

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät

der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Vera Böhm

aus Mainz

Tag der mündlichen Prüfung

6. Mai 2011

Thema:

**Untersuchungen der Dynamik von Nukleosomen
mittels Einzelmolekülfluoreszenz**

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Jörg Langowski

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Februar 2011 in der Abteilung „Biophysik der Makromoleküle“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski angefertigt.

Meiner Mutter

“We have not succeeded in answering all our problems. Indeed, we sometimes feel we have not completely answered any of them. The answers we have found only serve to raise a whole set of new questions. In some ways we feel we are as confused as ever, but we believe we are confused on a higher level and about more important things.”

Lester B. Pearson

Kurzzusammenfassung

DNA ist der Speicher der genetischen Information. In Eukaryoten ist die DNA in Nukleosomen organisiert, d.h. kurze DNA-Abschnitte sind zweimal um einen Kern aus Histonproteinen gewunden. Die Nukleosomen beeinflussen die zelluläre Maschinerie, die die genetischen Informationen abliest. Dass zu jeder Zeit die passende Information auf der DNA zugänglich ist, wird unter anderem durch die Dissoziation und die Assemblierung von Nukleosomen reguliert.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um diese Prozesse *in vitro* zu analysieren. Dazu wurden Nukleosomen sowohl an verschiedenen Histonen als auch an der DNA mit Fluorophoren markiert und mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (spFRET) in einem konfokalen Mikroskop untersucht. Durch Variation der Ionenstärke wurde dabei die Dissoziation und die Assemblierung der Nukleosomen induziert. Mittels FCS wurde aus Fluktuationen der Fluoreszenzintensität der Diffusionskoeffizient von Nukleosomen ermittelt. Da der Diffusionskoeffizient ein Maß für die Größe und Form eines Moleküls ist, konnte durch dessen Änderung die Dissoziation von Nukleosomen verfolgt werden. So wurde gezeigt, dass der Proteinkern schrittweise von der DNA abdissoziiert und substöchiometrische DNA-Histon-Komplexe als Zwischenprodukte auftreten, in denen die DNA für die zelluläre Maschinerie leichter zugänglich ist.

FRET ist ein Prozess, bei dem Energie strahlungslos zwischen zwei Fluorophoren übertragen wird. Aus der Emission der Fluorophore lassen sich deren Abstände in Molekülen untersuchen. In dieser Arbeit wurde Energietransfer in einzelnen durch das Fokusvolumen diffundierenden Nukleosomen gemessen. Im Vergleich zu Messungen an Molekülensembles, bei denen der Interfluorophorabstand über alle Nukleosomen gemittelt wird, konnten so verschiedene Zustände identifiziert werden, die sich im Interfluorophorabstand unterscheiden. Auf diese Art konnte eine bislang unbekannte Nukleosomkonformation nachgewiesen werden, die vor der Dissoziation der Histone von der DNA auftritt, und in der die Histone und die DNA leichter für externe Faktoren zugänglich sind. Auch konnte gezeigt werden, dass bei der Assemblierung von Nukleosomen die gleichen Zwischenprodukte in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen werden, und der Prozess vollständig reversibel ist.

In vivo wird die Stabilität der Nukleosomen unter anderem durch den Austausch von Histonen durch Histonvarianten reguliert. In dieser Arbeit wurde mit spFRET der Einfluss einer Histonvariante (H2A.Z) untersucht und es wurde gezeigt, dass bei der Dissoziation von Nukleosomen, die diese Histonvariante enthalten, andere Zwischenprodukte auftreten. Die Histonvariante kann daher signifikante Auswirkungen auf die Zugänglichkeit der DNA haben.

Abstract

DNA contains the genetic instructions used for the development and function of all living organisms. In eukaryotes, a large amount of DNA must be compacted into the volume of nucleus; this is accomplished by wrapping short fragments of DNA around a core of histone proteins forming a complex called nucleosome. These nucleosomes, however, represent an obstacle for the cellular machinery that reads the genetic information. To regulate which information is read out at any given time, the cell can assemble or disassemble specific nucleosomes at the loci of interest.

In this thesis, an *in vitro* assay for the investigation of these regulatory processes has been developed. For the assay, nucleosomes were fluorescently labeled on different positions within the histone core, as well as along the DNA. They were then analyzed by confocal microscopy using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and single pair Förster Resonance Energy Transfer (spFRET) while assembly and disassembly was induced by varying the ionic strength of the medium. FCS can be used to measure the diffusion coefficient by analyzing fluctuations in fluorescence emission as the molecules move through the confocal spot. As the diffusion coefficient is a measure for the molecule's size and shape, distinct (dis)assembly steps could be observed using FCS showing that the histone core disassembles sequentially and sub-stoichiometric histone-DNA complexes arise where the DNA becomes more accessible to the cellular machinery.

While step-wise (dis)assembly proved to be an interesting finding, intermediate states within this pathway were further probed using spFRET. FRET is the non radiative energy transfer between two fluorophores. Its efficiency depends highly on the fluorophores' distance which can thus be investigated. Compared to bulk analysis, spFRET experiments can unravel specific subpopulations of heterogeneous samples that differ in distance between their fluorescently labeled components. In this thesis a previously uncharacterized structural state was observed, in which the histones become more accessible to the cellular machinery prior to dissociation from the DNA. This intermediate state is populated at 0.2 – 6 % under physiological conditions.

In vivo, the stability of nucleosomes is regulated by exchanging major type histones for histone variants. To characterize the role of histone variants in nucleosome accessibility, major-type H2A was replaced with histone variant H2A.Z in nucleosomes, and its effect on nucleosome (dis)assembly and open-state formation was investigated. Strikingly, spFRET data analysis shows nucleosomes containing H2A.Z follow a (dis)assembly pathway distinct from nucleosomes containing major-type histones, which also contains new, yet to be identified, intermediate states.

Zusammenfassung

Seit April 2003 gilt das menschliche Genom offiziell als vollständig entschlüsselt. Dies bedeutet, dass die Abfolge der 3 Milliarden Basenpaare der DNA, die in jeder menschlichen Zelle enthalten sind, und die Position der Gene innerhalb der DNA bekannt sind. Dieses Kenntnis allein ist jedoch nicht ausreichend, um biologische Prozesse wie die Entstehung von Krankheiten zu verstehen. Dafür spielt es eine entscheidende Rolle, wie die in der DNA gespeicherte Information abgelesen, d.h. die DNA transkribiert wird.

Die besondere Struktur der DNA im Zellkern ist dafür von großer Bedeutung. Die 3 Milliarden Basenpaare des menschlichen Genoms, die in einem Zellkern von wenigen Mikrometern Durchmesser vorliegen, weisen eine Gesamtlänge von 2 Metern aus. Die DNA muss daher komprimiert sein. Erreicht wird dies mithilfe von Proteinen, die die DNA in dem sogenannten Chromatin organisieren. Trotz der Komprimierung muss der Zugang der zellulären Maschinerie zu der DNA gewährleistet sein, so dass die essentiellen Prozesse wie die Transkription stattfinden können. Dabei muss der Zugang zur DNA reguliert sein, damit die Gene nur wenn nötig abgelesen werden.

In dieser Arbeit wird die kleinste sich wiederholende Einheit des Chromatins untersucht, das Nukleosom. Darin ist die DNA annähernd zweifach um einen Kern aus acht Proteinen, den Histonen, gewickelt. Einzelne Nukleosomen liegen wie die Perlen einer Kette nebeneinander auf der DNA, und durch Wechselwirkungen der Nukleosomen untereinander können diese Ketten zu stärker komprimierten Strukturen gefaltet werden. So kann die Länge der DNA bis zu 20 000-fach reduziert werden.

Neben der Komprimierung der DNA erfüllen Nukleosomen auch die zweite, entscheidende Aufgabe: durch die Dissoziation und Assemblierung von Nukleosomen kann der Zugang zu der DNA kontrolliert werden. Der Histonkern spielt dabei eine besondere Rolle. Die einzelnen Histone können z.B. durch Acetylierung modifiziert oder durch Histonvarianten ausgetauscht werden. Dadurch wird beeinflusst, wie die in den Nukleosomen enthaltene DNA abgelesen wird. Sind diese Prozesse gestört, kann dies zu schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs führen. Wie die Histonzusammensetzung der Nukleosomen mit der Genaktivität zusammenhängt, ist jedoch bislang nicht vollständig bekannt.

Um diesen Zusammenhang besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit der Mechanismus der Assemblierung und der Dissoziation von Nukleosomen untersucht, und der Einfluss einer Histonvariante auf diese Prozesse analysiert.

Seit langem ist bekannt, dass der Histonkern selbst ein modularer Komplex aus einem Tetramer der Histone H3 und H4 ((H3-H4)₂ Tetramer) und zwei identischen Dimeren der Histone H2A und H2B (H2A-H2B Dimer) ist. Das Lösen der Kristallstruktur hat einen

wesentlichen Beitrag zu der Untersuchung von Nukleosomen geliefert. Allerdings stellt sie nur ein statisches Bild von einem dynamischen System dar. Dieser Nachteil wurde besonders deutlich, als die erste Struktur eines Nukleosoms gelöst wurde, das eine Histonvariante enthält. Die gefundenen Strukturen sind sich sehr ähnlich, so dass der Ursprung der großen funktionellen Unterschiede *in vivo* nicht allein aufgrund der Struktur geklärt werden konnte.

Die Dissoziation und die Assemblierung von Nukleosomen wurden in zahlreichen Studien untersucht. *In vivo* werden diese Prozesse von Assemblierungs- und Remodellierungsfaktoren katalysiert. *In vitro* können Nukleosomen durch Variation der Ionenstärke assembliert oder dissoziiert werden. So wurde gezeigt, dass die Assemblierung mit der Anlagerung des (H3-H4)₂ Tetramers beginnt und das Binden des H2A-H2B Dimer in einem zweiten Schritt erfolgt. Der Mechanismus der Dissoziation ist trotz zahlreicher Studien nicht bekannt. Einige experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass zunächst die H2A-H2B Dimere von der DNA dissoziieren, während das (H3-H4)₂ Tetramer an der DNA gebunden bleibt, aus anderen wiederum lässt sich schließen, dass sich der Proteinkern als eine Einheit von der DNA löst. Unabhängig vom vorliegenden Mechanismus treten bei der Assemblierung und der Dissoziation von Nukleosomen wahrscheinlich Zwischenprodukte auf, die für die Zugänglichkeit der DNA ebenfalls eine besondere Rolle spielen. Bei den bisherigen Untersuchungen ergaben sich wenige Erkenntnisse über diese Zwischenprodukte.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, den Mechanismus der Dissoziation aufzuklären und die in diesen Prozessen auftretenden Zwischenprodukte detailliert zu analysieren. Dafür wurden Nukleosomen in einem konfokalen Mikroskop mittels zweier Einzelmolekülfluoreszenzmethoden, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (spFRET), untersucht.

Das konfokale Mikroskop zeichnet sich hierbei durch sein kleines Beobachtungsvolumen aus (~ 1 Femtoliter). Mit FCS werden die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität untersucht, die entstehen, wenn die fluoreszierende Probe in oder aus diesem Volumen diffundiert. Die Fluktuationen sind durch die dynamischen Eigenschaften der Moleküle wie dem Diffusionskoeffizienten bestimmt. Dieser hängt von der Größe und Form eines Moleküls ab und wurde hier dazu verwendet, die Dissoziationsschritte des Nukleosoms zu charakterisieren, die mit einer deutlichen Größenänderung einhergehen.

FRET ist ein Prozess, bei dem Energie von einem angeregten Donorfluorophor auf einen zweiten Fluorophor, den Akzeptor, übertragen wird, wenn sich diese in einem Abstand von wenigen Nanometern befinden. Dabei ist die Effizienz der Übertragung stark vom Abstand der Fluorophore abhängig. Da die Effizienz aus der Fluoreszenzemission experimentell bestimmbar ist, lassen sich mit FRET Abstände in doppelt fluoreszenzmarkierten Makromolekülen ermitteln, wodurch FRET sich zu dem molekularen Metermaß der

Biochemie entwickelt hat. Hier wurden FRET-Messungen an einzelnen Nukleosomen durchgeführt. Dies ist mit Hilfe des konfokalen Mikroskops möglich, wenn die Probe so stark verdünnt ist, dass maximal ein fluoreszierendes Nukleosom zu jeder Zeit im Beobachtungsvolumen vorliegt. Die Stärke der Einzelmolekülmessung besteht in der Analyse heterogener Proben. Während bei einer Messung an einem Molekülensemble der Interfluorophorabstand über alle Nukleosomen gemittelt wird, erhält man in einer Einzelmolekülmessung die Information, wie die Interfluorophorabstände in der Probe verteilt sind. Liegen verschiedene Konformationen in einer Probe vor, so können diese quantifiziert und die Abstände einzeln berechnet werden. Es ist darüber hinaus erkennbar, ob die markierten Positionen frei beweglich sind und der Interfluorophorabstand daher permanent variiert.

Bereits zuvor wurden Einzelmolekülfluoreszenzmethoden verwendet, um die Dynamik von Nukleosomen zu untersuchen. Allerdings wurden bislang die Fluorophore immer nur an die DNA gebunden. Die Dynamik des Proteinkerns konnte daher nicht direkt untersucht werden. Die Markierung des Proteinkerns wurde vermieden, da jedes Histon zweifach im Proteinkern vorliegt, und die spezifische Markierung eines einzigen Histons nicht möglich ist. In dieser Arbeit wurde diese Schwierigkeit mit einer speziellen Markierungsstrategie gelöst, in der die Histone nur zu einem geringen Anteil markiert wurden. Bei Anwendung von Einzelmolekülfluoreszenz weisen 95 % der untersuchten Nukleosomen eine spezifische Markierung auf.

Mit dieser Untersuchungsmethode konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei der Dissoziation von Nukleosomen zunächst die H2A-H2B Dimere und erst in einem zweiten Schritt das (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA dissoziieren (s. Abbildung). Darüber hinaus konnte eine Konformationsänderung identifiziert werden, die der Dissoziation der Histone vorausgeht. Die bislang noch nicht beschriebene Konformation zeichnet sich dadurch aus, dass der Abstand vom H2A-H2B Dimer zu dem Bereich der DNA, an den das (H3-H4)₂ Tetramer bindet, vergrößert ist, während alle Histone noch unverändert an der DNA gebunden vorliegen. Die Erklärung für diesen Befund ist, dass sich die Grenzfläche zwischen dem H2A-H2B Dimer und dem (H3-H4)₂ Tetramer öffnet, noch bevor eine der Histonuntereinheiten von der DNA dissoziiert. Auch während der Assemblierung konnte diese Konformation nachgewiesen werden. Die Arbeit zeigt somit ein vollständiges Modell für die Dissoziation und Assemblierung von Nukleosomen.

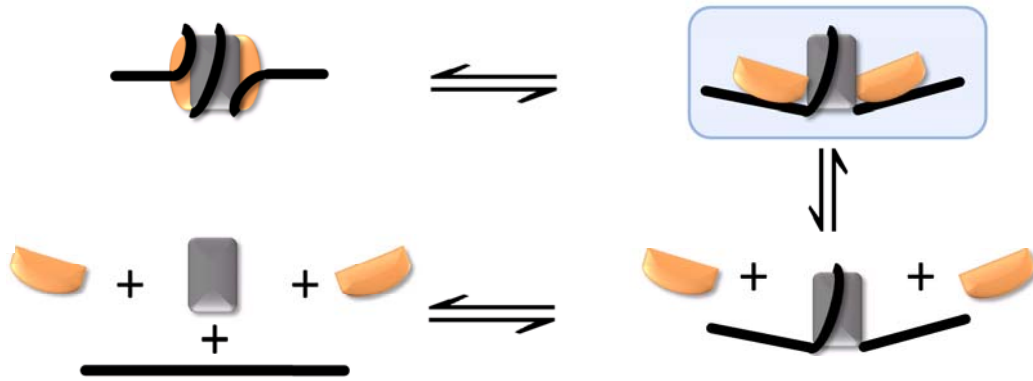


Abbildung: Modell für die Dissoziation und Assemblierung von Nucleosomen

Das Nucleosom ist schematisch dargestellt: die DNA (schwarz) ist annähernd zweifach um den Kern aus zwei H2A-H2B Dimeren (orange) und einem (H3-H4)₂ Tetramer (grau) gewickelt. Die offene Konformation, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnte, ist blau hinterlegt.

Aus den experimentellen Daten konnte extrapoliert werden, dass unter physiologischen Bedingungen bis zu 6 % der Nucleosomen in der offenen Konformation vorliegen. Es ist daher möglich, dass diese offene Konformation einen wichtigen Ausgangspunkt für viele Prozesse in der Zelle darstellt. Die zugängliche Oberfläche der Histone ist in dieser Konformation deutlich größer und Chaperone und Chromatin modifizierende Enzyme könnten so die Histone binden, die in intakten Nucleosomen im Proteinkern eingeschlossen vorliegen. Zugleich muss auch die DNA ihre Position auf den Histonen verändern, wenn sich die Grenzfläche von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer öffnet. Es ist davon auszugehen, dass sich im offenen Zustand die Basenpaare am Ende der nucleosomalen DNA, die in intakten Nucleosomen an das (H3-H4)₂ Tetramer gebunden sind, vom Proteinkern lösen und dass auch die DNA in der offenen Konformation zugänglicher ist.

Weiterhin konnte auch die Energie, die zum Öffnen der H2A-H2B Dimer/(H3-H4)₂ Tetramer Grenzfläche unter physiologischen Bedingungen nötig ist, abgeschätzt werden. Mit 2 – 3.5 kcal/mol liegt diese Energie unter der, die für Wechselwirkungen von Proteinen mit DNA charakteristisch ist (bis zu 15 kcal/mol). Im Vergleich zu der Dissoziation des H2A-H2B Dimer und des (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA stellt das Öffnen der Grenzfläche demnach eine geringe Energiebarriere dar. Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass Änderungen der Histonzusammensetzung deutliche Auswirkungen auf das Gleichgewicht zwischen offenen und intakten Nucleosomen haben und dadurch die Genaktivität regulieren.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit der Effekt analysiert, den eine Histonvariante auf die Dynamik von Nucleosomen hat. Dafür wurde die bislang am meisten untersuchte Variante H2A.Z gewählt, für die Hinweise auf eine Stabilisierung als auch Destabilisierung existieren. Mit der hier entwickelten Untersuchungsmethode konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Haupthistons durch diese Variante die thermodynamischen Eigenschaften beeinflusst, so dass bei der Dissoziation dieser Nucleosomen andere

Zwischenprodukte auftreten. Eine offene Konformation konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Die Regulation erfolgt demnach nicht, wie zunächst vermutet, lediglich durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen offenen und intakten Nucleosomen. Für die Dissoziation von Nucleosomen mit dieser Variante wurden zwei alternative Mechanismen vorgeschlagen, die mit den erhaltenen Messdaten übereinstimmen. Weitere Einzelmolekülfluoreszenz-Experimente werden in dieser Arbeit vorgeschlagen, um den Mechanismus und die Struktur der Zwischenprodukte vollständig aufzuklären.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode können wie an der Histonvariante H2A.Z exemplarisch gezeigt, grundsätzlich alle Histonvarianten und alle Modifikationen von Histonen untersucht werden. Diese Untersuchungen können einen signifikanten Beitrag dazu leisten, den Mechanismus zu verstehen, durch den die Histonzusammensetzung die Zugänglichkeit des Nucleosoms und letztendlich auch der nucleosomalen DNA kontrolliert. Dieses Verständnis ist notwendig, um phänomenologische Befunde deuten und letztendlich in die Genregulation von Nucleosomen eingreifen zu können.

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGEN UND VERWENDETE AUSDRÜCKE.....	VII
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
1.1 DNA.....	4
1.2 Das Nukleosom.....	6
1.3 Chromatin.....	8
1.4 Histoncode	10
1.5 Nukleosomen und Krebs	12
2 THEORIE	14
2.1 Lichtabsorption	14
2.2 Fluoreszenz.....	15
2.3 Förster-Resonanzenergietransfer	16
2.4 Anisotropie.....	19
2.5 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie	21
2.6 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	25

3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	29
3.1.1	Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien	29
3.1.2	Farbstoffe	29
3.1.3	DNA-Sequenzen	30
3.1.4	Geräte	32
3.1.5	Software	34
3.1.6	Puffer	38
3.2	Methoden.....	38
3.2.1	Präparation fluoreszenzmarkierter Nukleosomen	38
3.2.2	Thermische Mobilisierung von Nukleosomen.....	43
3.2.3	Gelelektrophorese	43
3.2.4	Absorptionsspektroskopie	45
3.2.5	Fluoreszenzanisotropiemessung.....	46
3.2.6	Einzelmolekülspektroskopie	47
4	BIOCHEMISCHE UND FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	54
4.1	Präparation fluoreszenzmarkierter Nukleosomen.....	54
4.1.1	DNA-Präparation	54
4.1.2	Oktamerpräparation	56
4.1.3	Nukleosomrekonstitution	62
4.2	Validierung der Proben	64
4.2.1	Nukleosomstruktur	64
4.2.2	Anisotropie der Fluorophore.....	65
4.2.3	Zählrate der Fluorophore.....	66
4.3	Zusammenfassung.....	67
5	EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER NUKLEOSOMEN	68

