric T Kool, Mikhail Kashlev, und Paul K Hansma. Escherichia coli rna polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry*, 36(3):461–468, 1997.
- [105] Martin Guthold, Xingshu Zhu, Claudio Rivetti, Guoliang Yang, Neil H Thomson, Sandor Kasas, Helen G Hansma, Bettye Smith, Paul K Hansma, und Carlos Bustamante. Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by escherichia coli rna polymerase. *Biophysical journal*, 77(4):2284–2294, 1999.
- [106] Karim El Kirat, I Burton, Vincent Dupres, und YF Dufrene. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of microscopy*, 218(3):199–207, 2005.
- [107] Carlos Bustamante, Dorothy A Erie, und David Keller. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(5):750–760, 1994.
- [108] Claudio Rivetti, Martin Guthold, und Carlos Bustamante. Scanning force microscopy of dna deposited onto mica: Equilibrationversuskinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *Journal of molecular biology*, 264(5):919–932, 1996.

- [109] Malte Bussiek, Norbert Mücke, und Jörg Langowski. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled dna conformation by scanning force microscopy in solution. *Nucleic acids research*, 31(22):e137–e137, 2003.
- [110] Nataliya Panchuk-Voloshina, Rosaria P Haugland, Janell Bishop-Stewart, Mahesh K Bhalgat, Paul J Millard, Fei Mao, Wai-Yee Leung, und Richard P Haugland. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9):1179–1188, 1999.
- [111] Douglas Magde, Elliot Elson, und Watt W Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705, 1972.
- [112] Elliot L Elson und Douglas Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1):1–27, 1974.
- [113] Douglas Magde, Elliot L Elson, und Watt W Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers*, 13(1):29–61, 1974.
- [114] Douglas Magde, Watt W Webb, und Elliot L Elson. Fluorescence correlation spectroscopy. iii. uniform translation and laminar flow. *Biopolymers*, 17(2):361–376, 1978.
- [115] Keith M Berland, PT So, und Enrico Gratton. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophysical Journal*, 68(2):694, 1995.
- [116] Malte Wachsmuth, Waldemar Waldeck, und Joörg Langowski. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of molecular biology*, 298(4):677–689, 2000.
- [117] Thomas Weidemann, Malte Wachsmuth, Tobias A Knoch, Gabriele Müller, Waldemar Waldeck, und Jörg Langowski. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. *Journal of molecular biology*, 334(2):229–240, 2003.
- [118] J Langowski, M Wachsmuth, K Rippe, und M Tewes. Biomolecular shape and interactions determined by fluorescence correlation spectroscopy. *Energies et Forces de l'Interaction entre Macromolécules Biologiques: l'Aspect Quantitatif*. J.-P. Frénoy, editor. Publications CNRS, Paris, pages 65–77, 2000.

- [119] Oleg Krichevsky und Grégoire Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.*, 65:251–297, 2002. doi:[10.1088/0034-4885/65/2/203](https://doi.org/10.1088/0034-4885/65/2/203).
- [120] J. Widengren, Ü. Mets, und R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, 99(36):13368–13379, 1995.
- [121] Jan Wolfgang Krieger und Jörg Langowski. QuickFit 3.0 (status: beta, compiled: 25.06.2014, SVN: 3292): A data evaluation application for biophysics. [web page] <http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/>, 25.06.2014. [Accessed on 25.06.2014].
- [122] Kóroly Módos, Rita Galántai, Irén Bárdos-Nagy, Malte Wachsmuth, Katalin Tóth, Judit Fidy, und Jörg Langowski. Maximum-entropy decomposition of fluorescence correlation spectroscopy data: application to liposome-human serum albumin association. *European Biophysics Journal*, 33(1):59–67, 2004. doi:[10.1007/s00249-003-0343-6](https://doi.org/10.1007/s00249-003-0343-6).
- [123] J. Skilling und R. K. Bryan. Maximum entropy image reconstruction - general algorithm. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 211:111–111, 1984.
- [124] Alexander Gansen. *Chromatin at the Nanolevel – Development of a single molecule FRET experiment and analysis of the structure and stability of individual nucleosomes*. PhD thesis, Universität Heidelberg, Heidelberg, 2007. URL <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8342>.
- [125] Zdenek Petrásek und Petra Schwille. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 94:1437–1448, 2008. doi:[10.1529/biophysj.107.108811](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.108811).
- [126] Peter E Nielsen. Peptide nucleic acids (pna) in chemical biology and drug discovery. *Chemistry & biodiversity*, 7(4):786–804, 2010.
- [127] Heiko Kuhn, Bichismita Sahu, Srinivas Rapireddy, Danith Ly, und Maxim D Frank-Kamenetskii. Sequence specificity at targeting double-stranded dna with a gamma-pna oligomer modified with guanidinium g-clamp nucleobases. *Artificial DNA: PNA & XNA*, 1(1):45–53, 2010.
- [128] Anca Dragulescu-Andrasi, Srinivas Rapireddy, Brian M Frezza, Chakicherla Gayathri, Roberto R Gil, und Danith H Ly. A simple γ -backbone modification preorganizes peptide