5.1	Öffnen des Nukleosoms	68
5.1.1	Experimenteller Ansatz	68
5.1.2	Optimierung der Messbedingungen	73
5.1.3	Öffnen des Nukleosoms untersucht durch FCS	77
5.1.4	Öffnen des Nukleosoms untersucht durch spFRET	79
5.1.5	Thermodynamische Analyse	83
5.1.6	Vergleich von FCS und spFRET Ergebnissen	88
5.1.7	Diskussion	90
5.2	Assemblierung des Nukleosoms	92
5.2.1	Reassemblierung	92
5.2.2	Austausch von H2A-H2B Dimeren zwischen Nukleosomen	96
5.2.3	Assemblierung des Nukleosoms untersucht durch FCS	97
5.2.4	Assemblierung des Nukleosoms untersucht durch spFRET	98
5.2.5	Vergleich von Experimenten zum Öffnen und zur Assemblierung	99
5.2.6	Diskussion	101
5.3	Einfluss des Einbaus der Histonvariante H2A.Z	102
5.3.1	Vergleich von Nukleosomen aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>X. laevis</i> mittels spFRET	102
5.3.2	Öffnen des Nukleosoms aus <i>S. cerevisiae</i> untersucht durch spFRET	104
5.3.3	Thermodynamische Analyse des Nukleosoms aus <i>S. cerevisiae</i>	106
5.3.4	Öffnen des Nukleosoms mit H2A.Z untersucht durch spFRET	108
5.3.5	Diskussion	111
6	ABSCHLIEßENDE DISKUSSION UND AUSBLICK	113
6.1	Abschließende Diskussion	113
6.2	Ausblick	119
6.2.1	Alternatives Markierungsschema für Nukleosomen	119
6.2.2	Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse und alternierende Laseranregung	120
6.2.3	Biologische Anwendung von spFRET	122
DANKSAGUNG		123
7	LITERATURVERZEICHNIS	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide als Primer für die Präparation der DNA-Fragmente	31
Tabelle 2: Einstellung des Typhoon Gel Scanners für die Detektion der Fluorophore	33
Tabelle 3: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Histone (89)	40
Tabelle 4: Zusammensetzungen der Lösungen für TAU Gele.....	44
Tabelle 5: Zusammensetzungen der Lösungen für native PAGE	45
Tabelle 6: Wellenlänge des Fluoreszenzabsorptionsmaximums und Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge für eingesetzte Fluorophore, DNA und Oktamere	46
Tabelle 7: Filter und Spiegel zur Detektion der Fluoreszenzemission von Alexa 488/594	49
Tabelle 8: Markierungsgrad der verwendeten DNA-Fragmente	55
Tabelle 9: Aufstellung der fluoreszenzmarkierten Oktamere	62
Tabelle 10: Anisotropie der Fluorophore	66
Tabelle 11: Interfluorophorabstand in den unterschiedlichen Nukleosomproben	70
Tabelle 12: Diffusionskoeffizienten von freiem H2A-H2B und an H2B markierten Nukleosomen	79
Tabelle 13: NaCl Konzentrationen, bei denen die FRET-Populationen auf 50 % gefallen sind	79
Tabelle 14: Anzahl der Ionenbindungen zwischen den Untereinheiten des Nukleosoms	85
Tabelle 15: NaCl Konzentrationen, bei denen die FRET-Population auf 50 % gefallen sind	105
Tabelle 16: Vergleich der Stabilität von Nukleosomen aus <i>X. laevis</i> und <i>S. cerevisiae</i>	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der DNA	5
Abbildung 2: Zentrales Dogma der Biologie.....	6
Abbildung 3: Aufbau des Nukleosoms	7
Abbildung 4: Sekundärstruktur der DNA	8
Abbildung 5: Modell für die Struktur von Chromatin im Zellkern	9
Abbildung 6: Jabloski Termschema	15
Abbildung 7: Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz	18
Abbildung 8: Absorptions- und Emissionsspektren von Alexa 488 und Alexa 594.....	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Anisotropiemessung.....	21
Abbildung 10: Strahlengang in einem konfokalen Mikroskop	22
Abbildung 11: Zusammenhang von Transfereffizienz und Proximity Ratio	24
Abbildung 12: Analyse der Fluoreszenzemission mittels Autokorrelation.....	25
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Laserfokus	26
Abbildung 14: Darstellung der Struktur der Farbstoffe a) Alexa 488, b) Alexa 594	29
Abbildung 15: Sequenz der verwendeten DNA-Fragmente	30
Abbildung 16: Darstellung der Struktur von 5-C6-Amino-2'desoxythymidin	32
Abbildung 17: Beispielhistogram der Proximity Ratio Verteilung einer Nukleosomprobe.....	37
Abbildung 18: Kupplungsreaktion zwischen dem Cystein im Histon und Alexa 488 Maleimid.....	41
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Mikroskopeinheit	48
Abbildung 20: Schematische Darstellung der markierten Positionen innerhalb der DNA-Fragmente..	54
Abbildung 21: Aufreinigung eines DNA-Fragments	55
Abbildung 22: Illustration der verschiedenen Oktamere mit zwei fluoreszenzmarkierten Histonen	57
Abbildung 23: Illustration der Oktamerverteilung bei Einsatz von 10 % markiertem Histon	57
Abbildung 24: Illustration der Nukleosomenverteilung bei Einsatz von 10 % markiertem Histon.....	58
Abbildung 25: Zusammensetzung der Probe in Abhängigkeit des Anteils von markiertem Histon	59
Abbildung 26: Präparation von Histonoktameren.....	61
Abbildung 27: Abnahme der NaCl Konzentration während der Dialyse	63
Abbildung 28: Vergleich der Nukleosompräparationen für Nukleosomen aus <i>S. cerevisiae</i>	63

Abbildung 29: Gelelektrophoretische Analyse der Nukleosomen	64
Abbildung 30: Zählrate der Fluorophore in Abhängigkeit der NaCl Konzentration	66
Abbildung 31: Darstellung der markierten Positionen innerhalb des Nukleosoms	69
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung eines Histogramms.....	70
Abbildung 33: Burstrate der verschiedenen Populationen einer spFRET Messungen.....	71
Abbildung 34: spFRET Analyse intakter Nukleosomen	72
Abbildung 35: Effekt von Nonidet P40 auf die Adsorption der Probe an die Oberfläche	74
Abbildung 36: Abnahme der FRET-Population mit der Zeit.....	77
Abbildung 37: Diffusionskoeffizienten der Nukleosomuntereinheiten während der Dissoziation	78
Abbildung 38: Abnahme der FRET-Populationen mit der NaCl Konzentration.....	80
Abbildung 39: Anzahl der Ionenbindungen zwischen den Untereinheiten des Nukleosoms	85
Abbildung 40: Einfluss der Konzentration in FCS vs. spFRET	89
Abbildung 41: Modell für das Öffnen des Nukleosoms	90
Abbildung 42: Schematische Darstellung der Experimente zur Reassemblierung.....	93
Abbildung 43: Anteil der FRET-Population bei verschiedenen Nukleosomenkonzentrationen	94
Abbildung 44: Anstieg der FRET-Population bei Verdünnung zu geringerer NaCl Konzentration	95
Abbildung 45: Austausch von H2A-H2B Dimeren zwischen Nukleosomen.....	96
Abbildung 46: Diffusionskoeffizienten der Untereinheiten während der Assemblierung	97
Abbildung 47: Anstieg der FRET-Population während der Rekonstitution	99
Abbildung 48: spFRET Vergleich von Nukleosomen aus <i>X. laevis</i> und <i>S. cerevisiae</i>	103
Abbildung 49: Abnahme der FRET-Population mit der NaCl Konzentration.....	105
Abbildung 50: Anzahl der Ionenbindungen zwischen Dimer und DNA/Tetramer	106
Abbildung 51: Abnahme der FRET-Population für Nukleosomen aus <i>X. laevis</i> und <i>S. cerevisiae</i>	108
Abbildung 52: Abnahme der FRET-Population für Nukleosomen mit H2A.Z.....	109
Abbildung 53: Alternative Modellvorschläge für das Öffnen von Nukleosomen mit H2A.Z	112
Abbildung 54: Nukleosomen für spFRET Messungen zwischen den H2A-H2B Dimeren	120

Abkürzungen und verwendete Ausdrücke

A	Extinktion (Absorbanz)
AOTF	akustooptisch einstellbaren Filter
APD	Avalanche Photodiode
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
Burst	engl. ‚Häufung‘, große Zahl an Photonen mit kurzer Interphotonenzeit, entstehen bei Transit eines fluoreszenzmarkierten Teilchens durch den Laserfokus
C	Cystein
c	Konzentration
D	Diffusionskoeffizient
DC	Dichroitischer Spiegel
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. ‚deoxyribonucleic acid‘)
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
E	Glutaminsäure
ϵ	dekadischer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (engl. ‚fluorescence correlation spectroscopy‘)
FPLC	schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (engl. ‚Fast Protein Liquid Chromatography‘)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. ‚High Performance Liquid Chromatography‘)
K	Gleichgewichtskonstante
k_B	Boltzmann Konstante
nm	Nanometer
Nonidet P40	Octylphenoxyethoxyethanol
MWCO	Ausschlussgrenze für das Molekulargewicht (engl. ‚molecular weight cut off‘)
P	Proximity Ratio
p.A.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. ‚polymerase chain reaction‘)
PTM	Posttranslationale Modifikation (engl. ‚post-translational modifications‘)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. ‚rounds per minute‘)
Proximity ratio	Größe, die die Effizienz des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor beschreibt, allerdings noch gerätespezifische Parameter enthält
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ‚ribonucleic acid‘)
RT	Raumtemperatur
σ	Korrekturfaktor für die direkte Anregung des Akzeptorfluorophors
sec	Sekunde
spFRET	Einzelmolekül-FRET (engl. ‚single pair‘ FRET)
T	Threonin
TAU-Gel	Triton-Acetat-Harnstoff Gel (engl. ‚Triton Acetate Urea gel‘)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX 100	t-Octylphenoxypropoxyethanol
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht (engl. ‚Ultraviolet-visible‘)
v/v	Volumen pro Volumen (engl. ‚volume per volume‘)
ω	Korrekturfaktor für das Übersprechen der Donoremission
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. ‚weight per volume‘)
wt	Wildtyp

1 Einleitung und Fragestellung

In allen Lebewesen ist die gesamte genetische Information in einem polymeren Molekül gespeichert, der DNA. Sie enthält den Bauplan für alle Proteine, die für die Entwicklung und das Funktionieren eines Organismus nötig sind. In menschlichen Zellen beträgt die Gesamtlänge der DNA ungefähr zwei Metern, wobei sie in einem Zellkern mit einem Durchmesser von einigen Mikrometern vorliegt. Dies macht deutlich, dass die DNA stark komprimiert werden muss. Eine der entscheidenden Fragen in der Biologie ist, wie der Zugang der zellulären Maschinerie zu der DNA trotz der Komprimierung gewährleistet werden kann, so dass die essentiellen Prozesse wie die Transkription, in denen DNA als Vorlage dient, ablaufen können. Dabei muss reguliert sein, dass die Informationen nur, wenn sie auch benötigt werden, abgelesen werden. Die Lösung dieses Problems liegt in der Struktur, die die DNA in der Zelle einnimmt.

Die Komprimierung der DNA wird mithilfe von Proteinen erreicht, die die DNA in dem sogenannten Chromatin organisieren (1). In dieser Arbeit wird die kleinste sich wiederholende strukturelle Einheit des Chromatins untersucht, das Nukleosom. Darin ist die DNA annähernd zweifach um einen Kern aus Proteinen, den Histonen, gewickelt (2). Der Histokern ist selbst aus drei Untereinheiten zusammengesetzt: einem Tetramer aus den Histonen H3 und H4 ((H3-H4)₂ Tetramer) und zwei identischen Dimeren aus den Histonen H2A und H2B (H2A-H2B Dimer). Einzelne Nukleosomen liegen wie die Perlen einer Kette nebeneinander auf der DNA (3), wobei diese Kette auch durch Wechselwirkungen der Nukleosomen zu stärker komprimierten Strukturen gefaltet werden kann.

Neben der Komprimierung der DNA können Nukleosomen auch die zweite, entscheidende Aufgabe erfüllen: sie regulieren den Zugang zur auf der DNA gespeicherten Information. Insbesondere durch die Dissoziation und Assemblierung von Nukleosomen kann reguliert werden, dass zu jeder Zeit die richtige Information abgelesen wird. Dabei spielen speziell Histone eine besondere Rolle. Die Aktivität eines DNA-Abschnitts kann signifikant beeinflusst werden, indem nach der Assemblierung der Nukleosomen die Histone modifiziert oder durch alternative Histonvarianten ersetzt werden. Über die molekularen Details der Dissoziation und Assemblierung von Nukleosomen, sowie über die Wirkungsweise der alternativen Histone ist bislang wenig bekannt.

Viele Untersuchungen beschäftigten sich damit, wie Nukleosomen aus den einzelnen Bestandteilen, den Untereinheiten des Proteinkerns und der DNA, gebildet werden und wie sie dissoziieren. *In vivo* werden sie durch Chromatinassemblierungsfaktoren und Histonchaperone assembliert, die die Komponenten in der richtigen Reihenfolge und Orientierung zusammenbringen und gleichzeitig unerwünschte Wechselwirkungen

verhindern (4). Der Abbau wird durch Chromatinremodellierungsfaktoren gesteuert, wobei Histonchaperone ebenfalls involviert sein können (5). Der Mechanismus dieser Reaktionen ist bislang weitgehend unbekannt. Auch mechanische Kräfte, die auf die DNA wirken, können zur Dissoziation von Nukleosomen beitragen (6).

In vitro beeinflusst die Ionenstärke des Mediums die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen (7). In zahlreichen Studien wird das ausgenutzt, um die Aktivität von Assemblierungs- und Remodellierungsfaktoren zu imitieren und den Auf- und Abbau von Nukleosomen zu untersuchen. Nukleosomen, die bei physiologischen Konzentrationen stabil sind, werden durch Erhöhung der Ionenstärke dissoziiert. Andererseits können Nukleosomen assembliert werden, wenn man in Anwesenheit aller einzelnen Komponenten die Ionenstärke von 2 M NaCl zu physiologischen Konzentrationen (150 – 300 mM NaCl) reduziert (7).

Während bekannt ist, dass bei der Assemblierung zunächst das (H3-H4)₂ Tetramer und erst in einem zweiten Schritt die H2A-H2B Dimere an die DNA binden (8), ist der Mechanismus der Dissoziation umstritten und zwei alternative Mechanismen werden diskutiert. Der eine besagt, dass der Proteinkern in mehreren Schritten zerfällt und zunächst die H2A-H2B Dimere von der DNA dissoziieren (9,10), der andere, dass sich der Proteinkern als eine Einheit von der DNA löst (11-14). Viele theoretische Arbeiten nehmen letzteren als Ausgangspunkt, obwohl ein direkter Beweis noch aussteht (15,16). Unabhängig von dem tatsächlich auftretenden Mechanismus ist davon auszugehen, dass bei der Assemblierung und der Dissoziation von Nukleosomen Zwischenprodukte auftreten, die bedeutende Auswirkungen auf die Funktion von Chromatin haben können. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nur wenig über die Struktur dieser Zwischenprodukte bekannt.

In den letzten Jahrzehnten konnten durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen viele Erkenntnisse über die Struktur der Nukleosomen gewonnen werden. Besonders der Einsatz von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), einer Methode, um den Abstand zwischen zwei Fluorophoren in einem makromolekularen Komplex zu bestimmen, hat sich als wertvolles Mittel erwiesen, da der Abstand, über den Energietransfer stattfinden kann (1 - 10 nm), in der Größenordnung des Nukleosoms liegt (17,18).

Noch bevor die Kristallstruktur des Nukleosoms gelöst wurde, wurden erste FRET-Messungen an Nukleosomen durchgeführt und so der Aufbau des Nukleosoms untersucht (19). Doch auch noch heute, da die Struktur auf atomarer Ebene bekannt ist, ist FRET ein wichtiges Werkzeug. Die Kristallstrukturen stellen einen eingefrorenen Zustand eines ansonsten dynamischen Systems dar. Dies wird besonders bei der Betrachtung von Nukleosomen deutlich, die Histonvarianten enthalten. Ihre Kristallstrukturen unterscheiden sich erstaunlich wenig von denen der Nukleosomen aus nur Haupthistonen, und die großen

funktionellen Unterschiede, die *in vivo* auftreten, sind nicht durch Betrachten der Struktur zu erklären (20). Weiterhin sind manche Regionen, wie die an die Nukleosomen angrenzende DNA und die flexiblen Enden der Histonproteine, nicht in der Kristallstruktur enthalten. Mittels FRET konnte gezeigt werden, dass die beiden an die Nukleosomen angrenzenden DNA-Fragmente sich mit zunehmendem Abstand von dem Proteinkern voneinander entfernen (21,22). Sie können jedoch von weiteren Proteinen, sogenannte Linkerhistonen, zusammengeführt werden, wodurch die Nukleosomen stabilisiert werden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass sich die Enden der nukleosomalen DNA zeitweise von der Histonoktameroberfläche ablösen (sog. ‚breathing‘) und die terminalen Regionen der DNA in Nukleosomen für die zelluläre Maschinerie zugänglicher sind (23).

Diese Beispiele machen die Bedeutung von FRET für die Untersuchung der Dynamik von Nukleosomen deutlich. Ein weiterer Durchbruch wurde durch Verwendung von Einzelmolekültechniken erzielt. Während bei den zuvor durchgeführten Untersuchungen an Molekülensembles immer der Mittelwert aller Nukleosomen bestimmt wird, lassen sich durch Untersuchungen an einzelnen Molekülen die individuellen Eigenschaften der am System beteiligten Moleküle analysieren. Dies ist besonders wichtig in Systemen wie Nukleosomen, die heterogen zusammengesetzt sind oder in denen zeitliche Fluktuationen auftreten. So konnten mit spFRET Zeitkonstanten für das ‚breathing‘ der DNA-Termini bestimmt werden (24-26). Viele Studien befassen sich auch mit dem Einfluss der DNA-Sequenz und von Acetylierung der Histone auf die Stabilität von Nukleosomen (27-29). Auch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), eine Methode die Diffusion fluoreszenzmarkierter Moleküle zu untersuchen, hat zum Verständnis der Dynamik von Nukleosomen beigetragen (30,31). Ein besonders eleganter Ansatz, die Kombination von FCS mit spFRET, wurde für die bislang detaillierteste Untersuchung der Dissoziation von Nukleosomen verwendet (32). Dies hat gezeigt, dass ein Teil des Nukleosoms, vermutlich ein H2A-H2B Dimer, zuerst von dem übrigen Komplex abdissoziiert.

In allen bisherigen Untersuchungen an einzelnen Nukleosomen waren die Fluorophore immer an die DNA gebunden, da sich auf diese Art eine einzelne Markierung an eine spezifische Position bringen lässt. An den Histonen wurden keine Markierungen vorgenommen, da jedes Histon zweifach im Proteinkern vorliegt, und die spezifische Markierung eines Histons nicht möglich ist. Dies hat allerdings zur Folge, dass wenig über die Dynamik im Proteinkern bekannt ist. In dieser Arbeit wurde erstmals Nukleosomen, in denen Histone mit Fluorophoren markiert waren, für die Einzelmolekülspektroskopie verwendet. Erst vor kurzem wurde eine andere Untersuchung an einzelnen Nukleosomen veröffentlicht, in denen ebenfalls fluoreszenzmarkierte Histone eingesetzt wurden (33). Allerdings wurde dabei nicht

die Dynamik des Histonkerns verfolgt, sondern die Verschiebung der DNA durch Histonremodellierungsfaktoren auf der Histonoberfläche.

In der hier vorliegenden Arbeit werden Nukleosomen mit fluoreszenzmarkierten Histonen dazu verwendet, die Dissoziation und die Assemblierung von Nukleosomen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die Verwendung von Einzelmolekülfluoreszenz erlaubt die Charakterisierung von Zwischenprodukten, die in Hinblick auf das Verständnis der Regulation von großer Bedeutung sind. Es wird ebenfalls analysiert, wie sich die Stabilität und die Dynamik eines Nukleosoms durch den Austausch eines Histons gegen eine Histonvariante verändert.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst beschrieben, wie die genetische Information in der DNA gespeichert ist und wie diese im Zellkern vorliegt. Dabei wird besonders der Aufbau der Nukleosomen detailliert dargelegt. Anschließend wird zusammengefasst, was über die Funktionsweise von Histonmodifikationen und Histonvarianten bis heute bekannt ist. Im letzten Abschnitt wird der Einfluss dieser Faktoren bei der Krankheit Krebs erläutert und so die praktische Relevanz des Verständnisses dieser Prozesse verdeutlicht.

1.1 DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger der genetischen Informationen in allen lebenden Organismen. Alle Anleitungen, die für die Synthese von Biomolekülen, wie Proteinen, für das Wachstum von Zellen und das Ausbilden von spezialisierten Strukturen in höheren Organismen nötig sind, sind in der DNA gespeichert. Bereiche, die diese Informationen enthalten, werden als Gene bezeichnet. Die übrigen Bereiche der DNA (nichtkodierende DNA) haben strukturelle, regulatorische und vermutlich weitere, bislang unbekannte Funktionen.

Der kleinste Baustein der DNA ist ein Nukleotid. In einem Nukleotid ist eine aromatische Base wie in Abbildung 1 dargestellt kovalent an eine Desoxyribose gebunden, die an der 5' Position phosphoryliert ist. In Nukleotiden sind vier verschiedene Basen vertreten: Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Über Phosphorsäurediester zwischen der 5' und 3' Position der Desoxyribosen sind die Nukleotide zu Polymeren verbunden. Dadurch erhält das DNA-Molekül eine Polarität. Zwei DNA-Moleküle lagern mit entgegengerichteter Polarität aneinander, so dass die Basen der gegenüberliegenden Stränge Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Die Sequenz der Stränge ist dabei nicht voneinander unabhängig. Jede Base in einem DNA-Strang ist mit der komplementären Base im anderen Strang durch Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft. Adenin ist komplementär zu Thymin, und Guanin ist komplementär zu Cytosin. Komplementäre Basen zeichnen sich durch

besonders stabile Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Basen benachbarter Nukleotide werden zusätzlich durch Stapelwechselwirkung (engl. ‚base stacking‘) stabilisiert. Die Phosphate und die Desoxyribosen sind nach außen gerichtet und bilden das Rückgrat der DNA-Stränge. Die resultierende dreidimensionale Struktur ist eine rechtsgängige Doppelhelix, in der die DNA-Stränge umeinander gewunden sind. Drei verschiedene Strukturen der DNA sind bekannt, die A-DNA, B-DNA und die Z-DNA. Unter physiologischen Bedingungen liegt die B-Form der DNA vor. Der Durchmesser der DNA beträgt dabei 2 nm. Die Basenpaare sind im Abstand von 0,34 nm entlang der Helixachse gestapelt, wobei eine Helixwindung 10,5 Basenpaare (bp) enthält.

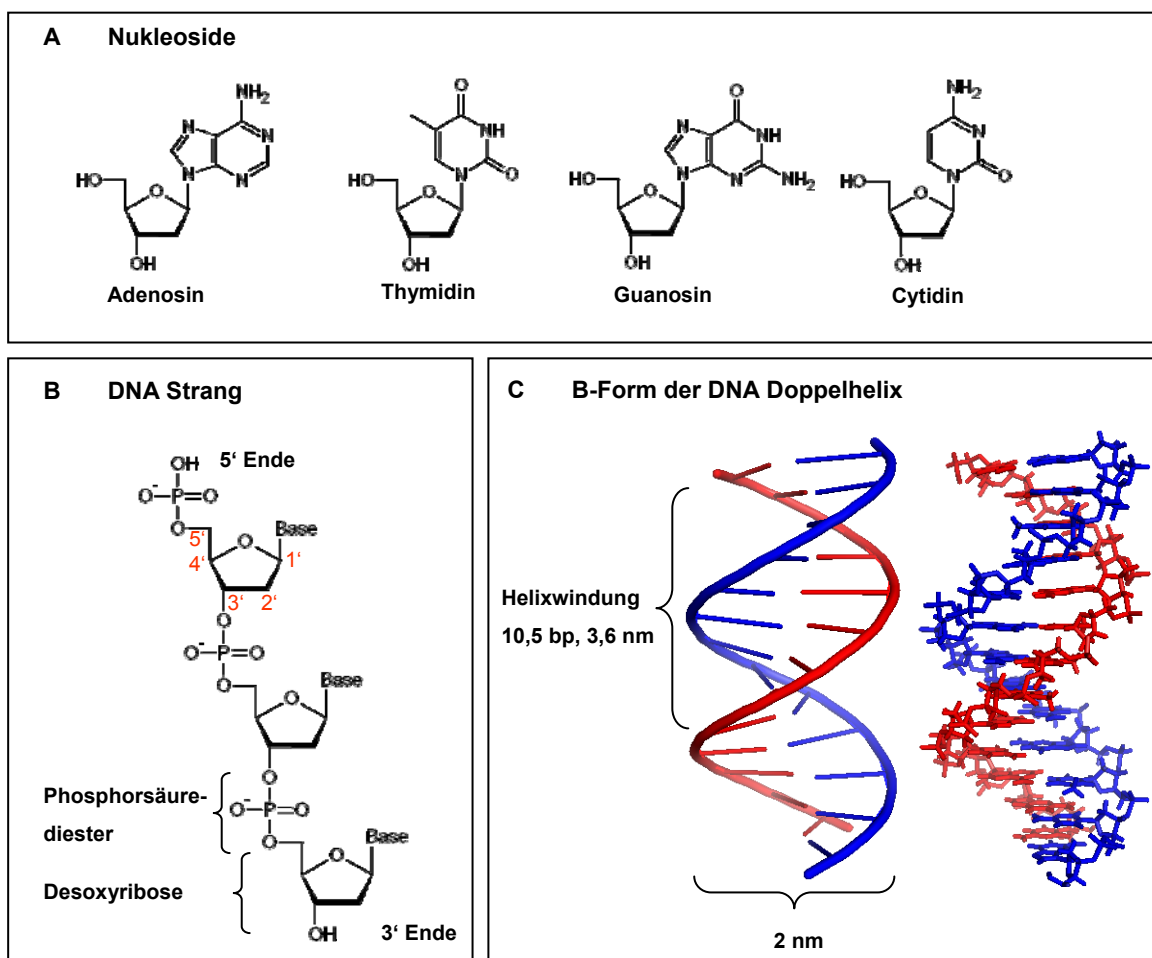


Abbildung 1: Aufbau der DNA

A) 2'-Desoxyribose ist an der 1' Position über eine glykosidische Bindung mit einer Base, entweder Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin, verbunden. Der Name des resultierenden Nukleosids ist unter der entsprechenden Struktur angegeben. Durch Phosphorylierung der 5' Position der Desoxyribose entstehen Nukleotide. B) Die Nukleotide werden über Phosphorsäurediesterbindungen zu polymeren DNA-Strängen verbunden. Die Bindungen werden immer zwischen der 5' und 3' Position der Desoxyribose gebildet. So erhält der DNA-Strang eine Polarität. C) Zwei DNA-Stränge (dargestellt in blau und rot) lagern mit entgegengerichteter Polarität aneinander. Adenin bildet mit Thymin und Guanin mit Cytosin stabile Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Abmessungen der B-Form der DNA sind in der Abbildung angegeben.