- nucleic acid into a helical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 128(31): 10258–10267, 2006.
- [129] Ludger Harnau, Roland G Winkler, und Peter Reineker. Dynamic structure factor of semiflexible macromolecules in dilute solution. *The Journal of chemical physics*, 104(16): 6355–6368, 1996.
- [130] Tomasz Wocjan. *Dynamics of DNA in Nucleosomes and Plasmids studied by Brownian dynamics*. PhD thesis, Universität Heidelberg, Heidelberg, 2009. URL <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/10335>.
- [131] David R. Lide und W. M. Mickey Haynes. *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC Press/Taylor and Francis, 90 edition, 2010.
- [132] Fedor Kouzine und David Levens. Supercoil-driven dna structures regulate genetic transactions. *Front Biosci*, 12(8-12):4409, 2007.
- [133] Tracy A Brooks und Laurence H Hurley. The role of supercoiling in transcriptional control of myc and its importance in molecular therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 9(12):849–861, 2009.
- [134] Amersham Bioscience. Datasheet: Ficoll pm70/pm400, 2001. URL https://somapps.med.upenn.edu/pbr/portal/immune/Ficcoll_info.pdf. accessed 2015-05-09.
- [135] Xiaobing Chen und Howard C Berg. Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of escherichia coli. *Biophysical journal*, 78(2):1036–1041, 2000.
- [136] T Wocjan, K Klenin, und J Langowski. Brownian dynamics simulation of dna unrolling from the nucleosome. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(9):2639–2646, 2008.
- [137] Gregory J Gemmen, Ronald Sim, Karl A Haushalter, Pu Chun Ke, James T Kadonaga, und Douglas E Smith. Forced unraveling of nucleosomes assembled on heterogeneous dna using core histones, nap-1, and acf. *Journal of molecular biology*, 351(1):89–99, 2005.
- [138] Tabea Elbel. Einfluss positiver superspiralisierung auf die zugabhängigkeit nukleosomaler dna. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, 2007.
- [139] Vera Böhm, Aaron R Hieb, Andrew J Andrews, Alexander Gansen, Andrea Rocker, Katalin Tóth, Karolin Luger, und Jörg Langowski. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface. *Nucleic acids research*, 39(8):3093–3102, 2011.

- [140] Karolin Luger, Armin W. Maeder, Robin K. Richmond, David F. Sargent, und Timothy J. Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *nature*, 389:251–260, 1997. doi:[10.1038/38444](https://doi.org/10.1038/38444).
- [141] Tabea Elbel und Jörg Langowski. The effect of dna supercoiling on nucleosome structure and stability. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(6):064105, 2015.
- [142] Laura Baranello, David Levens, Ashutosh Gupta, und Fedor Kouzine. The importance of being supercoiled: How dna mechanics regulate dynamic processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(7):632–638, 2012.
- [143] Yoshinori Kohwi und Terumi Kohwi-Shigematsu. Altered gene expression correlates with dna structure. *Genes & development*, 5(12b):2547–2554, 1991.
- [144] David J Clark und Gary Felsenfeld. A nucleosome core is transferred out of the path of a transcribing polymerase. *Cell*, 71(1):11–22, 1992.
- [145] Myeong-Sok Lee und William T Garrard. Transcription-induced nucleosome’splitting’: an underlying structure for dnase i sensitive chromatin. *The EMBO journal*, 10(3):607, 1991.
- [146] Sheila S Teves und Steven Henikoff. Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes. *Nature structural & molecular biology*, 21(1):88–94, 2014.
- [147] Juhong Liu, Fedor Kouzine, Zuqin Nie, Hye-Jung Chung, Zichrini Elisha-Feil, Achim Weber, Keji Zhao, und David Levens. The fuse/fbp/fir/tfiih system is a molecular machine programming a pulse of c-myc expression. *The EMBO journal*, 25(10):2119–2130, 2006.
- [148] Paula C Fernandez, Scott R Frank, Luquan Wang, Marianne Schroeder, Suxing Liu, Jonathan Greene, Andrea Cocito, und Bruno Amati. Genomic targets of the human c-myc protein. *Genes & development*, 17(9):1115–1129, 2003.
- [149] Chang-Rung Chen, Yibin Kang, und Joan Massagué. Defective repression of c-myc in breast cancer cells: a loss at the core of the transforming growth factor β growth arrest program. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3):992–999, 2001.
- [150] Cameron D Little, Marion M Nau, Desmond N Carney, Adi F Gazdar, und John D Minna. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*, 306:194–196, 1983. doi:[10.1038/306194a0](https://doi.org/10.1038/306194a0).

- [151] Jörg Langowski, Markus Hammermann, Konstantin Klenin, Roland May, und Katalin Tóth. Superhelical DNA studied by solution scattering and computer models. *Genetica*, 106(1/2):49–55, 1999. doi:[10.1023/A:1003720610089](https://doi.org/10.1023/A:1003720610089).
- [152] G W Brady, D B Fein, H Lambertson, V Grassian, D Foos, und C J Benham. X-ray scattering from the superhelix in circular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(3):741–4, 1983.
- [153] Jörg Langowski, Werner Kremer, und Ulrike Kapp. [21] dynamic light scattering for study of solution conformation and dynamics of superhelical dna. *Methods in enzymology*, 211: 430–448, 1992.
- [154] Robert J DeLeys und David A Jackson. Dye titrations of covalently closed supercoiled dna analyzed by agarose gel electrophoresis. *Biochemical and biophysical research communications*, 69(2):446–454, 1976.
- [155] Alfred Nordheim, Eileen M Lafer, Lawrence J Peck, James C Wang, B David Stollar, und Alexander Rich. Negatively supercoiled plasmids contain left-handed z-dna segments as detected by specific antibody binding. *Cell*, 31(2):309–318, 1982.
- [156] Jörg Langowski. Salt effects on internal motions of superhelical and linear puc8 dna: Dynamic light scattering studies. *Biophysical chemistry*, 27(3):263–271, 1987.
- [157] C. Pfannschmidt, A. Schaper, G. Heim, T.M. Jovin, und J. Langowski. Sequence-specific labeling of superhelical dna by triple helix formation and psoralen crosslinking. *Nucl. Acids. Res.*, 24:1702–1709, 1996.
- [158] R. Shusterman, S. Alon, T. Gavrinov, und O. Krichevsky. Monomer dynamics in double- and single-stranded dna polymers. *Phys. Rev. Lett.*, 92(4):048303, 2004.
- [159] K. Kroy und E. Frey. Dynamic scattering from solutions of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E*, 55:2469–2476, 1997.
- [160] L. Harnau, R.G. Winkler, und P. Reineker. Dynamic structure factor of semiflexible macromolecules in dilute solution. *J. Chem. Phys.*, 104:6355–6368, 1996.
- [161] C G Baumann, S B Smith, V A Bloomfield, und C Bustamante. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12):6185–90, 1997.

- [162] Jay R. Wenner, Mark C. Williams, Ioulia Rouzina, und Victor A. Bloomfield. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophysical Journal*, 82(6):3160–3169, 2002. doi:[10.1016/S0006-3495\(02\)75658-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75658-0).
- [163] Eugene M. Terentjev und David A. Weitz, editors. *The Oxford Handbook of Soft Condensed Matter*. Oxford Handbooks in Physics. Oxford University Press, 2015. ISBN 9780191044069.
- [164] Claus B. Müller, Thomas Eckert, Anastasia Loman, Jörg Enderlein, und Walter Richtering. Dual-focus fluorescence correlation spectroscopy: a robust tool for studying molecular crowding. *Soft Matter*, 5(7):1358, 2009. doi:[10.1039/b812289j](https://doi.org/10.1039/b812289j).
- [165] Konstantin Klenin, Holger Merlitz, und Jörg Langowski. A brownian dynamics program for the simulation of linear and circular dna and other wormlike chain polyelectrolytes. *Biophysical Journal*, 74(2):780–788, 1998.
- [166] T. Wocjan, K.V. Klenin, und J. Langowski. Brownian dynamics simulation of dna unrolling from the nucleosome. *J. Phys. Chem. B*, 113(9):2639–2646, 2009.
- [167] Alexander Gansen, Alessandro Valeri, Florian Hauger, Suren Felekyan, Stanislav Kalinin, Katalin Tóth, Jörg Langowski, und Claus AM Seidel. Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule fret. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36):15308–15313, 2009.
- [168] Alexander Gansen, Aaron R Hieb, Vera Böhm, Katalin Tóth, und Jörg Langowski. Closing the gap between single molecule and bulk fret analysis of nucleosomes. *PloS one*, 8(4):e57018, 2013.
- [169] Jun Y Fan, Danny Rangasamy, Karolin Luger, und David J Tremethick. H2a. z alters the nucleosome surface to promote hp1 α -mediated chromatin fiber folding. *Molecular cell*, 16(4):655–661, 2004.
- [170] Jun Y Fan, Faye Gordon, Karolin Luger, Jeffrey C Hansen, und David John Tremethick. The essential histone variant h2a. z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9(3):172–176, 2002.
- [171] S Chakravarthy, Y Bao, VA Roberts, D Tremethick, und K Luger. Structural characterization of histone h2a variants. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 69, pages 227–234. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.