Die Information auf der DNA wird von Enzymen (RNA Polymerasen) abgelesen, die den Doppelstrang aufbrechen und eine fast identische Kopie des Moleküls, die Ribonukleinsäure (RNA), produzieren. Dieser Prozess wird Transkription genannt. Die RNA kann selbst strukturelle und katalytische Funktionen ausüben oder der Zelle als Vorlage für die Synthese von Proteinen dienen (Schema s. Abbildung 2). Die Abfolge von Basen in den Nukleotiden der DNA und dementsprechend die Abfolge von Basen der RNA enthält dabei die Information, in welcher Reihenfolge die Aminosäuren aneinander gebunden werden. Eine Sequenz von drei Basen kodiert dabei für eine von den 20 in Proteinen vorkommenden Aminosäuren.

Die Zugänglichkeit der DNA für die RNA-Polymerasen ist von zentraler Bedeutung für das Funktionieren einer Zelle. Darüber kann reguliert werden, welche RNA und welche Proteine zu einer bestimmten Zeit in der Zelle vorhanden sind.

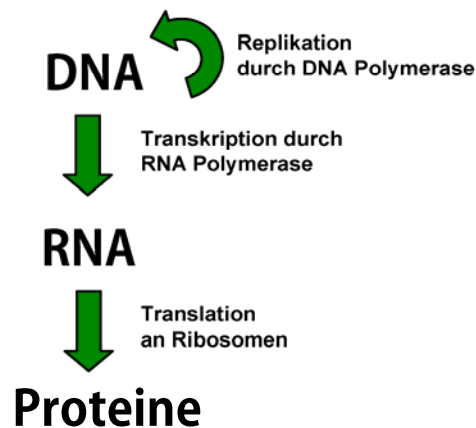


Abbildung 2: Zentrales Dogma der Biologie

1958 formulierte Francis Crick eine bis heute gültige Hypothese über den möglichen Informationsfluss zwischen den Biopolymeren DNA, RNA und Protein. DNA ist der Speicher aller genetischen Informationen (34). Für die Teilung von Zellen wird die DNA von DNA Polymerasen dupliziert (Replikation). RNA Polymerasen synthetisieren nach der Vorlage der DNA RNA-Moleküle, die die gleiche Sequenzinformation wie die zugrunde liegende DNA enthalten (Transkription). Diese dienen den Ribosomen, RNA-Molekülen mit katalytischer Aktivität, als Vorlage für die Synthese von Proteinen. Die Abfolge von drei Nukleotiden auf der DNA und auf der RNA codiert dabei für eine von 20 in Proteinen vorliegenden Aminosäuren.

1.2 Das Nukleosom

Alle Lebewesen, deren Zellen in Kompartimente aufgeteilt sind, werden als Eukaryoten bezeichnet. In diesen Lebewesen befindet sich die DNA im Zellkern. Dabei liegt sie nicht einfach ausgestreckt vor, sondern ist sehr strukturiert. In der ersten Ebene ist DNA von ~ 150 bp Länge annähernd zweifach um ein Oktamer aus Histonproteinen (H2A, H2B, H3 und H4) gewunden und bildet ein Nukleosom (1). Histone sind evolutionär alte Proteine, und

die Aminosäuresequenz ist zwischen verschiedenen Eukaryoten hoch konserviert (35). Sie unterscheiden sich von übrigen Proteinen durch ihren hohen Anteil an den Aminosäuren Lysin und Arginin (36). Unter physiologischen Bedingungen liegen sie daher positiv geladen vor und können die negative Ladung der DNA ausgleichen. Die Akteure im Histonoktamer, dem Kern des Nukleosoms, sind nicht die Histone an sich, sondern die Oligomere, die aus ihnen gebildet werden. H2A und H2B formen ein Dimer, je zwei H3 und zwei H4 formen ein Tetramer (37). Das $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer bindet die zentralen 60 bp der DNA, die zwei H2A-H2B Dimere die 30 bp zu den Enden der nukleosomalen DNA hin. Die letzten 10 bp binden an die N-terminale Region des Histons H3, die nicht in das $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer eingebaut ist, sondern unstrukturiert darüber hinaus ragt.

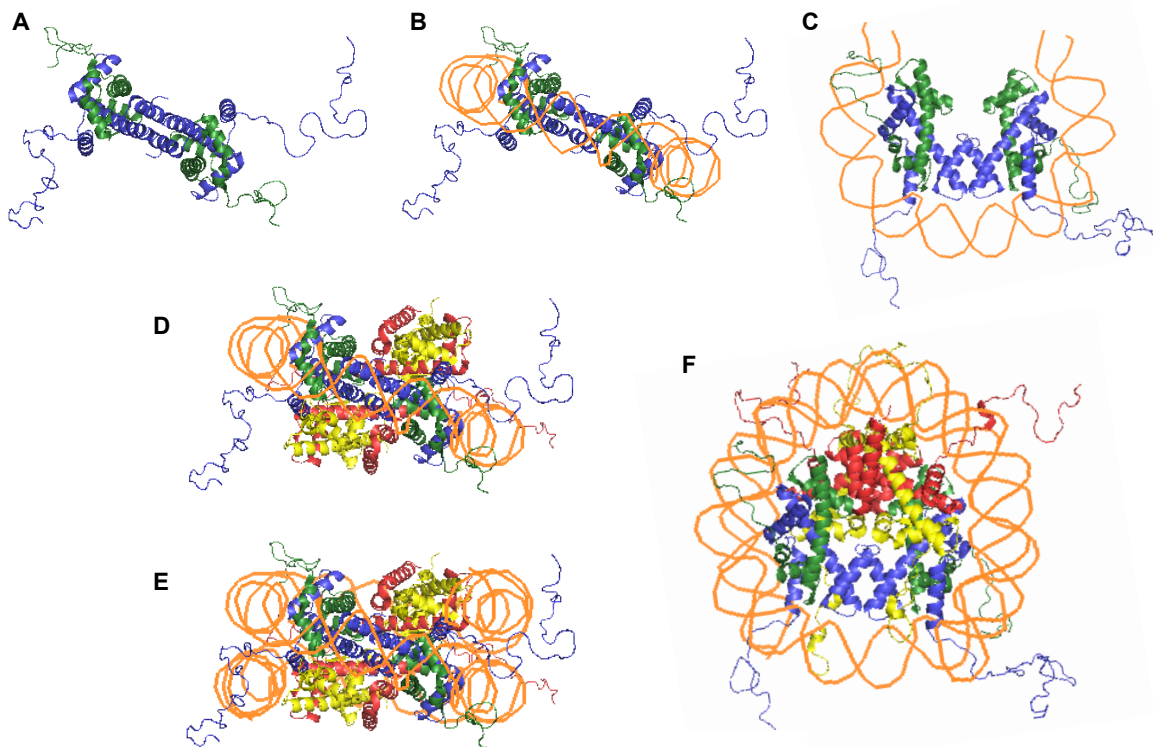


Abbildung 3: Aufbau des Nukleosoms

H2A ist in gelb, H2B in rot, H3 in blau und H4 in grün dargestellt. Das $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer (A) organisiert die zentralen 60 bp der DNA (B und C). Oberhalb und unterhalb der Ebene, die durch das Tetramer aufgespannt wird, binden die zwei H2A-H2B Dimere (D). Sie binden je 30 bp der DNA. Die Enden der nukleosomalen DNA (10 bp) werden durch H3 an das $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer gebunden (E). Die Aufsicht auf das Nukleosom ist in (F) dargestellt.

Die Energie, die für die Krümmung der DNA erforderlich ist, wird durch die Ausbildung von Bindungen zwischen der DNA und den Histonen an 14 unabhängigen DNA-Bindestellen aufgebracht. Die Bindungen sind hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den

Amiden der Proteinkette und den Phosphaten des DNA-Rückgrats. Zusätzlich werden Ionenbindungen zwischen den basischen Seitenketten der Histone und der DNA ausgebildet.

Von Nukleosomen aus Histonen verschiedener Organismen sind die Kristallstruktur bekannt. Sie zeigen, dass sich die allgemeine Struktur bemerkenswert wenig unterscheidet (2,38-40), was darauf hindeutet, dass die Funktion des Oktamers auf der Ebene der Histon-DNA-Wechselwirkungen in den verschiedenen Organismen identisch ist.

1.3 Chromatin

In vivo wird die an Nukleosomen angrenzende DNA von sog. Linkerhistonen, H1 und H5, gebunden. Die Enden der DNA werden auf diese Art zusammen gebracht; so wird eine weitere Komprimierung der DNA Struktur erreicht (41). Die resultierende Struktur wurde nach ihrem Aussehen ‚beads on a string‘ (engl. für Perlen auf einer Kette) genannt (Abbildung 4) (3,42). Unter physiologischen Bedingungen kann sich DNA mit Nukleosomen um sich selbst winden und eine Sekundärstruktur bilden, die als 30 nm Fiber bezeichnet wird. Während die Struktur des Nukleosoms auf atomarer Ebene gelöst wurde, ist bislang erstaunlich wenig über die weitere Komprimierung zur Sekundärstrukturen bekannt. Eine Vielzahl sich teilweise widersprechender Modelle wurde hierfür entwickelt. Sie können im Wesentlichen in zwei Klassen eingeteilt werden: das Solenoidmodell und das Zickzack-Modell (43).

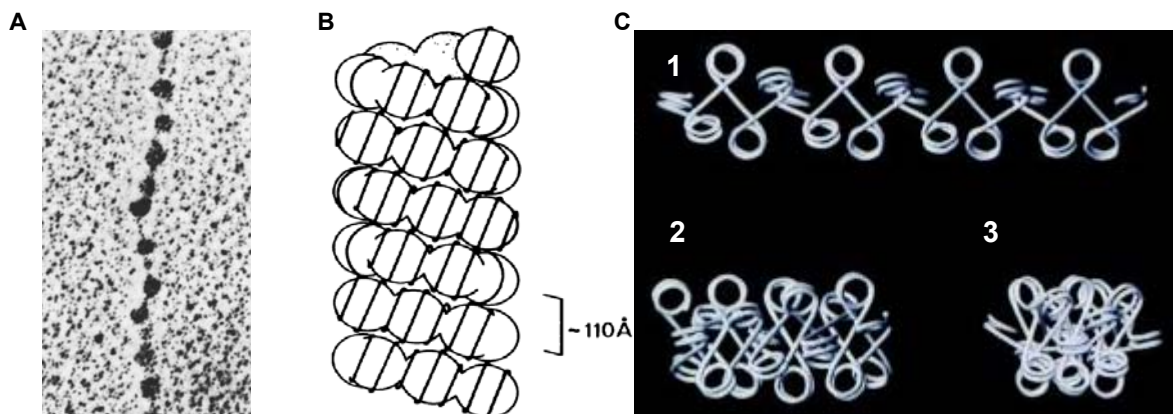


Abbildung 4: Sekundärstruktur der DNA

A) Bei niedrigen Ionenstärken liegen einzelne Nukleosomen perlenkettenartig auf der DNA (elektronenmikroskopische Aufnahmen aus (42)). Unter physiologischen Bedingungen im Zellkern wird die DNA weiter zu einer 30 nm breiten Fiber komprimiert. Deren molekulare Details sind noch nicht bekannt. Die diskutierten Modelle lassen sich in zwei Klassen unterteilen. B) In dem Solenoidmodell sind die Nukleosomen spulenartig gestapelt (Darstellung übernommen aus (44)). C) In dem Zickzack-Modell liegen die Nukleosomen sich in der Fiber gegenüber und die Linker-DNA überkreuzt sich im Zentrum der Struktur. Die Komprimierung ist von der Ionenstärke abhängig. Dargestellt ist das Modell bei 5, 15 und 80 mM Konzentration von monovalenten Ionen. Abbildung übernommen aus (41).

In dem Solenoidmodell sind auf der DNA benachbarte Nukleosomen aufeinander gestapelt und spulenartig angeordnet. Die DNA Linker müssen dabei stark gekrümmt vorliegen (44). Im Zickzack-Modell liegen auf der DNA benachbarte Nukleosomen an gegenüberliegenden Seiten der Fiber, und die ausgestreckten DNA Linker überkreuzen sich im Zentrum der Fiber (41,45). Auch wenn kein Modell ausgeschlossen werden kann und eine Heterogenität der Struktur von Chromatin im Zellkern wahrscheinlich ist, sprechen viele experimentelle Befunde für das Vorliegen einer Zickzack Struktur (46-48).

Indem die DNA um den Histonkern gewunden wird, wird eine siebenfache Komprimierung erreicht. Die Faltung der 30 nm Fiber verkürzt die Länge der DNA um den Faktor 40 (49). Offensichtlich ist eine weitere Komprimierung der DNA von zwei Metern Länge nötig.

Man hat gefunden, dass DNA-bindende Proteine die 30 nm Fiber in Schleifen von 20 000 bis 80 000 bp zusammenlegen (50). Diese Proteine erkennen und binden vermutlich spezifisch bestimmte DNA-Sequenzen. Es ist allerdings nicht bekannt, wie diese Struktur noch weiter komprimiert wird. Nur in einer kurzen Phase während der Zellteilung können durch Mikroskopie weitere Strukturen sichtbar gemacht werden. Ein Modell, das erklärt, wie die weitere Komprimierung während des Großteils des Zellzyklus erreicht wird, ist in Abbildung 5 dargestellt.

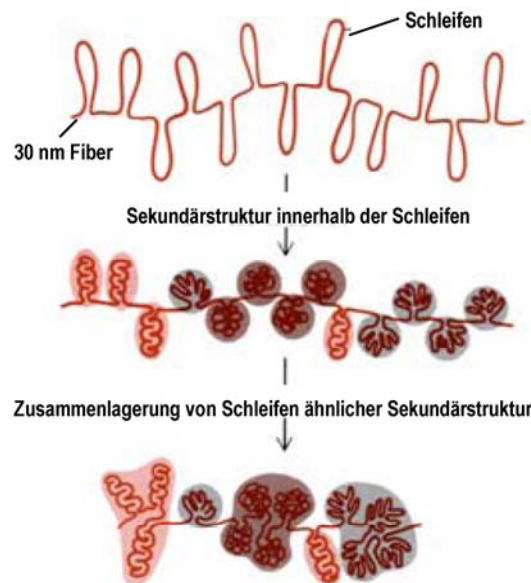


Abbildung 5: Modell für die Struktur von Chromatin im Zellkern

DNA bindende Proteine führen Schleifen in die 30 nm Fiber ein. In diesen Schleifen bilden sich weitere Strukturen aus. Schleifen mit ähnlicher Sekundärstruktur werden aneinander gelagert. (Darstellung aus (36) übernommen und angepasst.)

Allerdings muss bei dieser Betrachtung berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Bereiche des Chromatins unterschiedliche Packungsformen haben können. Diese unterschiedlichen Strukturen haben einen Einfluss auf die Genexpression (36). Beim

Anfärben von Zellen können zwei Klassen von Chromatin unterschieden werden: Heterochromatin, das wegen seiner komprimierteren Form dunkler gefärbt wird, und das diffuse Euchromatin. Dabei ist das Euchromatin, das die weniger komprimierte Struktur einnimmt, genreich und wird stark transkribiert. Das komprimierte Heterochromatin enthält wenige Gene und wird nicht transkribiert.

1.4 Histoncode

1964 wurde entdeckt, dass in machen Regionen des Chromatins die Nukleosomen acetylierte Histone enthalten, und dass in diesen Regionen die DNA stärker transkribiert wird (51,52). Der Grund hierfür blieb lange unbekannt. Erst 1986 mit der Entwicklung von Antikörpern gegen acetylierte Histone konnte gezeigt werden, dass es entscheidend ist, welche Aminosäure in dem Oktamer acetyliert wird. Es wurde postuliert, dass Enzyme existieren, die spezifisch an diese Nukleosomen binden und daraufhin auf die Nukleosomen und die DNA wirken (53,54). 1996 wurde das erste dieser Enzyme, p300/CBP, identifiziert (55).

In der nachfolgenden Zeit wurden viele Enzyme entdeckt, die Acetylierungen und auch weitere Modifikationen wie Phosphorylierungen, Ubiquitinylierungen und Methylierungen an spezifischen Positionen der Histone einführen. Zusammen werden diese Modifikationen unter posttranslationale Modifikationen (engl. ‚post-translational modifications‘, PTMs) zusammengefasst. Für die meisten PTMs konnten Enzyme identifiziert werden, die spezifisch an die jeweiligen Histone binden (Übersicht in (56)). Die Enzyme verfügen in der Regel über Bindedomänen, deren Strukturen über verschiedene Spezies gut konserviert sind, wie die Bromodomäne für acetylierte Histone (57). Bei der Vielzahl von in der Zelle vorliegenden Enzymen war es nicht überraschend, dass nicht nur die Transkription, sondern auch weitere DNA-abhängige Prozesse, wie Replikation und DNA-Reparatur, durch PTMs beeinflusst werden (58).

In Übereinstimmung damit, dass die Histonmodifikationen von externen Faktoren gebunden werden, liegen die meisten Histonmodifikationen in den ungeordneten terminalen Regionen der Histonproteine vor. Diese sind nicht in den Proteinkern eingebaut, sondern reichen über das Nukleosom hinaus. Es treten allerdings auch Modifikationen von Histonen auf, die in den im Oktamer eingeschlossenen Regionen liegen, so dass es unwahrscheinlich ist, dass diese PTMs ebenfalls externe Proteinfaktoren binden können (59). Allerdings wurde auch für diese PTMs ein Einfluss auf DNA-abhängige Prozesse nachgewiesen. Dies macht deutlich, dass PTMs über verschiedene Wirkungsmechanismen DNA-abhängige Prozesse beeinflussen können. Nur von wenigen dieser PTMs ist der Effekt auf molekularer Ebene bekannt. Der

Einfluss auf die Zugänglichkeit der DNA ist in diesen Fällen entscheidend, und ein signifikanter Effekt auf die Dynamik der Nukleosomen und/oder auf die Komprimierung von Chromatin konnte nachgewiesen werden (60-63). So stört zum Beispiel die Acetylierung von H4 an Lysin 16 die Wechselwirkungen der Nukleosomen untereinander und erhält Chromatin dadurch in einem offenen Zustand (61).

1977 wurde entdeckt, dass die ursprünglich als unveränderlich angenommenen Histonproteine nicht nur durch PTMs verändert werden können, sondern dass auch verschiedene Varianten der Histonproteine in der Zelle vorliegen (64). Die Aminosäuresequenz der Histonvarianten ist, wie auch die der Haupthistone, zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert. Histonvarianten und Haupthistone zeigen allerdings deutliche Sequenzunterschiede. Während die Haupthistone exprimiert werden, wenn die DNA in einer Zelle dupliziert wird und die neu entstandene DNA um Histone gewunden werden muss, werden die meisten Histonvarianten während des ganzen Zellzyklus exprimiert und nachträglich in das Chromatin eingebaut (65). Dabei findet man Häufungen bestimmter Varianten zu bestimmten Zeitpunkten oder in bestimmten Regionen im Chromatin (66). Es wird angenommen, dass PTMs regulieren, an welchen Stellen die Histonvarianten eingebaut werden.

Für viele Histonvarianten konnte bereits gezeigt werden, dass sie DNA-abhängige Prozesse regulieren (67). Auf welche Art und in welchem Ausmaß die Histonvarianten ihre regulatorischen Funktionen ausüben, ist noch weitgehend unbekannt. Wie die Histonmodifikationen können sie Enzyme binden und so auf die Nukleosomen wirken oder auch direkt einen Einfluss auf die Struktur und Dynamik des Nukleosoms haben (68). Dafür spricht, dass häufig strukturelle Effekte der übergeordneten Chromatinstruktur beobachtet werden (69). In den letzten Jahren wird verstärkt untersucht, wie der Einbau der Histonvarianten das Binden von Linkerhistonen beeinflusst. Sind die Bindeaffinitäten für Linkerhistone höher, liegt mehr DNA in komprimierter und somit unzugänglicher Form vor (67).

Die bislang am besten charakterisierte Histonvariante ist H2A.Z. Sie tritt in allen Eukaryoten auf und unterscheidet sich in 40 % der Aminosäuren von dem Haupthiston H2A. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass Nukleosomen, die H2A.Z enthalten, nicht so leicht komprimierte Chromatinfasern formen, sondern bevorzugt in der offenen Form als ‚beads on a string‘ vorliegen (70). *In vivo* wurde eine Vielzahl von scheinbar unzusammenhängenden, sich teilweise sogar widersprechenden Funktionen berichtet (für eine Übersicht s. (71)). Dies verdeutlicht, dass bei der Regulation DNA-abhängiger Prozesse verschiedene Faktoren zusammen spielen.

Die zuvor diskutierten experimentellen Befunde machen deutlich, dass Nukleosomen nicht nur statische Bausteine sind, die ausschließlich der Komprimierung von DNA dienen. Vielmehr sind Nukleosomen dynamische Komponenten, die an der Regulation von DNA-abhängigen Prozessen, insbesondere der Transkription, beteiligt sind. Verschiedene Histonvarianten und Histonmodifikationen können in einem Nukleosom kombiniert werden und eine Vielzahl von - teilweise entgegengesetzten - Funktionen ausüben. In Analogie zum genetischen Code der DNA, in dem die Sequenz der Proteine gespeichert ist, wurde die Information, die in der Kombination von Histonen enthalten ist, Histoncode genannt (72).

1.5 Nukleosomen und Krebs

Entstehen während der Replikation oder der Reparatur der DNA Veränderungen der DNA-Sequenz, und werden diese Veränderungen an folgende Generationen der Zelle weitergegeben, wird dies als Mutation bezeichnet. Eine Mutation kann in den nicht-codierenden Bereich der DNA fallen oder auch keinen Effekt auf die Funktion des Gens haben (stille Mutation). Oft allerdings führen insbesondere größere Veränderungen der DNA-Sequenz zu nachteiligen Veränderungen im Stoffwechsel, Fehlbildungen und der Entstehung von Krebszellen. Krebszellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie unkontrolliert wachsen und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören. Häufig können sich diese Zellen auch von dem ursprünglichen Zellverband lösen, mit dem Blut wandern und sich an anderen Stellen des Körpers verbreiten (Metastasierung).