- [172] Alexander Gansen, Katalin Toth, Lars Nordenskiöld, und Jörg Langowski. Selective acetylation reveals distinct roles of histones h3 and h4 in nucleosome dynamics-a fret study. *Biophysical Journal*, 106(2):430a, 2014.
- [173] M. E. J. Friese, T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg, und H. Rubinsztein-Dunlop. Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles. *Nature*, 394(6691):348–350, 1998. doi:[10.1038/28566](https://doi.org/10.1038/28566).
- [174] Arthur La Porta und Michelle D. Wang. Optical torque wrench: Angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles. *Physical Review Letters*, 92(19), 2004. doi:[10.1103/PhysRevLett.92.190801](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.92.190801).
- [175] R Bash, H Wang, C Anderson, J Yodh, G Hager, SM Lindsay, und D Lohr. Afm imaging of protein movements: histone h2a–h2b release during nucleosome remodeling. *FEBS letters*, 580(19):4757–4761, 2006.
- [176] Malte Bussiek, Katalin Toth, Nathalie Brun, und Jörg Langowski. Dna-loop formation on nucleosomes shown by in situ scanning force microscopy of supercoiled dna. *Journal of molecular biology*, 345(4):695–706, 2005.
- [177] Aurélien Bancaud, Gaudeline Wagner, Natalia Conde e Silva, Christophe Lavelle, Hua Wong, Julien Mozziconacci, Maria Barbi, Andrei Sivolob, Eric Le Cam, Liliane Mouawad, et al. Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Molecular cell*, 27(1):135–147, 2007.
- [178] Steven J Petesch und John T Lis. Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation. *Trends in Genetics*, 28(6):285–294, 2012.
- [179] Hiroshi Kimura und Peter R Cook. Kinetics of core histones in living human cells little exchange of h3 and h4 and some rapid exchange of h2b. *The Journal of cell biology*, 153(7):1341–1354, 2001.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, sowie die erfahrene Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeiten meine Daten auf internationalen Konferenzen vorstellen zu können bedanken, sowie für die guten Bedingungen in seinem Labor.

Herrn Prof. Dr. Harald Herrman-Lerdon danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie die hilfreichen Anregungen und die Betreuung als Mitglied meines TAC-Komitees.

Frau Prof. Dr. Ilme Schlichting möchte ich ebenfalls herzlich für die Betreuung als weiteres Mitglied meines TAC-Komitees danken.

Herrn Prof. Dr. Oleg Krichevsky danke ich herzlich für die hilfreichen Diskussionen und zur Auswertung der internen DNA-Dynamik, sowie die Einladung nach Israel, die es mir ermöglicht hat einen interessanten und wunderbaren Forschungsaufenthalt in seinem Labor zu verbringen. Seiner Gruppe möchte ich für die freundliche Aufnahme und die Einarbeitung in den FCS-Aufbau danken.

Frau Maria Mildenerberger möchte ich für die zahlreichen Plasmidproduktionen und die HPLC-Aufreinigungen danken, die während dieser Arbeit eine große Unterstützung waren.

Frau Gabriele Müller danke ich für die sehr kompetenten Ratschläge und Ideen zur experimentellen Umsetzung meiner Ideen, sowie der Einführung in die Zellkern-Isolation und Zellkultur im Allgemeinen.

Alexander Gansen möchte ich herzlich für das Interesse an meinen Projekten und der Unterstützung bei ihrer Etablierung danken, sowie für die zahlreichen aufmunternden Gespräche.

Ein ganz besonderer Dank gilt Jan Krieger, der immer ein offenes Ohr für meine Ideen hatte und sich stets Zeit nahm um sie mit mir zu diskutieren. Ebenso möchte ich mich bei ihm für das fabelhafte und sehr gründliche Korrekturlesen meiner Veröffentlichung, sowie dieser Arbeit bedanken. Die Weiterentwicklung von QuickFit3 und die zahlreichen Erweiterungen des Programms machten die Auswertung fast zu einem Vergnügen („fast“). Außerdem möchte ich mich ganz herzlich für die wunderbare Unterstützung während der letzten Jahre, sowie in der

Entstehungszeit dieser Dissertationsschrift bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Gruppenmitgliedern (auch den mittlerweile ehemaligen) für die gute Atmosphäre in der Gruppe wie auch die gegenseitige Unterstützung bedanken, die diese Arbeitsgruppe auszeichnet. Die bereichernden Gespräche und die gemeinsamen Unternehmungen waren eine Bereicherung in den letzten Jahren.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Mutter, die mich in den letzten Jahren immer unterstützt hat.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den _____

Unterschrift