Im letzten Jahrzehnt hat sich die Krebsforschung erheblich verändert. Anders als früher werden nicht mehr nur die Änderungen der DNA-Sequenz (genetische Veränderungen), sondern auch die erblichen Veränderungen der Genomfunktion, die ohne Änderungen der DNA-Sequenz auftreten, untersucht. Diese Veränderungen werden als epigenetisch bezeichnet. Die bedeutendsten epigenetischen Faktoren sind Histonmodifikationen, der Einbau von Histonvarianten in das Nukleosom und die Methylierung der DNA. Bei der Methylierung der DNA werden an bestimmten Stellen im Chromatin die Cytosine mit einer Methylgruppe versehen und dadurch aktive und inaktive Bereiche der DNA markiert.

Durch die in den letzten Jahren erzielten technologischen Fortschritte konnten epigenetische Veränderungen, die in dem Genom von Krebszellen auftreten, nachgewiesen werden (73). So wurde gefunden, dass in Krebszellen häufig die Tumorsuppressorgene im Vergleich zu gesunden Zellen methyliert sind, was dazu führt, dass sie weniger transkribiert werden. Auch wurden in vielen Krebszellen Veränderungen in dem Auftreten von PTMs und Histonvarianten entdeckt. Grund hierfür können Defekte in den zuvor aufgeführten Enzymen sein, die PTMs und Histonvarianten einführen. So wurden in verschiedenen Tumoren

Störungen der Aktivität von Histonacetyltransferasen nachgewiesen (74). Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Level von PTMs in Krebszellen mit einer hohen Rückfallrate und einer kürzeren Überlebensdauer verbunden sind. Daraus lässt sich eine Prognose des Krankheitsverlaufes ableiten (75).

Im Gegensatz zu genetischen Mutationen der zugrunde liegenden DNA-Sequenz können die epigenetischen Veränderungen einer Zelle reversibel sein. Aus diesem Grund stellen sie vielversprechende Ziele für die Therapie von Krebs dar. Zahlreiche Medikamente wurden entwickelt, die als Inhibitor für die Enzyme wirken, die die PTMs einführen (Übersicht s. (76)). Einige davon sind bereits für den Einsatz bei Krebspatienten zugelassen. Da nur für wenige Tumorarten bekannt ist, auf welchen molekularen Mechanismus die Krebsentstehung zurückzuführen ist, können diese Medikamente jedoch nicht zielgerichtet eingesetzt werden und die Behandlung spricht häufig nicht an (77). Dies betont die Wichtigkeit zu verstehen, wie der epigenetische Zustand einer Zelle kontrolliert wird und wodurch epigenetische Veränderungen ausgelöst werden. Nur so kann gezielter in diese Prozesse eingegriffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode entwickelt, um die Dynamik von Nukleosomen und den Einfluss der Histonzusammensetzung zu analysieren. Dazu werden die Dissoziation und die Assemblierung von Nukleosomen untersucht und auf das Auftreten von Zwischenprodukten hin überprüft, die ein potentielles Ziel der zellulären Maschinerie sein können. Ein tiefes Verständnis der Dynamik ist entscheidend, um darauf aufbauend phänomenologische Befunde deuten und in die Genregulation von Nukleosomen eingreifen zu können.

In dem folgenden Kapitel werden die theoretischen Grundlagen dieser Methode vorgestellt. Kapitel 4 beschreibt die Präparation und Validierung der verwendeten Nukleosomenproben, deren einzelmolekülspektroskopische Untersuchung in Kapitel 5 dargestellt ist. In Kapitel 6 werden die experimentellen Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung diskutiert und es wird ein Ausblick auf weitere geplante Untersuchungen gegeben.

2 Theorie

2.1 Lichtabsorption

Beim Durchgang elektromagnetischer Strahlung durch einen Stoff wird die Strahlung sowohl durch Streuung als auch durch Absorption geschwächt. Die Größe der beiden Effekte hängt unter anderem von der Art des Stoffes und von der Wellenlänge der Strahlung ab. In homogenen Medien, in denen die Streuung vernachlässigt werden kann, fällt lediglich die Absorption ins Gewicht. Ihre Abhängigkeit von der Wellenlänge ist für jeden Stoff charakteristisch.

Der Grad der Schwächung der Strahlung hängt von der Konzentration der absorbierenden Teilchen und von der Dicke der absorbierenden Schicht ab. Die mathematische Formulierung des Gesetzes geht auf H. Lambert und A. Beer zurück (78). Der wellenlängenabhängige Proportionalitätsfaktor wird als Extinktionskoeffizient bezeichnet.

$$A(\lambda) = -\lg\left(\frac{I_1(\lambda)}{I_0}\right) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

- $A(\lambda)$ = Extinktion
- $I_1(\lambda)$ = Intensität des transmittierten Lichts
- I_0 = Intensität des einfallenden Lichts
- $\varepsilon(\lambda)$ = dekadischer Extinktionskoeffizient
- c = Konzentration der absorbierenden Teilchen
- d = Dicke der absorbierenden Schicht

Die Absorption von sichtbarer und ultravioletter Strahlung bewirkt Übergänge zwischen den verschiedenen Anregungszuständen von Elektronen im bestrahlten Stoff. Bei freien Atomen können nur diese Übergänge erfolgen. Bei Molekülen können zusätzlich noch Rotationsfreiheitsgrade und Schwingungsfreiheitsgrade der Atome zueinander angeregt werden. Die Energie infraroter Strahlung reicht aus, um Übergänge zwischen verschiedenen Schwingungs- und Rotationszuständen innerhalb eines elektronischen Zustands zu induzieren.

Da ein Elektronenübergang immer einer einzigen, bestimmten Energiedifferenz entspricht, bestehen Absorptionsspektren von Atomen aus scharfen Linien. Die Spektren von Molekülen setzen sich aus breiteren Banden zusammen. Diese entstehen, da aus der großen Anzahl

an Übergängen sich dicht beieinander liegenden Linien ergeben, die sich verbreitern und zu einer zusammenhängenden Bande verschmelzen.

2.2 Fluoreszenz

Wenn sich die elektronische Anregung des Moleküls ändert, erfolgen gleichzeitig Übergänge zwischen verschiedenen Schwingungszuständen des Moleküls, wobei elektronische Übergänge schneller erfolgen als Schwingungsübergänge. Mit Hilfe der Quantenmechanik können die Wahrscheinlichkeiten der Übergänge berechnet werden und der der Übergang findet zwischen dem elektronischen Grundzustand (S_0) und verschiedenen angeregten Schwingungszuständen des ersten angeregten elektronischen Zustands (S_1) statt (79). Die aufgenommene Energie wird in der Regel durch Zusammenstöße an andere Moleküle abgegeben und wandelt sich somit in Wärmeenergie um (Löschung). Es kommt jedoch auch vor, dass ein Teil der absorbierten Strahlung wieder als Strahlung abgegeben wird (Photolumineszenz). Eine Übersicht über die möglichen Übergänge bietet das Jablonski-Termschema (s. Abbildung 6).

Nach dem Übergang in den ersten angeregten elektronischen Zustand wird die Schwingungsenergie innerhalb von 10^{-12} sec strahlungslos abgegeben und das Molekül geht in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands über (Innere Umwandlung). Geht das Molekül daraufhin durch Emission eines Photons in den elektronischen Grundzustand über, wird das als Fluoreszenz bezeichnet. Die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und liegt im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-9} sec.

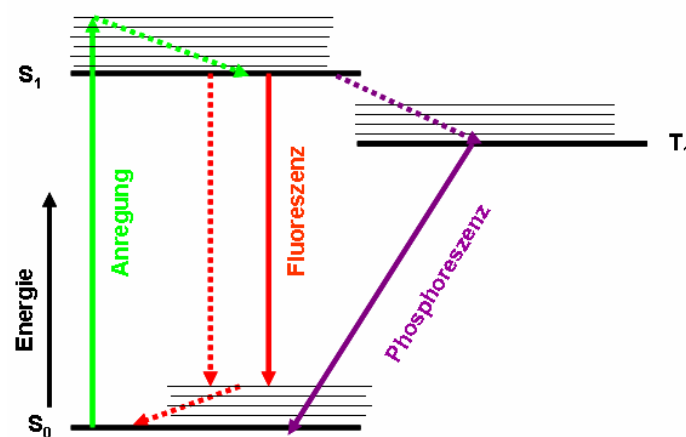


Abbildung 6: Jablonski-Termschema

Die Übergänge zwischen Energieniveaus sind durch Pfeile dargestellt (gestrichelte Pfeile markieren strahlungslose Übergänge, durchgezogene Pfeile solche, die mit Absorption bzw. Emission von Licht verbunden sind), S_0 elektronischer Grundzustand, S_1 erster angeregter elektronischer Zustand, T_1 Triplettzustand.

Dieser Vorgang konkurriert mit den anderen Deaktivierungsprozessen, wie der zuvor beschriebenen Löschung durch andere Moleküle und dem Übergang in den Triplettzustand (T_1) (Spin-Umkehr durch Interkombination), der selten auftritt. Die Rückkehr aus dem Triplettzustand in den S_0 -Zustand ist spinverboten und erfolgt abhängig vom System bis zu Sekunden verzögert. Man spricht von Phosphoreszenz.

Der Anteil der Fluoreszenzemission an allen Deaktivierungsprozessen wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_F) beschrieben. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist durch den Quotienten zwischen emittierten Photonen und absorbierten Photonen definiert.

$$\phi_F = \frac{N_{em}}{N_{ab}} \quad (2.2)$$

- Φ_F = Fluoreszenzquantenausbeute
- N_{ab} = Zahl der absorbierten Photonen
- N_{em} = Zahl der emittierten Photonen

Da Fluoreszenz stattfindet, nachdem die Schwingungsrelaxation abgeschlossen ist und das Molekül von S_1 in einen angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands (S_0) übergeht, ist die emittierte Strahlung zu längeren Wellenlängen verschoben. Diese Verschiebung wird als Stokes-Shift bezeichnet.

2.3 Förster-Resonanzenergietransfer

Die Anregungsenergie eines Fluorophors (Donor) kann strahlungslos über induzierte Dipol-Dipol Wechselwirkungen der Übergangsdipolmomente an ein anderes Molekül (Akzeptor), in der Regel ebenfalls ein Fluorophor, abgegeben werden.

Damit der Transfer von Energie stattfinden kann, muss das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Das Ausmaß der Überlappung wird durch das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ beschrieben.

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.3)$$

- $J(\lambda)$ = Überlappungsintegral
- $F_D(\lambda)$ = Fluoreszenzintensität des Donors
- $\varepsilon_A(\lambda)$ = dekadischer Extinktionskoeffizient des Akzeptors
- λ = Wellenlänge

Die Effizienz des Transfers ist von dem Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor abhängig. Daher kann Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) dazu verwendet werden, den Abstand zwischen zwei Positionen in einem Makromolekül zu messen, die zuvor mit Donor und Akzeptor markiert wurden.

Damit Energietransfer möglich ist, muss die Größenordnung des Abstands zwischen den Fluorophoren im Bereich des sog. Försterradius R_0 liegen. Dies ist der Abstand der Fluorophore, bei dem die Effizienz des Energietransfers 50 % entspricht. Der Wert ist von dem Überlappungsintegral, der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors und der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente des Donors und Akzeptors abhängig (Gleichung (2.4)). In Abhängigkeit vom Fluorophorpaar liegt R_0 in der Regel zwischen 3 und 7 nm. Im Allgemeinen ist Energietransfer daher möglich, wenn der Abstand der Fluorophore zwischen 1 und 10 nm liegt. Die Größe vieler Biomoleküle liegt in diesem Bereich. Daher kann FRET zur Messung von Abständen in Biomolekülen verwendet werden.

$$R_0 = 0,211(\kappa^2 n^{-4} \Phi_{DA} J(\lambda))^{1/6} \quad (2.4)$$

R_0 = Försterradius

κ = Orientierungsfaktor der Übergangsdipolmomente

n = Brechungsindex des Mediums

Φ_{DA} = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

$J(\lambda)$ = Überlappungsintegral

Der Orientierungsfaktor der Übergangsdipolmomente ist experimentell nur schwer zu bestimmen. Sind die Fluorophore frei beweglich, kann über alle möglichen Orientierungen der Übergangsdipolmomente gemittelt und für κ näherungsweise $2/3$ angenommen werden. Ist jedoch ein Fluorophor starr an das Biomolekül gebunden und liegt somit in einer Vorzugsorientierung vor, gilt diese Näherung nicht. Dass die gebundenen Fluorophore frei beweglich vorliegen, muss daher vor FRET Messungen verifiziert werden. Dies ist durch Anisotropiemessungen möglich (s. Kapitel 2.4).

Der Zusammenhang von Transfereffizienz E_{FRET} und Interfluorophorabstand r_{DA} ist durch Gleichung (2.5) gegeben.

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} \quad (2.5)$$

- E_{FRET} = Transfereffizienz
- R_0 = Försterradius
- r_{DA} = Abstand der Fluorophore

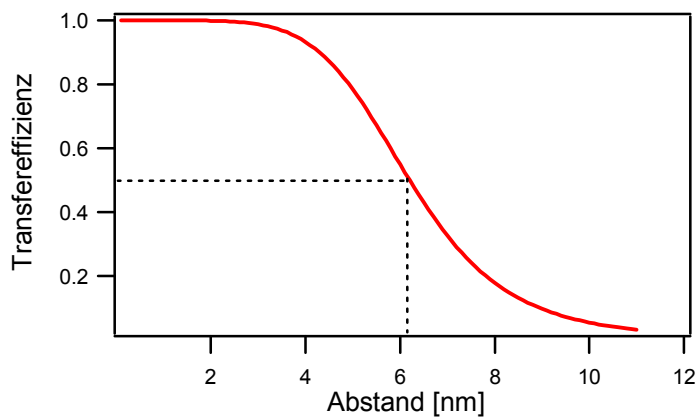


Abbildung 7: Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz

Die gestrichelte Linie markiert den Försterradius, den Abstand der Fluorophore, bei dem die Transfereffizienz gerade 0,5 beträgt. Für das hier dargestellte Fluorophorpaar Alexa 488 und Alexa 594 beträgt der Försterradius 6.2 nm.

Die Transfereffizienz E_{FRET} ist dabei als das Verhältnis der Fluoreszenzintensität des Akzeptors F_A zu der gesamten Fluoreszenzintensität $F_A + F_D$ definiert. Dieser Wert ist experimentell zugänglich.

$$E_{FRET} = \frac{F_A}{F_A + F_D} \quad (2.6)$$

- E_{FRET} = Transfereffizienz
- F_D = Fluoreszenzintensität des Donors
- F_A = Fluoreszenzintensität des Akzeptors

Bei Betrachtung der Emissions- und Anregungsspektren von Fluorophorpaaren, die typischerweise für die Messung von FRET verwendet werden, zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensität von Donor und Akzeptor nicht ohne weiteres einzeln bestimmt werden

können (s. Abbildung 8). Die Fluoreszenzemission des Donors überlappt mit der Fluoreszenzemission des Akzeptors (Übersprechen). Weiterhin wird der Akzeptor ebenfalls, wenn auch nur sehr schwach, durch Licht mit der Wellenlänge 488 nm, wie es für die Anregung des Donors verwendet wird, angeregt (direkte Anregung des Akzeptors). Bei der experimentellen Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten können diese beiden Effekte allerdings berücksichtigt werden, bevor die Transfereffizienz und daraus der Abstand bestimmt wird (s. Kapitel 3.1.5.3).

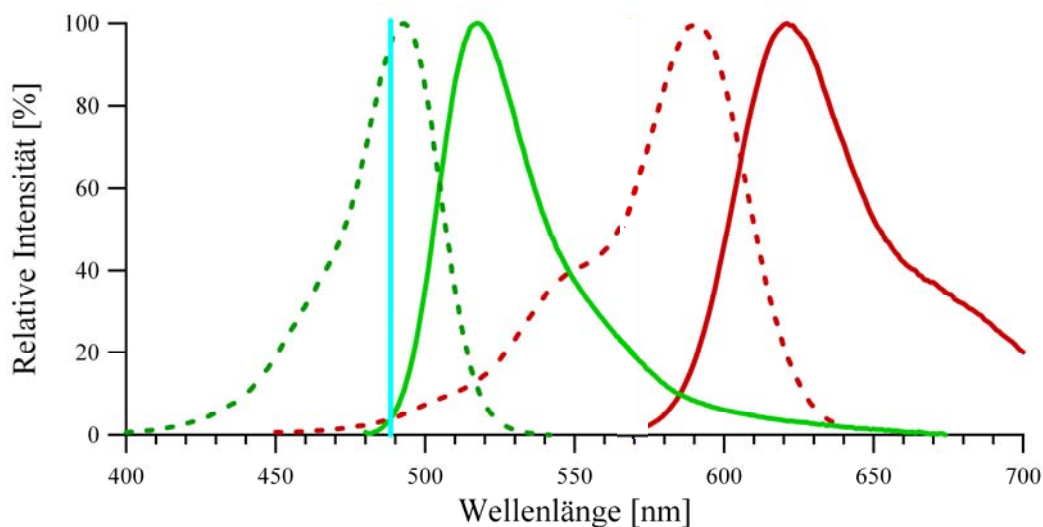


Abbildung 8: Absorptions- und Emissionsspektren von Alexa 488 und Alexa 594

Gestrichelte Linien kennzeichnen die Absorptions-, durchgezogene Linien die Emissionsspektren (die Spektren von Alexa 488 sind in grün, die von Alexa 594 in rot dargestellt). Zudem ist die Wellenlänge des Anregungslichts (488 nm) markiert. Abbildung modifiziert aus (80).

2.4 Anisotropie

Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren innerhalb eines Makromoleküls kann nur zur Bestimmung des Abstands verwendet werden, wenn beide Fluorophore frei beweglich an das Makromolekül gebunden sind. Im Folgenden wird beschrieben, warum Messungen der Anisotropie dafür geeignet sind, die freie Beweglichkeit der Fluorophore zu überprüfen.

Fluorophore werden durch Licht angeregt, das einen elektrischen Feldvektor parallel zum Übergangsdipolmoment des Fluorophors besitzt. Das vom Fluorophor emittierte Licht ist parallel zum Übergangsdipolmoment polarisiert. Werden Moleküle mit linear polarisiertem Licht angeregt, kommt es durch die feste Orientierung der molekularen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmomente in Molekülen zur Anisotropie der Fluoreszenzemission. Ändert sich die Orientierung der angeregten Moleküle während der Lebensdauer des ersten elektronisch angeregten Zustandes, erfolgt eine Depolarisation der Fluoreszenzemission.

Die Änderung der Orientierung erfolgt vorwiegend durch Rotationsdiffusion. Das Abklingen der Anisotropie wird durch die Perrin-Gleichung (2.7) beschrieben (81).

$$r = \frac{r_0}{\left(1 + \frac{\tau_{FL}}{\theta}\right)} \quad (2.7)$$

- r = Anisotropie
- r_0 = maximale Anisotropie bei Abwesenheit von Rotationsdiffusion
- τ_{FL} = Fluoreszenzlebensdauer
- θ = Rotations-Diffusionszeit

Für sphärische Teilchen ist die Rotations-Diffusionszeit θ vom Volumen der rotierenden Einheit V_{rot} und der Viskosität η des Lösungsmittels abhängig.

$$\theta = \frac{\eta V_{rot}}{k_B T} \quad (2.8)$$

- θ = Rotations-Diffusionszeit
- η = Viskosität des Lösungsmittels
- V_{rot} = Volumen der rotierenden Einheit V_{rot}
- k_B = Boltzmann Konstante
- T = Temperatur

Aus diesem Grund kann durch Anisotropiemessungen die Mobilität eines an ein Makromolekül gebundenen Fluorophors untersucht werden: Für frei bewegliche Fluorophore ist die Rotations-Diffusionszeit deutlich geringer als die Fluoreszenzlebensdauer. Die Anisotropie beträgt dadurch annähernd 0. Ist ein Fluorophor starr an ein Makromolekül gekoppelt, vergrößert sich die Rotationsdiffusionszeit und somit auch die Anisotropie.

Die Anisotropie kann experimentell durch Anregung mit vertikal polarisiertem Licht und Detektion der vertikal und horizontal polarisierten Fluoreszenz bestimmt werden (s. Abbildung 9) (81).

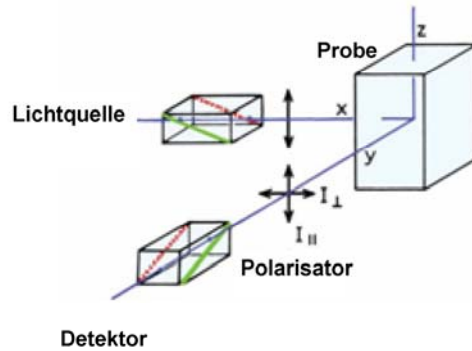


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Anisotropiemessung

Eine Probe wird mit linear polarisiertem Licht angeregt und die Intensität der Emission wird in Abhängigkeit der Polarisationsrichtung gemessen. Darstellung modifiziert aus (81).

2.5 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Das Verständnis für molekulare Prozesse von chemischen und biologischen Systemen resultiert bisher fast ausschließlich aus Experimenten an Molekülensembles, wobei das durchschnittliche Verhalten von Molekülen betrachtet wird. Im Gegensatz dazu ermöglicht ein Einzelmolekülexperiment, die individuellen Eigenschaften der am System beteiligten Moleküle zu untersuchen. Es erlaubt, zwischen homogenen und heterogenen molekularen Eigenschaften zu unterscheiden. Heterogenitäten können dabei durch statische Inhomogenität (Subpopulationen) oder dynamische Inhomogenität (zeitliche Fluktuationen) verursacht werden. Verfahren, die Einzelmolekülbeobachtung ermöglichen, haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Einzelne Moleküle können durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die Einzelmolekülfluoreszenzmethoden können prinzipiell in zwei Klassen eingeteilt werden (82). Die eine liefert Informationen über einzelne Moleküle über einen langen Zeitraum, bei der anderen werden Informationen durch die Betrachtung einer großen Anzahl einzelner Moleküle gewonnen.

Um einzelne Moleküle über einen langen Zeitraum zu beobachten, werden sie fixiert, z.B. an eine Oberfläche. In diesen Experimenten werden Zeitverläufe der Fluoreszenzemission erhalten und sie bieten daher eine optimale Möglichkeit, die Dynamik eines Systems zu untersuchen.

Für die Untersuchung einer großen Anzahl einzelner Moleküle wird ausgenutzt, dass die Moleküle durch Brownsche Diffusion durch ein sehr kleines Beobachtungsvolumen diffundieren. In der kurzen Zeit, in der sich ein Molekül im Beobachtungsvolumen befindet, wird ein Schnappschuss der Fluoreszenzemission aufgenommen. So ist es möglich, Daten von tausenden verschiedenen Molekülen innerhalb einer kurzen Zeit sammeln.

Diese Methode hat gegenüber den Messungen an immobilisierten Molekülen den Vorteil, dass die Probe nicht funktionalisiert werden muss, um an die Oberfläche gebunden zu werden. Auch ist es nicht nötig, eine Oberfläche zu modifizieren, damit die Probe daran immobilisiert werden kann. Da die Probe häufig nicht nur über den Linker an die Oberfläche bindet, sondern darüber hinaus über zahlreiche unspezifische Wechselwirkungen, entstehen bei der Immobilisierung störende Artefakte. Durch die Nähe der Oberfläche treten zudem häufig auch photophysikalische Artefakte auf und das Hintergrundrauschen wird erhöht (25,82).

Bei diffusionsbasierten Einzelmolekülmessungen werden einzelne fluoreszenzmarkierte Moleküle in einem konfokalen Mikroskop beobachtet (s. Abbildung 10). Die Anregungsstrahlung wird durch das Objektiv in die Probe hineinfokussiert und regt die Fluorophore im Laserfokus sowie die Fluorophore an, die sich überhalb und unterhalb der Fokusebene befinden. Ein Teil der Emission wird durch das schon zur Anregung benutzte Objektiv gesammelt und dann hinter dem schon zur Anregung benutzte Objektiv gesammelt und dann hinter dem dichroitischen Spiegel durch eine Linse auf eine Lochblende abgebildet. Die Strahlen, die nicht aus der Fokusebene kommen, werden dabei von der Lochblende abgehalten, da sie dort nicht fokussiert sind (s. grüne Strahlung in Abbildung 10). Die Größe des beobachteten Volumens ist von dem Strahldurchmesser des Anregungslichts, dem Objektiv, der Linse und der Lochblende abhängig. Es kann auf weniger als einen Femtoliter reduziert werden. Wird unter starker Verdünnung der Probe gemessen, befindet sich im zeitlichen Mittel weniger als ein Molekül im Beobachtungsvolumen.

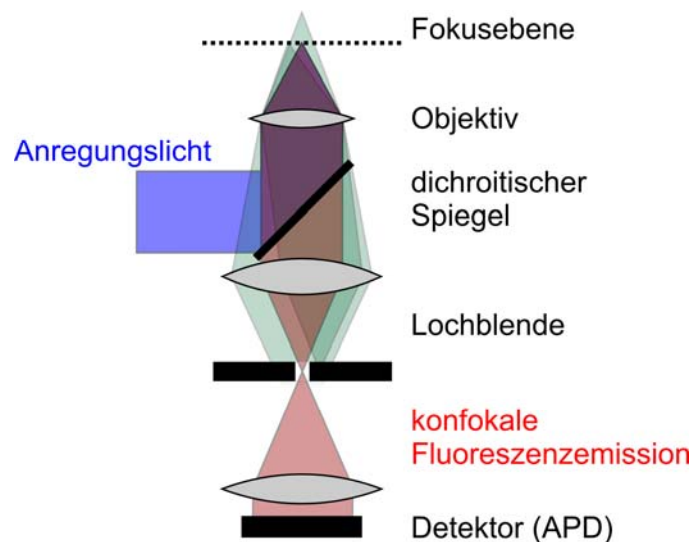


Abbildung 10: Strahlengang in einem konfokalen Mikroskop

Über den dichroitischen Spiegel und das Objektiv wird das Anregungslicht in die Probe fokussiert. Die Fluoreszenzemission wird von dem gleichen Objektiv gesammelt und von einer Linse auf eine Lochblende abgebildet. Die Lochblende hält die Strahlen ab, die von außerhalb der Fokusebene stammen (dargestellt in grün). Nur Licht, das im Laserfokus emittiert wurde (dargestellt in rosa), gelangt zum Detektor. Abbildung freundlicherweise von J. Krieger zur Verfügung gestellt.

In einem Einzelmolekül-FRET-Experiment (spFRET, engl. ‚single pair‘ FRET) werden die Fluoreszenzintensitäten von Donor (N_D) und Akzeptor (N_A) gemessen. Diese hängen jedoch stark von der apparativen Detektionseffizienz ab. Ein Teil der von der Probe emittierten Photonen geht in Linsen, Filtern und Spiegeln der Messapparatur verloren, so dass weniger Photonen detektiert werden. Außerdem unterscheiden sich die verwendeten Fluorophore in der Regel in ihrer Fluoreszenzquantenausbeute.

Aus den gemessenen Intensitäten kann daher nicht direkt die Transfereffizienz berechnet werden, sondern lediglich ein Abstandsfaktor, die Proximity Ratio P .

$$P = \frac{N_A}{N_A + N_D} \quad (2.9)$$

P = Proximity Ratio

N_D = gemessene Intensität des Donors

N_A = gemessene Intensität des Akzeptors

Mit Hilfe eines Korrekturfaktors γ kann die Proximity Ratio in die Transfereffizienz E_{FRET} überführt werden.

$$E_{\text{FRET}} = \frac{P}{\gamma \cdot (1 - P) + P} \quad (2.10)$$

Der Korrekturfaktor γ enthält die apparativen Einflüsse und kann nach Ermittlung der Detektionseffizienzen von Donor und Akzeptor aus den Fluoreszenzquantenausbeuten nach Gleichung (2.11) bestimmt werden.

$$\gamma = \frac{\eta_A \cdot \phi_A}{\eta_D \cdot \phi_D} \quad (2.11)$$

γ = Korrekturfaktor

η_A = Detektionseffizienz des Akzeptors

η_D = Detektionseffizienz des Donors

ϕ_A = Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors

ϕ_D = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors

Die Betrachtung der Proximity Ratio ist ausreichend, wenn nicht der Abstand zwischen beiden Fluorophoren zu bestimmen ist, sondern lediglich relative Abstände verglichen werden sollen.

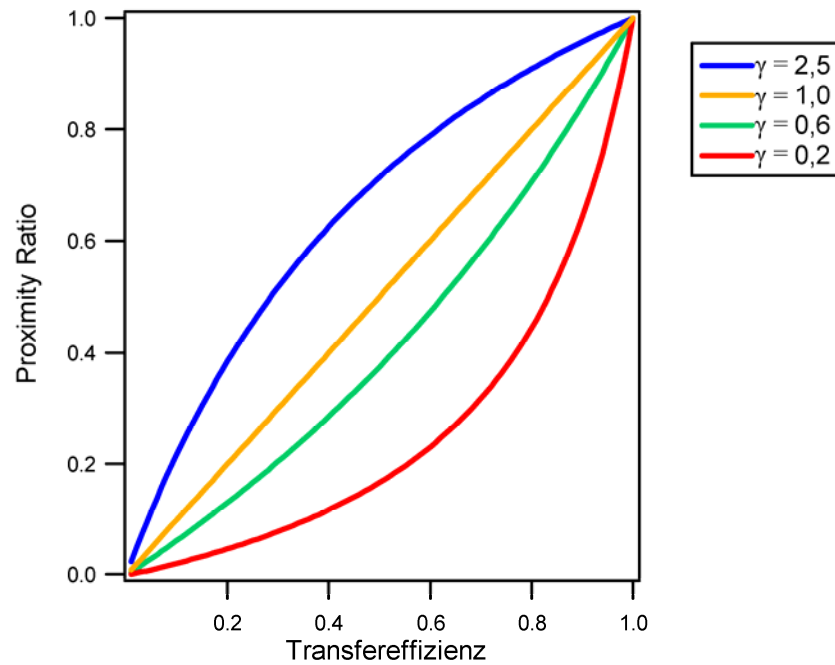


Abbildung 11: Zusammenhang von Transfereffizienz und Proximity Ratio

Der Zusammenhang von Transfereffizienz und Proximity Ratio ist für verschiedene Korrekturfaktoren dargestellt. Sollen lediglich relative Abstände verglichen werden, ist die Betrachtung der Proximity Ratio ausreichend. Abbildung modifiziert aus (80).

2.6 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Bei höheren Konzentrationen können in einem konfokalen Mikroskop einzelne Moleküle im Fokus nicht mehr getrennt beobachtet werden. Permanent diffundieren Teilchen in das Fokusvolumen und wieder hinaus und verursachen so Fluktuationen der Fluoreszenzemission. Aus der Amplitude und der Zeitskala dieser Fluktuationen lassen sich die Konzentration und Eigenschaften der Teilchen, wie der Diffusionskoeffizient, bestimmen. Die Methode wird Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) genannt.

Der Methode liegt zugrunde, dass die Geschwindigkeit der Fluktuationen von der Verweilzeit der Teilchen im Fokus abhängt. Moleküle, die sich lange im Fokus aufhalten, zeigen langsame Fluktuationen der Fluoreszenzemission, wohingegen solche mit einer kurzen Verweilzeit schnelle Fluktuationen zeigen (s. Abbildung 12).

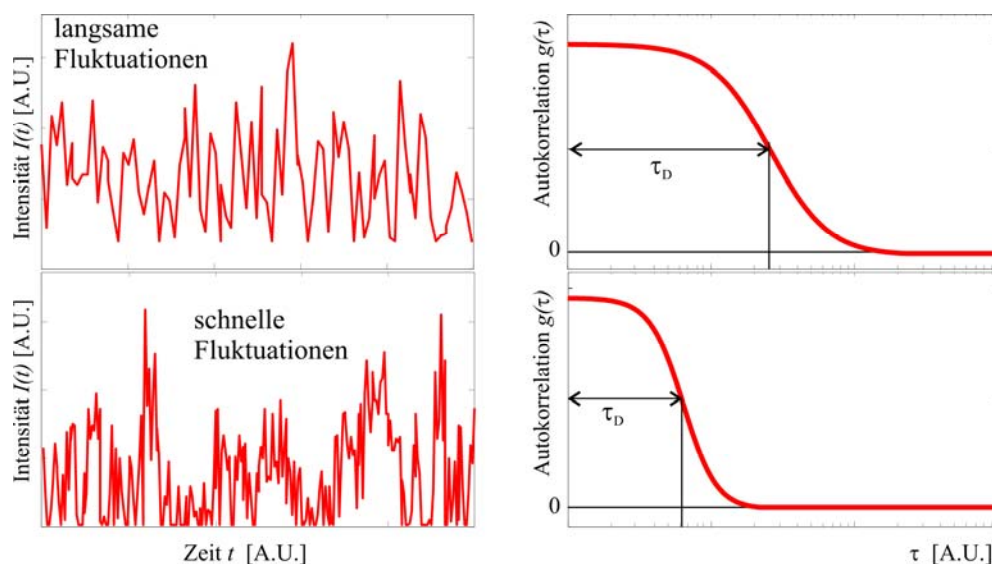


Abbildung 12: Analyse der Fluoreszenzemission mittels Autokorrelation

Langsame Fluktuationen, wie sie für große Teilchen auftreten, führen dazu, dass die Autokorrelation langsam abfällt. Kleine Teilchen führen zu schnellen Fluktuationen der Fluoreszenzemission und die Autokorrelationsfunktion fällt schneller ab. Die Diffusionszeit kann aus der Autokorrelationsfunktion abgelesen werden. Sie entspricht der Zeit, zu der die Autokorrelationsfunktion auf 50 % abgefallen ist. Abbildung freundlicherweise von J. Krieger zur Verfügung gestellt.

Die Verweilzeit der Teilchen im Fokusvolumen ist durch die Fokusgröße und den Diffusionskoeffizienten des Teilchens gegeben (Gleichung (2.12)). Der Diffusionskoeffizient hängt über Gleichung (2.13) mit der Teilchengröße zusammen. Daher können mit FCS-Messungen der Diffusionskoeffizient und daraus die Größe und die Form von fluoreszenzmarkierten Molekülen bestimmt werden.

$$D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (2.12)$$

- D = Diffusionskoeffizient
- w_{xy} = Halbwertsbreite des Fokus
- τ_D = Diffusionszeit/Verweilzeit des Teilchens im Fokus

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (2.13)$$

- k_B = Boltzmann Konstante
- T = Temperatur
- η = Viskosität des Mediums
- R_h = hydrodynamischer Radius¹



Abbildung 13: Schematische Darstellung des Laserfokus

Die Messgröße, die bei einer FCS-Messung aufgenommen wird, ist die zeitabhängige Fluoreszenzemission. Diese variiert zufällig und stellt somit eine statistische Größe dar. Zeitlich variable statistische Größen können durch Autokorrelation analysiert werden. Durch Autokorrelation des Signals wird untersucht, wie die Fluoreszenzemission zur Zeit t mit der zum Zeitpunkt $t+\tau$ zusammenhängt.

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} - 1 \quad (2.14)$$

- $G(\tau)$ = normalisierte Autokorrelationsfunktion
- $F(t)$ = Intensität der Fluoreszenzemission zum Zeitpunkt t
- $\langle \rangle$ = Mittelung über die Zeit

¹ Unter dem hydrodynamischen Radius eines Teilchens versteht man den Radius einer Kugel, die den gleichen Diffusionskoeffizienten wie das beobachtete Teilchen hat. Damit wird berücksichtigt, dass nicht nur die Größe, sondern auch die Form den Diffusionskoeffizienten eines Teilchens beeinflusst. Zudem wird berücksichtigt, dass Lösungsmittelmoleküle an das beobachtete Teilchen binden und den Radius damit vergrößern.

Ist τ im Vergleich zur Verweilzeit des Teilchens im Fokus klein, hat sich die Fluoreszenzemission noch nicht stark verändert und die Autokorrelationsfunktion ist groß. Für Zeitspannen τ , die deutlich größer als die Verweilzeit des Teilchens im Fokus sind, besteht kein Zusammenhang mehr zwischen der Fluoreszenzemission von t und $t + \tau$ und die Autokorrelation geht gegen 0. Wie schnell die Autokorrelationsfunktion abnimmt, hängt von der Zeitskala der Fluktuationen und von der durchschnittlichen Verweilzeit des Teilchens im Fokus ab (s. Abbildung 12). Die Halbwertszeit der Autokorrelationsfunktion entspricht der durchschnittlichen Verweilzeit des Teilchens im Fokus. Nach Gleichung (2.12) kann daraus der Diffusionskoeffizient bestimmt werden.

Für die Auswertung muss an die Autokorrelationsfunktion eine theoretische Funktion angepasst werden, z.B. für eine Lösung einer einzelnen fluoreszierenden Spezies mit der molaren Konzentration c und dem Diffusionskoeffizienten D (79):

$$G(\tau) = \frac{1}{cV_{eff}} \left(\frac{1 + 4D\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(\frac{1 + 4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \quad (2.15)$$

- V_{eff} = effektives Beobachtungsvolumen
- w_0 = Halbwertsbreite des Fokus in xy Ebene
- z_0 = Halbwertsbreite des Fokus in z Ebene

V_{eff} , w_0 und z_0 können durch unabhängige Kalibriermessungen bestimmt werden. Der erste Faktor von Gleichung (2.15) entspricht dem Kehrwert der durchschnittlichen Teilchenzahl N im Fokusvolumen. Aus der Amplitude der Autokorrelationsfunktion kann daher die Konzentration c bestimmt werden (Gleichung (2.16)).

$$G(0) = \frac{1}{cV_{eff}} = \frac{1}{\langle N \rangle} \Leftrightarrow \langle C \rangle = \frac{1}{V_{eff}} \cdot G(0) \quad (2.16)$$

- N = durchschnittliche Teilchenzahl im Fokusvolumen
- c = Konzentration

Bislang wurden lediglich die Fluktuationen berücksichtigt, die durch Diffusionsprozesse entstehen, und es wurde vorausgesetzt, dass ein angeregter Fluorophor konstant Photonen emittiert. Allerdings werden auch durch den Übergang des angeregten Fluorophors in den Triplettzustand Fluktuationen des Fluoreszenzsignals verursacht (s. Spin-Umkehr durch

Interkombination in Abbildung 6). Dies muss in der theoretischen Funktion zum Anpassen der experimentellen Daten berücksichtigt werden (79):

$$G(\tau) = (1 + \beta e^{-\lambda\tau}) \left(\frac{1}{cV_{eff}} \left(\frac{1 + 4D\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(\frac{1 + 4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \right) \quad (2.17)$$

β = Amplitude des Triplettzustands

λ = Relaxationszeit des Triplettzustands

Die Amplitude β und die Relaxationszeit des Triplettzustands λ nehmen mit Intensität des Anregungslichts zu, bis ein Maximum erreicht ist, das von der Wahrscheinlichkeit der Anregung, der Emission und der Spin-Umkehr durch Interkombination abhängt. Da die Relaxationszeit des Triplettzustands und die Diffusion kleiner Moleküle sich auf einer ähnlichen Zeitskala abspielen, ist es wichtig, die FCS Experimente bei geringer Anregungsintensität durchzuführen und β damit zu reduzieren (79).

Da die relativen Fluktuationen mit zunehmender Teilchenzahl kleiner werden, ist es wichtig, die durchschnittliche Anzahl der Teilchen in dem Beobachtungsvolumen auf unter 1000 zu reduzieren (83). Beträgt das Beobachtungsvolumen ungefähr einen Femtoliter, entspricht dies Konzentrationen von bis zu 2 μM . Ein Vorteil der Untersuchung der dynamischen Eigenschaften einer Probe mittels FCS liegt daher darin, dass geringe Probenmengen benötigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle gängigen Reagenzien von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen. Das zum Ansetzen der Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage von Seralpur PRO 90-CN (Seral, Ransbach-Baumbach) aufbereitet. Dieses Wasser sowie sämtliche Puffer wurden für die spektroskopischen Analysen mit Filtern mit 20 nm Porengröße (Anotrop 10, Whatman International Ltd, Maidstone, England) weiter gereinigt.

Für die Handhabung fluoreszenzmarkierter Proben wurden in allen Schritten silikonbeschichtete Eppendorf Reaktionsgefäße (low-binding Reaktionsgefäße, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) und Pipettenspitzen (TipOne RPT, STARLAB GmbH, Ahrensburg) benutzt, um die Adsorption an die Oberfläche zu reduzieren. Auf diese Art wurde dem Verlust von Probe, der Verfälschung einer zuvor bestimmten Konzentration und auch dem Zerfall der Probe durch Adsorptionseffekte entgegengewirkt.

3.1.2 Farbstoffe

Für die Messungen von Energietransfer, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden die Fluorophore Alexa 488 und Alexa 594 verwendet. Dabei wird Alexa 488, der Donorfluorophor, direkt mit Strahlung der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Energie wird durch FRET auf Alexa 594, den Akzeptorfluorophor, übertragen.

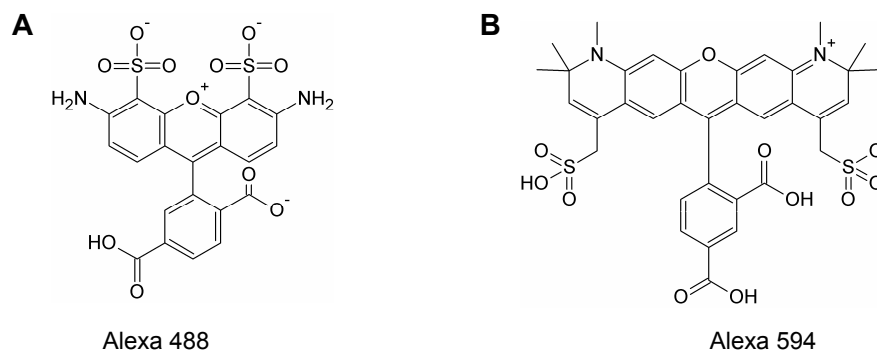


Abbildung 14: Darstellung der Struktur der Farbstoffe a) Alexa 488, b) Alexa 594

3.1.3 DNA-Sequenzen

Für die Untersuchung der Dissoziation von Nukleosomen wurden die Nukleosomen auf einem 170 bp langen DNA-Fragment rekonstituiert, das eine starke Positionierungssequenz enthielt (84,85). Diese 146 bp lange Sequenz ist an beiden Enden um je 12 bp verlängert (in Abbildung 15 durch kursive Buchstaben dargestellt). Im Nukleosom bildet die Positionierungssequenz das Oktamer, die übrigen 12 bp bilden sog. DNA-Arme. Für die Untersuchung der thermischen Mobilisierung wurden die Nukleosomen auf 210 bp langen DNA-Fragmenten rekonstituiert, die dieselbe Positionierungssequenz enthielten, welche allerdings um mehr Basenpaare verlängert war.

170 bp Sequenz

*CATGC ACAGGATGTA TATATCTGAC ACGTGCCTGG AGACTAGGGA GTAATCCCCT
TGGCGGTAA AACGCGGGG ACAGCGCGTA CGTGCGTTA AGCGGTGCTA
GAGCTGTCTA CGACCAATTG AGCGGCCTCG GCACCGGGAT TCTCCAGGGC
GGCCGCGTAT AGGGT*

210 bp Sequenz

*CAA GGTCGCTGTT CAATACATGC ACAGGATGTA TATATCTGAC ACGTGCCTGG
AGACTAGGGA GTAATCCCCT TGGCGGTAA AACGCGGGG ACAGCGCGTA
CGTGCGTTA AGCGGTGCTA GAGCTGTCTACG ACCAATTG AGCGGCCTCG
GCACCGGGAT TCTCCAGGGC GGCCGCGTAT AGGGTCCATC ACATAAGGGA
TGAACTC*

Abbildung 15: Sequenz der verwendeten DNA-Fragmente

Die Sequenz der Oligonukleotide, die als Primer für die PCR Reaktion verwendet wurden, ist in Tabelle 1 aufgeführt. Für die Präparation von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten wurden Primer eingesetzt, in denen ein spezifisches Thymidin an der 2' Position der Base Thymin über einen Linker mit einem Fluorophor markiert war (s. Abbildung 16). Der Fluorophor stört die Bildung des DNA-Doppelstrangs nicht. Alle Primer wurden von der Firma IBA GmbH (Göttingen) bezogen.

Tabelle 1: Oligonukleotide als Primer für die Präparation der DNA-Fragmente

Die Base, an die der Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, wurde in der jeweiligen Sequenz durch X gekennzeichnet.

170 bp Fragment forward Primer	Sequenz	Farbstoff/Position
601 170 fwd	ACCCTATACG CGGCCCT	-
601 170 int	ACCCTATACG CGGCCCTGGA GAATCCCGGT GCCGAAACCG CXCAATTG	Alexa 488 an +45
170 bp Fragment reverse Primer	Sequenz	Farbstoff/Position
601 170 rev	CATGCACAGG ATGTATATAT	-
601 170 rev int	CATGCACAGG ATGTATATAT CTGACACGTG CCXGGAGAC	Alexa 594 an -52
601 170 rev dyad axis	CATGCACAGG ATGTATATAT CTGACACGTG CCXGGAGACT AGGGAGTAAT CCCCTTGGCG GTTAAAACGX GGGGGACAGC GCGTACG	Alexa 594 an -15
210 bp Fragment forward Primer	Sequenz	Farbstoff/Position
210 bp fwd	GAGTTCATCC CTTATGTGA GATGGAC	-
210 bp fwd int	GAGTTCATCC CTTATGTGA GAXGGAC	Alexa 488 an +88
210 bp Fragment reverse Primer	Sequenz	Farbstoff/Position
210 bp rev	CAAGGTCGCT GTTCAATACA TGCACAG	-

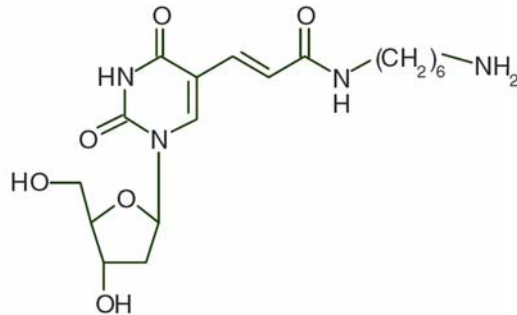


Abbildung 16: Darstellung der Struktur von 5-C6-Amino-2'-desoxythymidin

An 5-C6-Amino-2'-desoxythymidin wurde ein Fluorophor gebunden und ein Thymidin im Primer durch das fluoreszenzmarkierte 5-C6-Amino-2'-desoxythymidin ersetzt. Der Fluorophor stört die Bildung des DNA-Doppelstrangs nicht. (Quelle: http://www.iba-go.com/downloads/pdf/IBA_Oligocatalog0109.pdf)

3.1.4 Geräte

3.1.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

Die DNA-Fragmente wurden nach der PCR durch HPLC (Crystal 200 High Pressure System, Unicam, Cambridge, UK) über eine Ionenaustauschersäule (Gen-Pak-Fax, Waters, Eschborn) aufgereinigt. Die DNA wurde mit steigender NaCl Konzentration eluiert, und das Eluat mit dem Fraktionssammler 2111 Multirack (LKB Bromma) aufgefangen.

3.1.4.2 Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography)

Die Oktamere wurden nach der Dialyse durch FPLC (Amersham GP250 mit Fraktionssammler FRAC-100, Pharmacia, Uppsala, Schweden) über eine Superdex 200 Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgereinigt, die die Moleküle nach Größe trennt. Als Nebenprodukte anfallende Dimere und Tetramere sowie der freie Farbstoff eluierten nach dem Oktamer und wurden mit dem Fraktionssammler FRAC-100 (Pharmacia Biotech) aufgefangen.

3.1.4.3 Absorptionsspektrometer

Absorption wurde in einem Cary 4E UV-Visible Spektrometer (Varian, Mulgrave, Australien) bestimmt. Die Proben wurden hierzu in SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten (Hellma, Müllheim) mit einem Lichtweg von 3 mm gefüllt. Gemessen wurde über einen Wellenlängenbereich von 220 bis 750 nm.

3.1.4.4 Fluoreszenzspektrometer

Die Fluoreszenzemission wurde in einem SLM-AMINCO 8100 Fluoreszenzspektrometer (SLM, Urbana, USA) gemessen. Die Anregung erfolgt bei diesem Spektrometer durch eine 150 Watt Xenonlampe. Die entsprechende Wellenlänge für Anregung, bzw. Emission wurde durch Monochromatoren isoliert. Die Messungen erfolgten in SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten (Hellma, Müllheim).

3.1.4.5 Thermocycler

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) und die Hybridisierung von ssDNA zu dsDNA wurde in dem Thermocycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, USA) durchgeführt.

3.1.4.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde abhängig von der Anwendung in zwei verschiedenen Systemen durchgeführt:

- System Mini Protean (Bio-Rad, München) für kleine Gele (Abmessung 7 x 8 cm) zur Analyse von Nukleosomen und DNA-Fragmenten
- System von CTI, Gelkammer TV21 (CTI GmbH, Idstein) für große Gele (Abmessung 20 x 21 cm) zur Trennung von verschiedenen Histonen zur Analyse der Oktamere

3.1.4.7 Geldokumentation

Die Fluoreszenzintensität von Polyacrylamidgelen wurde mit einem Typhoon Gel Scanner (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare, Freiburg) gemessen. Dieser verfügt über verschiedene Laser zur spezifischen Anregung einzelner Fluorophore und ein Set von Filtern zur spezifischen Detektion der Emission einzelner Fluorophore. Die für den jeweiligen Farbstoff verwendete Laserlinie zur Anregung und der entsprechende Filter zur Detektion der Emission sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Einstellung des Typhoon Gel Scanners für die Detektion der Fluorophore

Fluorophor	Anregungswellenlänge	Detektionsfilter
Alexa 488	488 nm	520 BP 40
Alexa 594	532 nm	610 BP 30

Bei Proben, die zwei Fluorophore enthielten, konnte durch Anregung des Donorfluorophors und Messen der Akzeptoremission überprüft werden, ob Energietransfer in der Probe auftritt. Unmarkierte DNA und Nukleosomen wurden mit Hilfe des Interkalators Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Gel wurde dazu in ethidiumbromidhaltiger Lösung 15 Minuten inkubiert und anschließend unter UV-Bestrahlung fotografiert (UV BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen).

Die Proteine in TAU Gelen wurden durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht. Die Gele wurden nach dem Entfärben mit einer Digitalkamera (Canon Digital IXUS 65, Canon Inc., Dallas, USA) fotografiert.

3.1.4.8 Zentrifugen

Für die Präparation der DNA, der Oktamere und der Nukleosomen wurden eine Tischzentrifuge Centrifuge 5417 R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), eine Varifuge 3.OR (Heraeus, Buckinghamshire, England) und eine Großzentrifuge Sorvall RC-5C (Dupont, Newtown, USA) verwendet.

3.1.5 Software

Im Folgenden sind die Programme beschrieben, die zur Analyse und graphischen Darstellung der erhaltenen Messdaten verwendet wurden.

3.1.5.1 Image Quant

Die von dem Typhoon Scanner aufgenommenen Bilder wurden mit der Software ImageQuant 5.0 (GE Healthcare, Freiburg) bearbeitet. Dabei konnte die gemessene Fluoreszenzemission mit verschiedenen Farben dargestellt werden. Bilder, die von dem gleichen Gel bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge, bzw. mit unterschiedlichen Emissionsbereichen aufgenommen wurden, konnten übereinander gelegt werden. So wurde visualisiert, welche Banden einen, bzw. zwei Fluorophore enthielten, und ob Energietransfer innerhalb der Probe stattfand. Weiterhin konnte mit diesem Programm die Intensität der Fluoreszenz einzelner Banden quantifiziert werden.

3.1.5.2 Quickfit

An die in den FCS Messungen erhalten Daten wurde mit dem Programm Quickfit ein Modell für freie Diffusion angepasst (86,87). Bei der Auswertung wurde angenommen, dass die

Probe aus einer fluoreszierenden Komponente und einer nicht fluoreszierenden Komponente besteht. Die nicht fluoreszierende Komponente ist der Anteil der Probe, der sich im Triplettzustand befindet. Darüber hinaus wurde der Strukturfaktor des Laserfokus vorgegeben (s. Kapitel 2.6). Mit dem Programm wurden aus den Messdaten die Diffusionszeit der fluoreszierenden Spezies, die Anzahl der fluoreszierenden Teilchen im Laserfokus und der Triplettanteil sowie dessen Lebensdauer bestimmt. Für die Kurvenanpassung wurde die Summe der quadratischen Abweichungen mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus minimiert. Aus der Anzahl der fluoreszierenden Teilchen und der Zählrate während der Messung kann die Zählrate pro Teilchen berechnet werden.

3.1.5.3 FRETtchen

Die in dieser Arbeit durchgeführten spFRET Messungen lieferten Datensätze, in denen enthalten war, zu welcher Zeit ein Photon an der Donor- oder Akzeptor-APD detektiert wurde. Für die Auswertung dieser Datensätze wurde das Programm FRETtchen, das von Alexander Gansen während seiner Promotion entwickelt wurde, verwendet (88). Das Programm berechnet zunächst die Zeit, die zwischen dem Eingang von zwei Photonen vergeht. Liegt diese unter einem festzusetzenden Wert, wurden diese Photonen einem Burst (engl. Häufung) zugeordnet. Ein Burst entsteht, wenn ein fluoreszierendes Teilchen durch den Laserfokus diffundiert und während dieser Zeit eine Häufung von Photonen detektiert wird. Für die Auswahl von Bursts können drei weitere Auswahlkriterien festgesetzt werden: die Anzahl der Photonen pro Zeit (Photonenrate), die Burstdauer und die Mindestanzahl von Photonen. Bursts, die durch mehr als nur ein Fluoreszenzmarkiertes Teilchen im Fokus oder durch die Aggregation von vielen Molekülen entstanden sind, weisen eine höhere Photonrate und Burstdauer auf. Von Probenmolekülen, die nur die äußere Region des Laserfokus erreichen, werden nur wenige Photonen detektiert. Diese Ereignisse können durch Festlegen von Auswahlkriterien aus der darauf folgenden Datenauswertung ausgeschlossen werden. Hierfür wurde festgelegt, dass die Bursts aus mindestens 60 Photonen bestehen und Interphotonenzeiten von 120 μs haben mussten. Die Zahl der Photonen pro Zeit wurde hierbei auf zwischen 15 und 80 ms^{-1} beschränkt.

Für jeden Burst berechnet das Programm die Anzahl der Photonen, die von Donor- oder Akzeptor-APD gemessen wurden, die Dauer, über die Photonen emittiert wurden, und den Zeitpunkt, an dem der Burst innerhalb der Messzeit auftrat. Diese Anzahl der Photonen wurde mit dem Programm um Hintergrundphotonen (die Photonen, die detektiert werden, wenn sich kein fluoreszierendes Teilchen im Fokus befindet) korrigiert. Hierzu wurde eine konstante Anzahl von Photonen pro Zeit von der Gesamtphotonenzahl abgezogen (s. Gleichung (3.1)). Der Hintergrund wurde zuvor experimentell bestimmt.

Mit dem Programm wurde auch das Übersprechen von der Donoremission in den Akzeptorkanal und die direkte Anregung des Akzeptorfluorophors berücksichtigt (s. Kapitel 3.1.5.3). Hierfür wurde ein Anteil der Donoremission von der Akzeptoremission abgezogen (s. Gleichung (3.2) und (3.3)). Wie groß der Anteil für die Korrektur des Übersprechens (ω), bzw. der direkten Anregung (σ) war, wurde ebenfalls experimentell bestimmt (s. Kapitel 3.2.6.3). Anschließend wurde für jeden Burst die Proximity Ratio P bestimmt, indem der Anteil Akzeptoremission N_A an der Gesamtphotonenzahl ($N_A + N_D$) berechnet wurde (Gleichung (3.4)).

$$N_D = N_D^{\text{det}} - B_D \quad (3.1)$$

$$N_A = N_A^{\text{det}} - B_A - \omega \cdot N_D \quad (3.2)$$

$$N_A = N_A^{\text{det}} - B_A - (\omega + \sigma) \cdot N_D \quad (3.3)$$

$$P = \frac{N_A}{N_A + N_D} \quad (3.4)$$

- N_D^{det} = Anzahl der während eines Bursts von der Donor-APD gemessen Photonen
- B_D = Anzahl der von der Donor-APD gemessen Hintergrundphotonen
- N_A^{det} = Anzahl der während eines Bursts von der Akzeptor-APD gemessen Photonen
- B_A = Anzahl der von der Akzeptor-APD gemessen Hintergrundphotonen
- ω = Anteil der Donoremission für die Korrektur des Übersprechens
- σ = Anteil der Donoremission für die Korrektur der direkten Anregung
- P = Proximity Ratio

Das Programm speichert die Daten in einer Textdatei mit sieben Spalten. Die Spalten enthalten die Nummer des Bursts (1), die Zeit, zu der der Burst während der Messung detektiert wurde (2), die Burstdauer (3), die Anzahl der Photonen, die von der Donor-APD detektiert wurden (4), und die Anzahl, die von der Akzeptor-APD detektiert wurden (5), die Proximity Ratio (6) und die Anzahl der pro Zeit gemessenen Photonen (7). Diese Daten konnten für die weitere Auswertung von den Programmen Igor und Matlab eingelesen werden.

3.1.5.4 Igor 4.07

Das Programm Igor 4.07 (WaveMetrics, Portland, USA) wurde dazu verwendet, um Histogramme aus den Proximity Ratio zu berechnen. Um verschiedene Proben zu vergleichen, wurden die erhaltenen Histogramme auf den Flächeninhalt von 1 normiert und die relative Häufigkeit der Bursts gegen die Proximity Ratio aufgetragen.

3.1.5.5 Matlab 2008a

Die Histogramme weisen je nach Zusammensetzung der Probe unterschiedliche Populationen auf, die sich im Abstand zwischen den Fluorophoren unterscheiden (s. Abbildung 17). Das Programm Matlab 2008a (MathWorks, Ismaning) wurde dazu verwendet, die verschiedenen Populationen zu quantifizieren. Die Anteile der Probe mit Energietransfer (FRET-Population) und ohne Energietransfer (NoFRET-Population) wurden bestimmt.

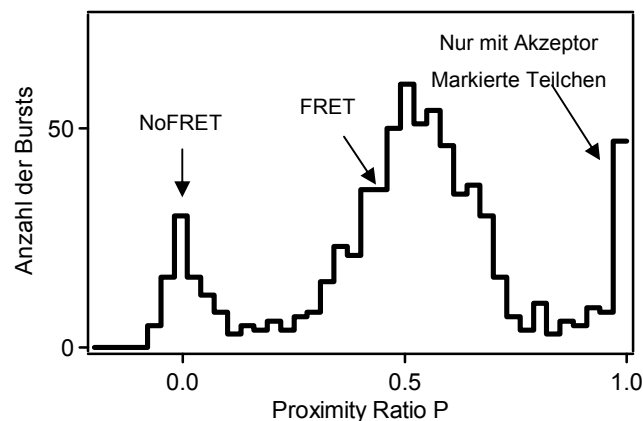


Abbildung 17: Beispielhistogramm der Proximity Ratio Verteilung einer Nukleosomprobe

Die Probe besteht aus Teilchen, die Energietransfer aufweisen (FRET-Population) und einem kleineren Teil an Teilchen, die keinen Energietransfer zeigen (NoFRET-Population). Die Population bei $P = 1$ entsteht durch Teilchen, die ausschließlich mit dem Akzeptorfluorophor markiert sind. Für die weitere Auswertung der Daten wird diese Population vernachlässigt. Darstellung modifiziert aus (97).

Die FRET- und die NoFRET-Populationen können idealerweise mit einer Gaussfunktion oder einer Doppelgaussfunktion beschrieben und so quantifiziert werden. In einigen Fällen ist das Anpassen der Populationen dadurch erschwert, dass eine der zwei Populationen überwiegt und die andere zu wenige Bursts enthält. Dieses Problem wurde berücksichtigt, indem immer nur eine Population mit einer Gaussfunktion angepasst wurde. Das Integral dieser Funktion wurde ins Verhältnis zur Gesamtburstanzahl gesetzt. Das Maximum der Funktion wurde hierbei manuell festgelegt.

3.1.6 Puffer

Die Zusammensetzungen aller in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen sind im Folgenden aufgeführt.

TE Puffer

10 mM Tris
0,1 mM EDTA
pH 7,5

TE+ Puffer

10 mM Tris
1 mM EDTA
1 mM DTT
pH 7,5

TE(spFRET) Puffer

10 mM Tris
0.1 mM EDTA
0.02 % Nonidet P40
1 mM Vitamin C
pH 7,5

TE(FCS) Puffer

10 mM Tris
0.1 mM EDTA
0.02 % Nonidet P40
pH 7,5

Entfaltungspuffer

7M GuHCl
20mM Tris pH 7,5
10 mM DTT

Rückfaltungspuffer

2M NaCl
10 mM Tris pH 7,5
0,1mM EDTA
5 mM β -Mercaptoethanol

Markierungspuffer

7M GuHCl
20mM Tris pH 7,15

Puffer A

25 mM Tris pH 7.5

Puffer B

25 mM Tris pH 7.5
1M NaCl

TBE Puffer

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA
pH 8,0

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation fluoreszenzmarkierter Nukleosomen

3.2.1.1 DNA-Präparation mittels PCR

Die für die Rekonstitution benötigten DNA-Fragmente wurde mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion, engl. Polymerase-Chain-Reaction) aus dem Plasmid pgem3z 601 hergestellt. Hierzu wurde das PCR-Reagenz MasterMix (Promega, Madison, USA) verwendet. Es wurde ein fünffacher Reaktionsansatz (5 ml Gesamtvolumen) gewählt und 40 μ g des Plasmidtemplats und je 3 nmol der Primer eingesetzt. Die Sequenz der Primer ist in

Tabelle 1 aufgeführt.

Die PCR wurde in 200 µl Fraktionen in einem Thermocycler durchgeführt (36 Zyklen bestehend aus 30 Sekunden 96°C, 60 Sekunden 45°C und 60 Sekunden 72°C). Die Effizienz der PCR wurde auf einem 6%-igen native Polyacrylamid-Gel (s. Kapitel 3.2.3.2) kontrolliert.

Anschließend wurde die vervielfältigte DNA durch Zugabe von Ethanol und Natriumacetat zu einer Endkonzentration von 70 % Ethanol und 200 mM Natriumacetat gefällt, pelletiert (10 000 rpm, 60 Minuten bei 4°C, Großzentrifuge Sorvall RC-5C) und in Puffer A (25 mM Tris, pH 7.5) wieder gelöst. Dies war nötig, um alle Pufferbestandteile zu entfernen, die die Aufreinigung der Probe mittels HPLC beeinträchtigen können.

3.2.1.2 Aufreinigung der DNA mittels HPLC

Das Produkt wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. ‚High Performance Liquid Chromatography‘) von Nebenprodukten der PCR, überschüssigem Primer und dem Template getrennt. Hierzu wurde die DNA auf eine Gen-Pak-Fax Ionentauscher-Säule (Waters) aufgetragen und ein Gradient aus Puffer A mit steigendem Anteil Puffer B (25 mM Tris, pH 7.5, 1M NaCl) bei 0,5 ml pro Minute gefahren. Nach Analyse der Fraktionen mittels nativer PAGE (s. Kapitel 3.2.3.2) wurden alle Fraktionen vereinigt, die ausschließlich das gewünschte DNA-Fragment enthielten. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethanol zu einer Endkonzentration von 70 % gefällt. Nach Zentrifugation (10 000 rpm, 60 min bei 4°C, Großzentrifuge Sorvall RC-5C) wurde das Pellet in Puffer (TE mit 5 mM NaCl) aufgenommen.

3.2.1.3 Faltung von Histonoktameren

Für die Präparation von Histonoktameren wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Luger Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* (*X. laevis*) und H2A, H2A.Z, H2B, H3 und H4 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) zur Verfügung gestellt. Diese wurden wie in (89) beschrieben in *E.coli* exprimiert und isoliert.

Für die Faltung von Oktameren wurden alle vier Histone (H2A, H2B, H3 und H4 aus *X. laevis* und H2A/H2A.Z, H2B, H3 und H4 aus *S. cerevisiae*) in Entfaltungspuffer (7M GuHCl, 20mM Tris pH 7,5, 10 mM DTT) gelöst, äquimolar gemischt und zu einer Gesamtproteinkonzentration von 1 mg/ml aufgefüllt. Die Konzentration wurde

spektroskopisch bestimmt. Die hierfür nötigen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Histone (89)

Histon	Organismus	Molekulargewicht [Da]	Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]
H2A	<i>X. laevis</i>	13 960	4050
H2B	<i>X. laevis</i>	13 774	6040
H3	<i>X. laevis</i>	15273	4040
H4	<i>X. laevis</i>	11236	5040
H2A	<i>S. cerevisiae</i>	13 858	4350
H2B	<i>S. cerevisiae</i>	14 106	7500
H3	<i>S. cerevisiae</i>	15 225	2900
H4	<i>S. cerevisiae</i>	11 237	5800
H2A.Z	<i>S. cerevisiae</i>	14 282	4350

Anschließend wurde das Histongemisch bei 4°C gegen Rückfaltungspuffer (2M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 0,1mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol) dialysiert (Dialysekassette Slide-A-Lyzer 7000 MWCO, Pierce, Rockfort, USA). Die Dialyse benötigte insgesamt circa 14 Stunden, wobei der Rückfaltepuffer nach einer und nach zwei Stunden Dialyse erneuert wurde. Die sinkende Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration bewirkt, dass sich die Histone falten und zu Oktameren zusammenfinden. Anschließend wurden die Oktamere mit FPLC von Nebenprodukten der Faltung getrennt.

3.2.1.4 Aufreinigung von Oktameren mittels FPLC

Die Oktamere wurden durch schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (FPLC, engl. ‚Fast Protein Liquid Chromatography‘) über eine Gel-Permeations-Säule von Verunreinigungen wie Proteinaggregaten, Histontetra-, -di- und -monomeren und freien Fluorophoren getrennt. Hierzu wurde das Volumen der dialysierten Oktamere in einem Vivaspin 20 PES (MWCO 10 000) auf unter 500 μl reduziert. Die Probe wurde auf die mit Rückfaltepuffer (ohne β -Mercaptoethanol) äquilibrierte Superdex 200 Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgebracht und mit Rückfaltepuffer bei 0,5 ml/min eluiert. Der Verlauf der Chromatographie wurde mit einem UV-Detektor beobachtet. Für proteinhaltige Fraktionen wurde mit einem TAU-Gel (s. Kapitel 3.2.3.1) kontrolliert, ob alle Histonarten äquimolar vorlagen. Die Konzentration der Probe wurde spektroskopisch wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben bestimmt.

3.2.1.5 Fluoreszenzmarkierung von Histonen

Um FRET zwischen dem Oktamer und der DNA innerhalb eines Nukleosoms messen zu können, müssen geeignete Fluorophore an bestimmte Positionen der Histone gebunden werden. In dieser Arbeit wurden die Histone H4 und H2B markiert. Für die Markierung wurden Histonmutanten verwendet, bei denen eine Aminosäure durch ein Cystein (H2B T112C, H4 E63C aus *X. laevis*, H2B T118C aus *S. cerevisiae*) ersetzt war (89,90). Die Proteine wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Luger zur Verfügung gestellt. Das Cystein reagiert in einer Additionsreaktion mit dem zugegebenen Maleimid zu einem Thioether. Der Fluorophor, Alexa 488, ist über Linker an das Maleimid gebunden (s. Abbildung 18). Die Histonmutanten enthalten außer diesem Cystein kein weiteres Cystein, so dass von einer selektiven Markierung an einer Position ausgegangen werden kann.

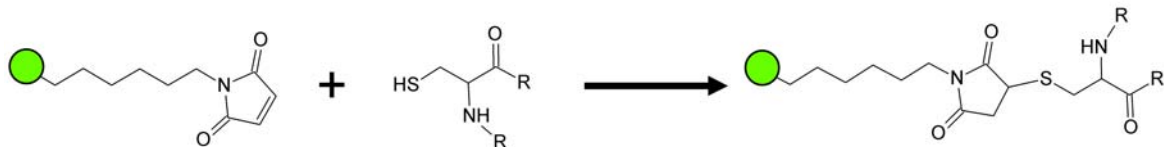


Abbildung 18: Kupplungsreaktion zwischen dem Cystein im Histon und Alexa 488 Maleimid

Über einen Linker aus sechs Methylengruppen ist Alexa 488 (dargestellt durch einen grünen Kreis) an ein Maleimid gebunden. Das Cystein aus der Histonmutante reagiert in einer Additionsreaktion mit dem Maleimid zu einem Thioether.

Für die Markierung wurden die lyophilisierten Histone zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml in Markierungspuffer (7M GuHCl, 20mM Tris pH 7,15) gelöst und eine Stunde lang inkubiert, um die Histone vollständig zu entfalten. Zur Reduktion der Thiolgruppen der Cystein-Seitenketten wurde TCEP (Endkonzentration 1mM) zugefügt. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Alexamaleimid (Stammlösung 10 mM in DMSO) bei 4 °C, unter Schütteln und Ausschluss von Licht zugegeben. Es wurde ein vierfacher Überschuss an Maleimid verwendet, um die Markierungseffizienz zu maximieren. Um die Selektivität der Markierung zu erhöhen, wurde das Maleimid in drei Aliquots im Abstand von je einer Stunde zugegeben, so dass der Überschuss an Maleimid zu jeder Zeit gering war. Eine Stunde nach der letzten Zugabe wurde die Reaktion durch Zugabe von β -Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 120 μ M gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Aufbereitung für die Faltung der Oktamere eingesetzt.

3.2.1.6 Faltung von fluoreszenzmarkierten Oktameren

Fluoreszenzmarkierte Oktamere wurden analog zu unmarkierten Oktameren präpariert. Eines der Histone wurde dabei anteilig durch ein markiertes Histon ersetzt. Es wurde hierbei nur 10 % markiertes Histon (H2B T112C oder H4 E63C mit Alexa 488) eingesetzt. 90 % des

Histons (entweder H2B oder H4) blieb unmarkiert. So konnte der Anteil an Oktameren, die zwei markierte Histone enthalten, gering (~ 1 %) gehalten werden. Das markierte Histon wurde ohne weitere Aufarbeitung nach der Kupplungsreaktion verwendet. Freier Farbstoff wurde im nachfolgenden Schritt, der FPLC, zusammen mit den Nebenprodukten der Dialyse abgetrennt. Die Konzentration der Probe und der Markierungsgrad wurden spektroskopisch wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben bestimmt.

3.2.1.7 Nukleosomen-Rekonstitution

Für die Rekonstitution von Nukleosomen wurden Oktamere und DNA in einem TE Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) bei 2 M NaCl gemischt und die NaCl Konzentration durch Dialyse reduziert. Da das Oktamer sehr stark an die Oberfläche des Gefäßes und der Pippettenspitze bindet, wurden DNA und Oktamer nicht äquimolar gemischt, sondern ein molarer Überschuss (zwischen 1,4 und 2 fach) an Oktamer zugegeben. Das genaue Verhältnis von DNA und Oktamere war abhängig von der jeweiligen Oktamerprobe und musste zunächst empirisch bestimmt werden. Das ideale Verhältnis von DNA und Oktameren war entscheidend. War die Oktamermenge zu hoch, kam es zur Bildung von Aggregaten. War der DNA Anteil zu hoch, lag freie DNA neben den Nukleosomen vor. Beides würde die späteren Experimente stören.

Für die Präparation von Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* wurde die im Labor bereits etablierte Methode der doppelten Dialyse verwendet (21). Nukleosomen aus Histonen aus *S. cerevisiae* wurden nach der in Prof. Dr. Lugers Labor etablierten Methode hergestellt, bei der die NaCl Konzentration langsamer reduziert wird (89).

Rekonstitution mittels doppelter Dialyse

Für die doppelte Dialyse wurde der Ansatz für die Rekonstitution in ein Dialysehütchen (Dialysekassette Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units, 7000 MWCO, Thermo Scientific, Rockfort, USA) gefüllt, das in eine größeres Dialysehütchen (Selbstanfertigung) mit 15 ml TE und 2M NaCl gesetzt wurde. Dieses wurde zuerst für 4,5 Stunden bei 4°C gegen 1 Liter TE und 0,1M NaCl dialysiert. Danach wurde das kleine Dialysehütchen über Nacht gegen TE und 5mM NaCl dialysiert.

Rekonstitution mittels peristaltischer Pumpe

Der Ansatz für die Rekonstitution wurde in ein Dialysehütchen (Dialysekassette Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units, 7000 MWCO, Thermo Scientific, Rockfort, USA) gefüllt und eine Stunde gegen 100 ml TE+ Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5) mit 2 M NaCl dialysiert. Daraufhin wurde der Puffer mit einer peristaltischen Pumpe innerhalb von

27 h mit 600 ml TE+ Puffer ohne NaCl verdünnt. Die NaCl Endkonzentration der Dialyse entsprach 280 mM NaCl.

Die Nukleosomen wurden mit UV/Vis-Spektroskopie auf die Anwesenheit von Aggregaten untersucht. Aggregate wurden gegebenenfalls durch Zentrifugation (8000 rpm, 10 min bei 4°C, Varifuge 3.OR) entfernt. Aus der Absorption der DNA bei 260 nm wurde die Konzentration der Nukleosomen wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben bestimmt. Dabei wurde der Beitrag der Histone zur Absorption vernachlässigt. Die Abwesenheit von freier DNA in den Proben wurde mit nativer PAGE überprüft.

3.2.2 Thermische Mobilisierung von Nukleosomen

Für die thermische Mobilisierung von Nukleosomen wurden Oktamere auf DNA-Fragmenten von 210 bp Länge rekonstituiert. Die Nukleosomen wurden in 5 µl TE Puffer (5 mM NaCl) auf 80 nM Nukleosomenkonzentration verdünnt und in einem 200 µl Reaktionsgefäß für 3 h in einem Heizblock bei 55 °C inkubiert. Die Referenzprobe wurde analog vorbereitet und für drei Stunden bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer wurden die Proben mittels nativer Gelelektrophorese untersucht.

3.2.3 Gelelektrophorese

3.2.3.1 TAU Gel

Um den Erfolg der Oktamerfaltung zu überprüfen, wurden die Oktamere elektrophoretisch aufgetrennt und es wurde überprüft, ob die Histone H2A, H2B, H3, H4 in äquimolaren Verhältnissen vorlagen. Eigens für die Auftrennung von verschiedenen Histonen wurden spezielle Gele entwickelt, Triton-Acetat-Harnstoff (Urea)–Gele (TAU Gele), in denen eine besonders hohe Auftrennung erzielt werden kann (91). Die Polymerisierung des Gels und die Auftrennung fanden in der Gelkammer TV21 statt. Die oberen 4 cm des Gels, in denen sich die Probenaschen befinden, bestanden aus einem weitporigen Sammelgel, das die aufgetragenen Proteine zunächst zu einer schmalen Bande konzentriert. Das darunter liegende Trenngel wies durch die höhere Acrylamidkonzentration eine geringere Porengröße auf und diente der Auftrennung der Proteine. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Pro Geltasche wurden 4 µg Probe in 30 µl Puffer aufgetragen. Hierfür wurden Gelauftragspipettenspitzen (MultiFlex Round Tips, Sorenson, BioScience, Salt Lake City, USA) verwendet. Die Taschen wurden vor dem Auftragen der Proben mehrmals mit 200 µl Laufpuffer gespült. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 400 V für

zehn Stunden in 5%-iger Essigsäure. Nach der Elektrophorese wurden die Positionen der fluoreszierenden Banden mit dem Typhoon Gel Scanner (s. Kapitel 3.1.4.7) bestimmt. Nach der Fluoreszenzmessung wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, um alle Proteine sichtbar zu machen. Dazu wurde das Gel 20 min in einer Coomassie Lösung und anschließend in ca. 1 h Entfärber gebadet.

Tabelle 4: Zusammensetzungen der Lösungen für TAU Gele

Trenngel	Sammelgel
15 % (w/v) Acrylamid	15 % (w/v) Acrylamid
1,3 % (w/v) Bisacrylamid	1,3 % (w/v) Bisacrylamid
8 M Harnstoff	255 mM Kaliumacetat
5 % (v/v) Essigsäure 15,8 mM TritonX 100	8 M Harnstoff 17,2 mM TritonX 100
0,1 µM Thiodiglycol	0,1 µM Thiodiglycol
40 nM TEMED	66 nM TEMED
0,0005 % (w/v) Riboflavin (in 0,1M NaOH)	0,0005 % (w/v) Riboflavin (in 0,1M NaOH)

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und Riboflavin initiiert.

Laufpuffer 5% (v/v) Essigsäure	Coomassie Lösung 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0.2 % (w/v) Coomassie R250
2 X Ladepuffer 8 M Harnstoff 5 % (v/v) Essigsäure	Entfärber 15 % (v/v) Essigsäure 10 % (v/v) Isopropanol

3.2.3.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente und Nukleosomen wurden mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert. Für die native PAGE wurden 6-%ige Gele mit einem Acrylamid-Bisacrylamid Verhältnis von 60:1 in 1 X TBE hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 5 aufgeführt. Pro Tasche wurden 4 µl einer 80 nM Probenlösung mit 1 µl Ladepuffer aufgetragen. Hierfür wurden Gelauftragspipettenspitzen (MultiFlex Round Tips, Sorenson, BioScience, Salt Lake City, USA) verwendet. Die Taschen wurden zuvor

mehrmals mit 60 µl Laufpuffer gespült. Als Referenz wurden 2 µl eines 100 bp DNA Markers (Bioron 100 bp Ladder, Bioron GmbH, Ludwigshafen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 120 V für eine Stunde in 1 X TBE.

Wurden fluoreszenzmarkierte Proben verwendet, wurden die Positionen der fluoreszierenden Banden mit einem Typhoon Gel Scanner (s. Kapitel 3.1.4.7) bestimmt. Die DNA im Gel wurde durch Baden des Gels in ethidiumbromidhaltiger Lösung gefärbt und durch UV-Bestrahlung in einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Tabelle 5: Zusammensetzungen der Lösungen für native PAGE

<p>Gel</p> <p>6 % (w/v) Acrylamid</p> <p>0.1 % (w/v) Bisacrylamid</p> <p>89 mM Tris</p> <p>89 mM Borsäure</p> <p>2 mM EDTA</p> <p>pH 8,0</p> <p>4 nM TEMED</p> <p>0.2 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)</p>	<p>Laufpuffer (1 X TBE)</p> <p>89 mM Tris</p> <p>89 mM Borsäure</p> <p>2 mM EDTA</p> <p>pH 8,0</p>
	<p>5 X Ladepuffer</p> <p>40 % (w/v) Sucrose</p>

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und APS initiiert. Dem Ladepuffer wurde kein Bromphenolblau zugesetzt, da dies die Bildung von freier DNA aus Nukleosomen hervorruft.

3.2.4 Absorptionsspektroskopie

Konzentrationen und Markierungsgrade der Oktamere und der DNA wurden spektroskopisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt (Absorptionsspektrometer s. Kapitel 3.1.4.3).

$$c = \frac{A}{d \cdot \varepsilon} \quad (3.5)$$

c = Konzentration (M)

A = Extinktion

d = Schichtdicke der Küvette in cm

ε = dekadischer Extinktionskoeffizient in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$

Für die Konzentrationsbestimmung der Oktamere wurde die Extinktion bei 278 nm verwendet, für die der DNA die Extinktion bei 260 nm. Für fluoreszenzmarkierte Proben wurde die Extinktion der Fluorophore Alexa 488 und Alexa 594 bei 278 nm, bzw. 260 nm berücksichtigt (s. Gleichung (3.6) und (3.7)). Die verwendeten Korrekturfaktoren wurden den Herstellerangaben entnommen. Der Markierungsgrad berechnet sich nach Gleichung (3.8) und (3.9).

$$A(DNA) = A(260nm) - 0.43 * A(590nm) - 0.3 * A(495nm) \quad (3.6)$$

$$A(Oktamer) = A(278nm) - 0.56 * A(590nm) - 0.11 * A(495nm) \quad (3.7)$$

$$Markierungsgrad(DNA) = \frac{c(Fluorophor)}{c(DNA)} \quad (3.8)$$

$$Markierungsgrad(Oktamer) = \frac{c(Fluorophor)}{c(Oktamer)} \quad (3.9)$$

Tabelle 6: Wellenlänge des Fluoreszenzabsorptionsmaximums und Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge für eingesetzte Fluorophore, DNA und Oktamere

Probe	λ_{max}	ϵ
Alexa 594	590 nm	90 000 cm ⁻¹ M ⁻¹
Alexa 488	495 nm	71 000 cm ⁻¹ M ⁻¹
170 bp DNA-Fragment	260 nm	2 224 000 cm ⁻¹ M ⁻¹
Histon Oktamer <i>X. laevis</i>	278 nm	40 380 cm ⁻¹ M ⁻¹
Histon Oktamer <i>S. cerevisiae</i>	278 nm	40 600 cm ⁻¹ M ⁻¹
Histon Oktamer <i>S. cerevisiae</i> /H2A.Z	278 nm	40 600 cm ⁻¹ M ⁻¹

Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleosomproben wurde die Extinktion der DNA bei 260 nm verwendet. Dabei wurde der Beitrag der Histone, bzw. der Fluorophore zur Extinktion bei dieser Wellenlänge vernachlässigt.

3.2.5 Fluoreszenzanisotropiemessung

Zur Bestimmung der Anisotropie in fluoreszenzmarkierten Nukleosomen wurden Anregungs- und Emissionspolarisatoren in den Strahlengang des Fluorimeters eingefügt. Bei Anregung

mit vertikal polarisiertem Licht der entsprechenden Wellenlänge wurde die Intensität der horizontal und vertikal polarisierten Emission gemessen (s. Kapitel 2.4 und Abbildung 9). Dabei wurde berücksichtigt, dass in der Regel die Transmissionseffizienz des Monochromators für horizontal und vertikal polarisiertes Licht voneinander abweicht. Nach Gleichung (3.11) wurde deshalb ein Korrekturfaktor (G) hierfür bestimmt (81). Für die Bestimmung von G wurde ausgenutzt, dass bei Anregung mit horizontal polarisiertem Licht bei der Detektion der Emission das horizontal polarisierte Licht entlang der Beobachtungsachse liegt und das elektrische Feld gleichmäßig entlang der Beobachtungsachse verteilt ist. Unterschiede in der Detektion bei unterschiedlichen Einstellungen des Monochromators entsprechen daher dem Unterschied in der Transmissionseffizienz des Monochromators.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (3.10)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (3.11)$$

- r = Anisotropie (dimensionslos)
- I_{XY} = gemessene Intensität bei Anregung mit X Licht und bei Y Emission
- H = horizontal polarisiert
- V = vertikal polarisiert
- G = Korrekturfaktor für den Monochromator

Für die Messung wurde die Konzentration der Probenlösung auf maximal 0.05 eingestellt, um Messfehler durch Reabsorptionseffekte zu vermeiden. Alexa 488 wurde bei 495 nm angeregt und die Emission bei 523 nm gemessen. Alexa 594 wurde bei 585 nm angeregt und die Emission bei 616 nm gemessen. Die Emission wurde über 5 Sekunden gemittelt.

3.2.6 Einzelmolekülspektroskopie

3.2.6.1 Aufbau des Einzelmolekülmikroskops

Das Einzelmolekülmikroskop bestand aus einem konfokalen inversen Mikroskop (Olympus IX70), in welches über eine Glasfaser die Laserlinien eines Multiline Argon/Kryptonlasers (Melles Griot, Darmstadt) geleitet wurden (s. Abbildung 19). Mit einem akustooptisch einstellbaren Filter (AOFT) (AA Optoelectronics, Orsay, Frankreich) wurde die für das

Experiment benötigte Laserlinie mit der Wellenlänge 488 nm ausgewählt. Dabei passierte der Strahl eine Teleskopeinheit (TL1 und TL2), die zur Strahlaufweitung dient, und wurde dann über zwei Spiegel geleitet. Mit diesen Spiegeln konnte der Strahlverlauf zur Justage verschoben werden. Über einen dichroitischen Spiegel wurde der Laserstrahl zum Objektiv geführt (DC1). Ein Teil des von der Probe emittierten Lichts wurde über dieses Objektiv gesammelt und passierte den dichroitischen Spiegel. Die Lochblende (100 μm) trennte die Strahlung ab, die nicht aus dem Fokusbildungsvolumen stammt. Durch einen weiteren dichroitischen Spiegel (DC2) wurde die Donor- von der Akzeptoremission getrennt und über Emissionsfilter auf zwei Avalanche-Photodioden (APD, SPCM_AQ_14, PerkinElmer, Boston, MA, USA) projiziert.

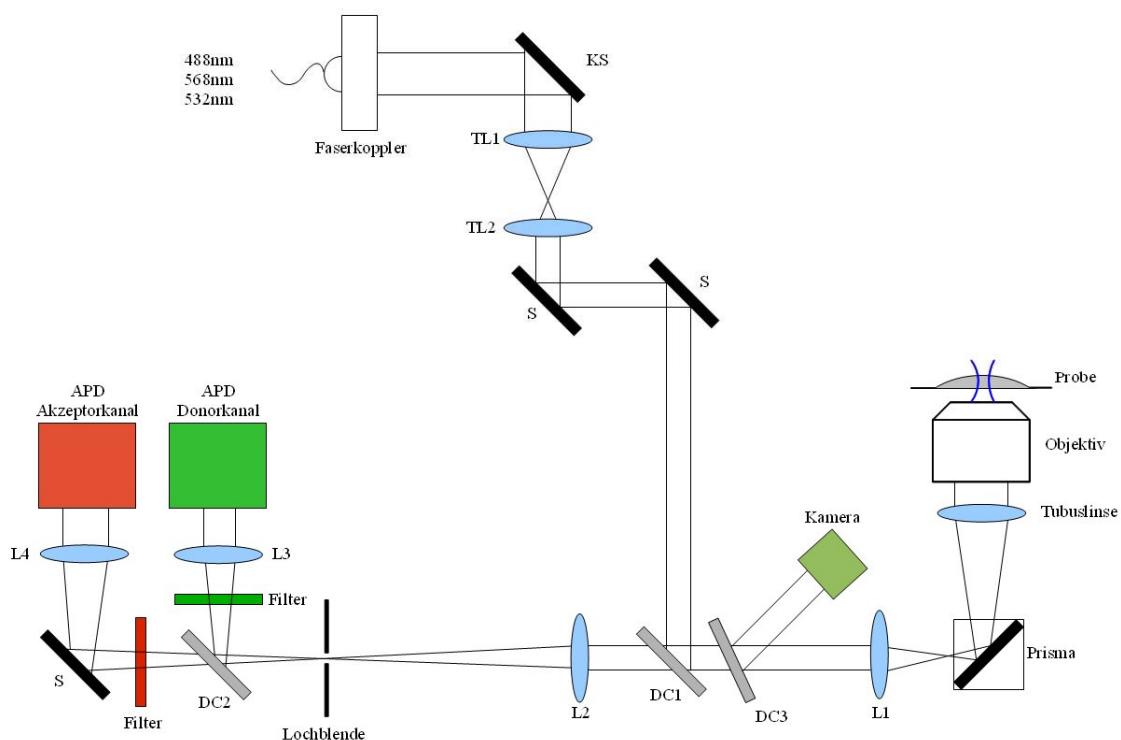


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Mikroskopeinheit

Der Laserstrahl wurde über eine Glasfaser in die Mikroskopeinheit geleitet. Mit einem AOTF wurde die Wellenlänge 488 nm ausgewählt. Abkürzungen: S: Spiegel, DC: Dichroitischer Spiegel, L: Linse, TL: Teleskoplinse, Abbildung aus (80) übernommen und modifiziert.

Die für die jeweiligen Farbstoffe verwendeten dichroitischen Spiegel und Filter können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Filter und Spiegel zur Detektion der Fluoreszenzemission von Alexa 488/594

Position	Spezifikation
Dichroit Anregung (DC1)	Dual-Notch-Filter BrightLine FF498/581 (Semrock, Tübingen)
Dichroit Emission (DC2)	600DCXR (Omega Optical, Brattleboro, USA)
Dichroit Emission (DC3)	BSF10-A1 (Thorlabs, München)
Emissionsfilter Donor	520DF40 (Omega Optical, Brattleboro, USA)
Emissionsfilter Akzeptor	610 ALP (Omega Optical, Brattleboro, USA)

3.2.6.2 Messkammern

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Messungen in einer mit Sigmacote (Sigma) beschichteten Mikrotiterplatte (Senseoplate plus, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) durchgeführt. Die Mikrotiterplatte enthält 384 Messkammern, jede mit einem Arbeitsvolumen zwischen 20 und 150 μl . Der Boden der Platte besteht aus Glas.

Die Beschichtung der Kammern wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt: Hierfür wurden 100 μl der Lösung in die gereinigten und trockenen Kammern gefüllt und nach ca. 10 sec wieder entnommen. Die Lösung wurde viermal wieder verwendet, bevor sie verworfen wurde. Die Kammern wurden wenige Minuten an der Luft getrocknet und anschließend zehnmals mit Wasser gespült.

Vor dem ersten Benutzen der Kammern und nach den Experimenten wurde die Mikrotiterplatte gereinigt. Dazu wurde je zweimal eine 1-%ige Hellmanex Lösung und eine 1 M Natronlauge in die Kammern gefüllt und nach 20 min Inkubationszeit zehnmals mit Wasser gespült.

Für einige Messungen wurden IBIDI Platten (μ -Slide, IBIDI GmbH, Martinsried) verwendet. Die IBIDI Platten bestehen aus 18 Kammern mit einem Arbeitsvolumen zwischen 20 und 30 μl . Die Kammern sind unbeschichtet. Nach Herstellerangaben ist die Oberfläche hydrophob.

3.2.6.3 Justage

Zu Beginn jedes Messtags wurde die Form des Laserfokus optimiert. Der Laserfokus ist optimal, wenn der Anregungsstrahl senkrecht zur Probenkammer einfällt. Dies zeigt sich darin, dass die Rückreflexe von der Probenkammer runde, gleichmäßig helle Kreise zeigen. Die Rückreflexe wurden von einem Strahlteiler (BSF10-A1, Thorlabs, DC3 s. Abbildung 19) auf eine Kamera (V-Security.de, Mini Überwachungskamera Color, System-SicherheitsTechnik GmbH, Leipzig) abgebildet und können auf einem Bildschirm angezeigt

werden. Für die Optimierung des Laserfokus wurden die Positionen der Spiegel und des dichroitischen Spiegels DC1 variiert. Gleichzeitig wurde der Lichtweg der Detektion optimiert. Hierzu wurden die Linsen vor den APDs und der dichroitische Spiegel DC1 so eingestellt, dass an den APDs eine maximale Zählrate gemessen wurde. Die Deckglaskorrektur wurde am Objektiv durchgeführt. Die Einstellung wurde so gewählt, dass die Autokorrelationsfunktion eine maximale Amplitude aufwies. Dazu wurden FCS Messungen von 5 sec durchgeführt. Zuletzt wurde die Laserintensität durch Verschieben der Glasfaser eingestellt. Für die Justage wurde eine 10 nM Alexa 488 Lösung verwendet.

3.2.6.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Für Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wurde die Intensität des Anregungslichts auf 20 μ W eingestellt. Die Signale der APDs wurden von einem ALV5000/E Autokorrelator (ALV GmbH, Langen) ausgelesen. Mit der Software Quickfit (s. Kapitel 3.1.5.2) wurden die Diffusionszeit und die Teilchenzahl im Fokus bestimmt.

Mit FCS wurden die Dissoziation von Nukleosomen und die Assemblierung von DNA und Oktameren untersucht. Für die Messungen wurden Proben verwendet, die ausschließlich an einer Untereinheit mit Alexa 488 markiert waren. Dieser Fluorophor wird optimal mit der Wellenlänge 488 nm angeregt. In Abwesenheit eines Akzeptorfluorophors wurde die molekulare Helligkeit der Proben nicht durch Energietransfer beeinträchtigt.

Für die Analyse des Zerfallsmechanismus wurden die Nukleosomen in TE(FCS) Puffer mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen zw. 150 mM und 1100 mM auf 20 nM verdünnt und der Diffusionskoeffizient nach 90 min Inkubationszeit relativ zu einem Standard bestimmt. Als Standard wurde freier Alexa 488 Fluorophor verwendet. Das Detergens Nonidet P40 wurde dem TE(FCS) Puffer zugefügt, um die Adsorption der Nukleosomen an der Gefäßoberfläche zu reduzieren. Außerdem verhindert es die Bildung von Aggregaten bei hoher Salzkonzentration (92). Vor der Messung wurde der Puffer in einer FCS Messung auf Reinheit überprüft. Puffer, in denen vor der Zugabe der Probe bereits Autokorrelation beobachtet wurde, wurden verworfen.

Für die Analyse der Assemblierung wurden Nukleosomen aus DNA und Oktameren rekonstituiert. Der Ansatz für die Rekonstitution wurde wie in 3.2.1.7 beschrieben gemischt. Die Dialyse wurde für die Untersuchung mittels Einzelmolekülspektroskopie jedoch in acht Stufen von je 30 min (zwischen 2 M und 300 mM) durchgeführt. Vor jedem Pufferwechsel wurde ein Aliquot des Ansatzes auf 20 nM verdünnt und direkt der Diffusionskoeffizient relativ zu freiem Alexa 488 bestimmt.

3.2.6.5 spFRET-Experimente

Für die spFRET Messungen wurde die Intensität des Anregungslichts auf 100 μ W eingestellt. Die Signale der APDs wurden mit einer TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) Karte (TimeHarp200, Picoquant GmbH, Berlin) ausgelesen und mit der von Alexander Gansen entwickelten Software FRETtchen (s. Kapitel 3.1.5.3) ausgewertet. Vor spFRET Experimenten wurde die für die Auswertung benötigten Korrekturfaktoren ermittelt. Dies und die Abläufe der mit spFRET durchgeführten Messungen sind im Folgenden beschrieben.

Bestimmung der Korrekturfaktoren

Mit dem Programm FRETtchen wurden die Messdaten um die Hintergrundphotonen, das Übersprechen und die direkte Anregung korrigiert (s. Kapitel 3.1.5.3). Zu Beginn jedes Messtages wurden die hierfür nötigen Parameter bestimmt.

Eine Messung von reinem Puffer wurde durchgeführt, und so die Anzahl der Hintergrundphotonen (Photonen, die detektiert werden, wenn sich kein Teilchen im Fokus befindet) bestimmt. Wurde in reinem Puffer bereits mehr als 1 Burst pro Minute detektiert, wurde der Puffer verworfen.

Eine Messung wurde mit Nukleosomen (40 nM) durchgeführt, die nur Alexa 488 an H2B enthielt, um das Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal zu bestimmen. Ein Histogramm wurde berechnet und mit einer Gaussfunktion angepasst. Der Wert des Maximums dieser Funktion wurde in FRETtchen als ω eingetragen (s. Kapitel 3.1.5.3). Für Proben, in denen sowohl Donor- als auch Akzeptorfluorophore an die DNA gebunden waren, und somit immer beide Fluorophore gleichzeitig das Fokusvolumen passierten, wurde zusätzlich σ bestimmt. Hierzu wurde eine Messung mit einer DNA, die mit Donor und Akzeptorfluorophor markiert war (40 pM), durchgeführt. Auch hier wurde ein Histogramm berechnet und mit einer Gaussfunktion angepasst. Der Wert des Maximums dieser Funktion wurde in FRETtchen als $(\omega + \sigma)$ eingetragen.

Mechanistische Analyse der Assemblierung und der Dissoziation von Nukleosomen

Die Analyse der Assemblierung und der Dissoziation von Nukleosomen mittels spFRET wurde bis auf drei Änderungen analog zu den FCS Experimenten durchgeführt.

Dem benutzten TE(spFRET) Puffer wurde neben dem Detergens Nonidet P40 auch Vitamin C zugefügt. Vitamin C reduziert als Radikalfänger den Anteil an Singulett-Sauerstoff in der Lösung und erhöht dadurch die Photostabilität der Fluorophore. Da es die Lebensdauer des Triplettzustands erhöht und dadurch die Auswertung der FCS Experimente erschwert, wurde es für diese Messungen nicht verwendet.

Für die Messungen wurden Nucleosomen verwendet, die sowohl mit dem Donorfluorophor Alexa 488 als auch mit dem Akzeptorfluorophor Alexa 594 markiert waren. Alexa 488 war entweder an dem H2A-H2B Dimer, dem (H3-H4)₂ Tetramer oder der DNA gebunden, Alexa 594 war jeweils an der DNA gebunden.

Bei den Messungen wurde eine geringere Nucleosomenkonzentration verwendet, um die grundlegende Bedingung für Einzelmolekülexperimente zu erfüllen, nämlich dass sich zu jeder Zeit maximal ein markiertes Nucleosom im Fokus befinden darf. Dies ist bei dem verwendeten Einzelmolekülmikroskop für eine Probenkonzentration von 40 pM optimal erfüllt (93). Da hier bei Nucleosomen, die den Donorfluorophor am Histon tragen, nur ~ 20 % der Nucleosomen einen Donorfluorophor enthalten, wurde die Konzentration entsprechend auf 250 pM erhöht. Die Verdünnung der Nucleosomen wurde in einem Schritt durchgeführt. Hierbei wurden 0.7 µl der Probe in ein entsprechendes Volumen des Messpuffers gegeben und durch Schütteln des Reaktionsgefäßes (20 X) gemischt. Bei Nucleosomen, die beide Fluorophore an der DNA tragen und somit einen Markierungsgrad von ~ 100 % aufweisen, wurde ein entsprechender Anteil unmarkierter Nucleosomen zugefügt. Hierzu wurden 20 % markierte und 80 % unmarkierte Nucleosomen bei ~ 300 nM Nucleosomenkonzentration gemischt und vorsichtig geschüttelt. Für jede Messung wurde ein Aliquot dieser Mischung in den vorgelegten Messpuffer gegeben.

Analyse der Reassemblierung von Nucleosomen

Für die Analyse der Reassemblierung wurden Nucleosomen zunächst 90 min bei 900 mM NaCl inkubiert. Ein Aliquot der Probe wurde entnommen und in einer spFRET Messung untersucht. Die übrige Probe wurde zu einer niedrigeren NaCl Konzentration und 250 pM Nucleosomenkonzentration verdünnt. Hierzu wurde ein entsprechendes Volumen TE(spFRET) Puffer ohne NaCl zu der Probe gegeben und durch Schütteln des Reaktionsgefäßes (20 X) gemischt. 20 min nach der Verdünnung wurde die Stabilität der Nucleosomen durch eine spFRET Messung überprüft.

Um einen möglichen Effekt der Verdünnung und der Pipettierschritte auf die Stabilität auszuschließen, wurden Positivkontrollen durchgeführt. Hierfür wurden Nucleosomen unter stabilen Bedingungen (niedrige NaCl Konzentrationen) und 500 pM Nucleosomenkonzentration 90 min inkubiert und mit Puffer der gleichen NaCl Konzentration auf 250 pM Nucleosomenkonzentration verdünnt. Auch hier wurden die Proben vor und nach der Verdünnung in spFRET Messungen verglichen.

Nachweis des Austauschs von Histonen zwischen Nukleosomen

Um zu zeigen, dass das H2A-H2B Dimer von dem Nukleosom abdissoziieren und an ein anderes Hexasom binden kann, wurden zwei unterschiedlich markierte Nukleosomen äquimolar gemischt: Nukleosomen, die nur an H2B mit dem Donorfluorophor (Alexa 488) markiert waren und Nukleosomen, die nur an der DNA mit dem Akzeptorfluorophor (Alexa 594) markiert waren. Dabei betrug die NaCl Konzentration entweder 760 mM (destabilisierende Bedingungen) oder 380 mM (stabilisierende Bedingungen) und die Gesamtnukleosomenkonzentration 500 pM. Nach 90 min Inkubation wurde ein Aliquot der Probe in einer spFRET Messung analysiert. Die übrige Probe wurde zu 380 mM NaCl und 250 pM Nukleosomenkonzentration verdünnt und nach 20 min Inkubation wiederum in einer spFRET Messung analysiert.

4 Biochemische und fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung

Für die Rekonstitution von Nukleosomen wurden zunächst die einzelnen Komponenten, fluoreszenzmarkierte DNA und fluoreszenzmarkierte Oktamere, präpariert. Daraus wurden für die Untersuchung der Nukleosomendynamik und des Einflusses der Histonvariante H2A.Z neun Nukleosomenkonstrukte hergestellt, die sich in der Position der Fluorophore oder der Histonzusammensetzung unterscheiden. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Probenpräparation (4.1 Präparation fluoreszenzmarkierter Nukleosomen) und die Validierung der Proben für die Einzelmolekülspektroskopie (4.2 Validierung der Proben) beschrieben.

4.1 Präparation fluoreszenzmarkierter Nukleosomen

4.1.1 DNA-Präparation

Für die Experimente wurden DNA-Fragmente mit der sog. 601 Positionierungssequenz gewählt. Diese Sequenz wurde 1999 von Thåström aus einer Vielzahl von zufällig generierten Sequenzen als die Sequenz isoliert, die das Oktamer am stärksten bindet (85). Mit dieser artifiziellen Sequenz können Nukleosomproben hergestellt werden, in denen das Oktamer einheitlich an die DNA bindet. Markierte Positionen auf der DNA kommen dadurch immer an der gleichen Stelle auf der Oktameroberfläche zu liegen. Für die Fragmente wurde eine Länge von 170 bp gewählt. Davon binden ~150 bp nach der Rekonstitution an das Oktamer, ~20 bp bilden sog. DNA-Arme.

Mit präparativen PCR (Kapitel 3.2.1.1) wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Plasmid pgem3z 601 vervielfältigt. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern wurden dabei an gezielten Basen Fluorophore, entweder Alexa 488 oder Alexa 594, eingeführt (s. Abbildung 20).

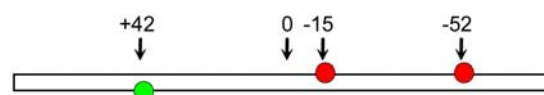


Abbildung 20: Schematische Darstellung der markierten Positionen innerhalb der DNA-Fragmente.

Die Nummerierung (+42, -15 und -52) bezieht sich auf die Anzahl der Basepaare, die die markierte Base nach der Rekonstitution der Nukleosomen von der Dyadenachse des Nukleosoms (hier gekennzeichnet durch 0) entfernt liegt. Darstellung modifiziert aus (97).

Der Markierungsgrad des Fragments hängt dabei von der Qualität des eingesetzten Primers ab. In der Regel wurde ein Markierungsgrad von annähernd 100 % erreicht (s. Tabelle 8). Das erhaltene Fragment wurde mit Hilfe von HPLC von unverbrauchten Primern, dem Template, den freien Nukleotiden und Fragmenten anderer Länge, die bei der PCR als Nebenprodukte entstanden sind, getrennt (Abbildung 21).

Die Elutionsfraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und durch eine Ethanolfällung auf 300 µL konzentriert. Die Gesamtausbeute einer DNA-Präparation (5 ml Ansatzgröße) betrug in der Regel 50 µg DNA.

Tabelle 8: Markierungsgrad der verwendeten DNA-Fragmente
Die Berechnung des Markierungsgrad erfolgte wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

DNA-Fragment	Markierungsgrad Alexa 488	Markierungsgrad Alexa 594
170 bp DNA ⁻¹⁵	-	99.9 %
170 bp DNA ⁻⁵²	-	99.3 %
170 bp DNA ^{+42, -52}	96.0 %	99.2%
170 bp DNA ⁺⁴²	95.4 %	-

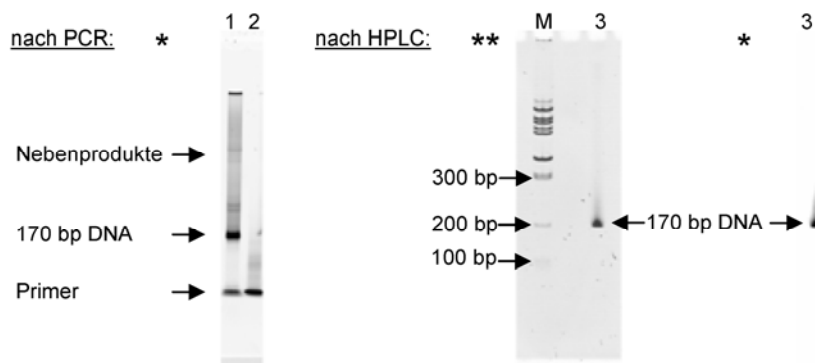


Abbildung 21: Aufreinigung eines DNA-Fragments

Exemplarische Darstellung einer Gelelektrophorese eines DNA-Fragments nach der PCR und nach der anschließenden Aufreinigung durch HPLC. 1) Probe nach der PCR: Neben dem gewünschten PCR Produkt liegen unverbrauchter Primer und längere DNA-Fragmente in der Probe vor. 2) Negativ-Kontrolle der PCR: Wird dem PCR Ansatz kein Template zugeführt, läuft die PCR nicht ab. Die Kontrolle dient als Test, ob die vervielfältigte Sequenz aus dem Template und nicht aus einer DNA-Verunreinigung im Reaktionsansatz stammt, 3) Probe nach der Aufreinigung mittels HPLC, M) 100 bp DNA Standard (Bioron), *Bild der Fluoreszenzemission von Alexa 594, ** Bild nach Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid.

4.1.2 Oktamerpräparation

Die Oktamere wurden wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben aus den einzelnen denaturierten Histonen durch Dialyse gegen einen TE Puffer mit 2 M NaCl hergestellt.² Es wurden Haupthistone H2A, H2B, H3 und H4 aus den Organismen *X. laevis* und *S. cerevisiae* verwendet. Der Einfluss von H2A.Z wurde mit dem Histon H2A.Z aus *S. cerevisiae* untersucht. Für die Einführung von Fluoreszenzmarkierungen wurden Histonmutanten, in denen eine Aminosäure durch Cystein ersetzt war, verwendet (H2B T112C, H4 E63C aus *X. laevis* und H2B T118C aus *S. cerevisiae*).

In dieser Arbeit wurde eine Strategie entwickelt, Histonoktamere für die Einzelmolekülspektroskopie zu markieren. Im Folgenden wird zunächst diese Strategie und im Anschluss daran die Präparation der Oktamere und deren Analyse beschrieben.

4.1.2.1 Markierungsstrategie

Jedes Histon (H2A, H2B, H3 und H4) liegt zweifach im Oktamer vor. Da die Faltung von Histonen zum Oktamer statistisch erfolgt, ist es nicht möglich, Oktamere herzustellen, die genau ein fluoreszenzmarkiertes Histon enthalten. In der resultierenden Probe werden immer doppelmarkierte, einfachmarkierte und unmarkierte Oktamere nebeneinander vorliegen.

Für die Verwendung dieser Proben in FCS Messungen und in spFRET Messungen ist das ein deutlicher Nachteil. Teilchen, die einen Fluorophor tragen, und Teilchen, die zwei Fluorophore tragen, unterscheiden sich in ihrer molekularen Helligkeit. Dadurch tragen sie in FCS Messungen nicht gleichmäßig zur Autokorrelationsfunktion bei (79).

Die Markierung von Oktameren für spFRET Messungen ist noch schwieriger, da nicht nur ein Fluorophor, sondern ein Fluorophorpaar nötig ist. Werden zwei Histone im Oktamer fluoreszenzmarkiert, erhält man eine Probe mit 10 unterschiedlichen Teilchen, von denen sich sieben in der Transfereffizienz unterscheiden (s. Abbildung 22). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass es nicht nur zwischen Donor und Akzeptor, sondern auch zwischen identischen Fluorophoren zu Energietransfer kommt (94).

Erreicht man einen Markierungsgrad von 100 %, kann eine nahezu einheitliche Probe hergestellt werden. Diese besteht aus Oktameren, die zwei Donorfluorophore und zwei Akzeptorfluorophore tragen. Bei der Dissoziation des Oktamers, die im Folgenden untersucht werden soll, entstehen jedoch Teilchen, die sich in der Anzahl der Fluorophore

² Die eingesetzten Histone wurden von Prof. Dr. Luger zur Verfügung gestellt.

unterscheiden. Es ist kaum möglich, dabei aus den gemessenen Änderungen der Fluoreszenzemission auf Konformationsänderungen innerhalb des Oktamers zu schließen.

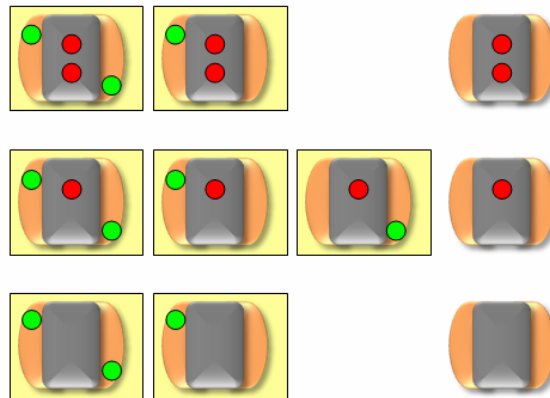


Abbildung 22: Illustration der verschiedenen Oktamere mit zwei fluoreszenzmarkierten Histonen

(orange H2A-H2B Dimer, grau (H3-H4)₂ Tetramer, grüne, bzw. rote Kreise, Fluorophore) Gelb hinterlegt sind diejenigen, die sich in der Energietransfereffizienz unterscheiden.

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Markierungsstrategie verwendet, mit der dieses Problem umgangen werden kann. Oktamere wurden hergestellt, in denen lediglich ein Histontyp, entweder H2B oder H4, markiert wurde. Nur 10 % dieses Histons wurden markiert, 90 % blieben unmarkiert. Bei der Faltung des Oktamers, bei der markierte und unmarkierte Histone statistisch eingebaut werden, entstehen daher 81 % unmarkierte Oktamere, 18 % Oktamere, die genau einen Fluorophor enthalten, und 1 % Oktamere, die zwei Fluorophore enthalten (siehe Abbildung 23).

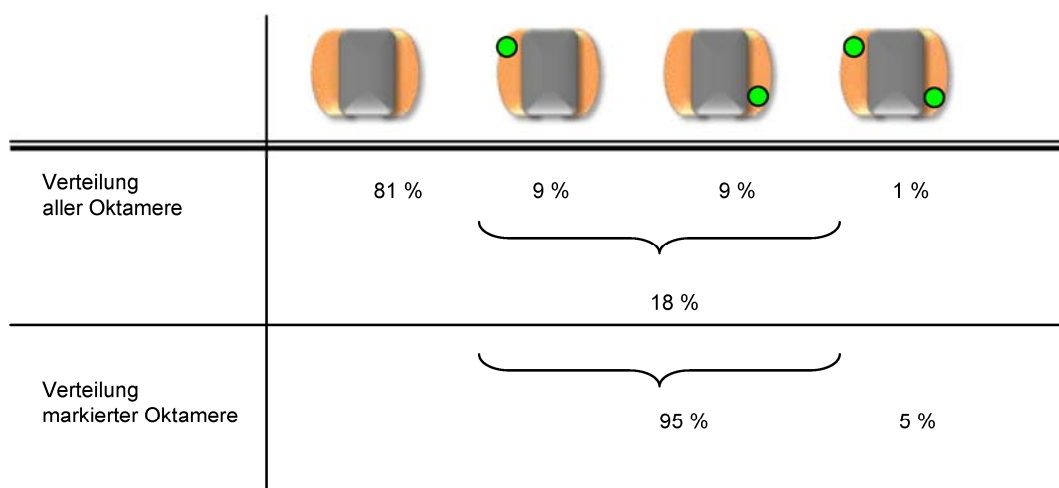


Abbildung 23: Illustration der Oktamerverteilung bei Einsatz von 10 % markiertem Histon

Bei der Verwendung der hier beschriebenen Markierungsstrategie enthalten nach der Faltung 18 % Oktamere einen Fluorophor und 1% Oktamere zwei Fluorophore. 81 % bleiben unmarkiert. Der Anteil der Oktamere mit zwei Fluorophoren an fluoreszenzmarkierten Oktameren beträgt lediglich 5 % (exemplarisch für Oktamere, in denen das Histon H2B fluoreszenzmarkiert wurde).

In FCS Messungen können nur fluoreszenzmarkierte Teilchen detektiert werden. 95 % der fluoreszenzmarkierten Teilchen sind einfach markiert. Lediglich ein vernachlässigbar kleiner Anteil von 5 % trägt zwei Fluorophore.

Um spFRET Experimente durchzuführen, müssen Nucleosomen hergestellt werden, die einen Donor- und einen Akzeptorfluorophor tragen (Moleküle, die einen Donor- und einen Akzeptorfluorophor tragen, werden im Folgenden als FRET markiert bezeichnet). Der Donorfluorophor wurde wie zuvor beschrieben an ein Histon gebunden. Der Akzeptorfluorophor wurde an die DNA gebunden. Dabei kann eine Position spezifisch zu ~ 100 % markiert werden. Die Zusammensetzung der mit dieser Strategie hergestellten Proben für spFRET Messungen ist in Abbildung 24 dargestellt. Alle Nucleosomen sind mit einem Akzeptorfluorophor markiert. Dabei tragen 81 % keinen Donorfluorophor, 18 % genau einen und nur 1 % zwei Donorfluorophore.

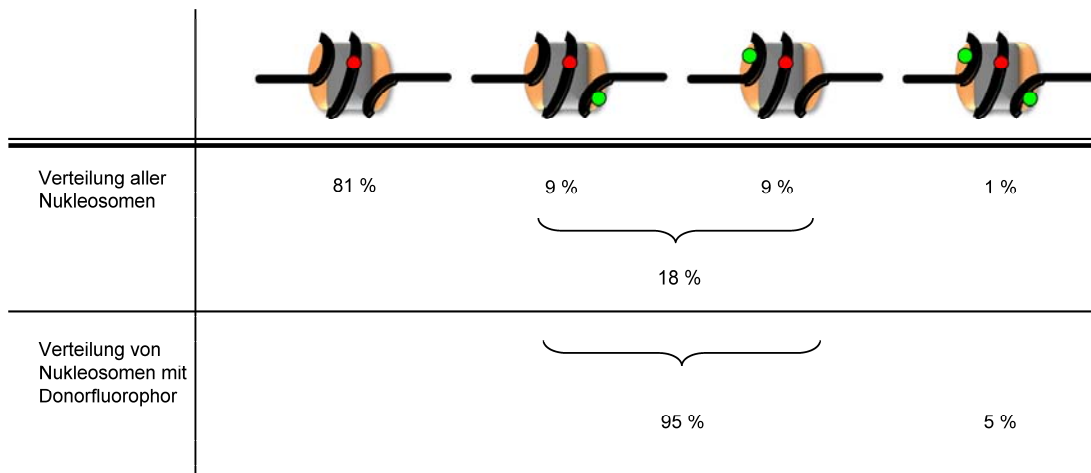


Abbildung 24: Illustration der Nucleosomenverteilung bei Einsatz von 10 % markiertem Histon
 Bei der Verwendung der hier beschriebenen Markierungsstrategie entstehen nach der Rekonstitution 18 % FRET markierte Nucleosomen (exemplarisch für H2B-DNA⁻⁵²). Nucleosomen, die keinen Donorfluorophor tragen, können bei der Auswertung ausgeschlossen werden. Von den Nucleosomen mit Donorfluorophor sind 95 % FRET markiert. Lediglich 5 % dieser Nucleosomen sind mit zwei Donorfluorophoren markiert.

Die 81 % der Nucleosomen, die nur mit einem Akzeptorfluorophor markiert sind, können bei der Auswertung der experimentellen Daten ausgeschlossen werden. Dies ist möglich, da in FRET Messungen der Donorfluorophor angeregt wird. Teilchen, die lediglich einen Akzeptorfluorophor tragen, werden nicht oder nur sehr schwach angeregt. Da sie keinerlei Emission des Donors aufweisen und auch durch die schwache Anregung nur eine geringe Emission zeigen, können sie von Teilchen, die einen Donorfluorophor tragen, unterschieden werden.

Von den übrigen Nukleosomen tragen 95 % einen Donorfluorophor und lediglich 5 % zwei Donorfluorophore. Wie auch in den FCS Experimenten sind die 5 % der Nukleosomen mit zwei Donorfluorophoren vernachlässigbar.

Die hier beschriebene Markierungsstrategie ist nur in Kombination mit spFRET erfolgreich. Der durchschnittlichen Energietransfer aller Nukleosomen, der in Ensemble-FRET Experimenten bestimmen wird, ist sehr klein, da nur ein geringer Anteil der Nukleosomen FRET markiert ist und der Anteil an Nukleosomen, die nur mit dem Akzeptor markiert sind, überwiegt. Konformationsänderungen der Nukleosomen können nur minimale Änderungen des durchschnittlichen Energietransfers verursachen. In einer spFRET Messung hingegen wird für ca. 1000 einzelne Nukleosomen die Transfereffizienz bestimmt. Aus diesen Daten werden Histogramme berechnet, aus denen abgelesen werden kann, wie die Abstände in der Probe verteilt sind. Nukleosomen, die lediglich einen Akzeptorfluorophor tragen, werden dabei nicht berücksichtigt. Änderungen in den Abständen zwischen den Fluorophoren können anhand der Histogramme genau charakterisiert werden.

Bei der hier vorgestellten Markierungsstrategie ist auch möglich, weniger als 10 % fluoreszenzmarkiertes Histon einzusetzen. Der Anteil von Histonoktameren, die zwei Donorfluorophore tragen, an markierten und somit detektierbaren Oktameren sinkt (s. Abbildung 25). Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass gleichzeitig die Konzentration an fluoreszenzmarkierten Oktameren sinkt. Um die gleiche Anzahl an Teilchen zu detektieren, muss entweder die Probenkonzentration während der Messung oder die Messdauer angepasst werden.

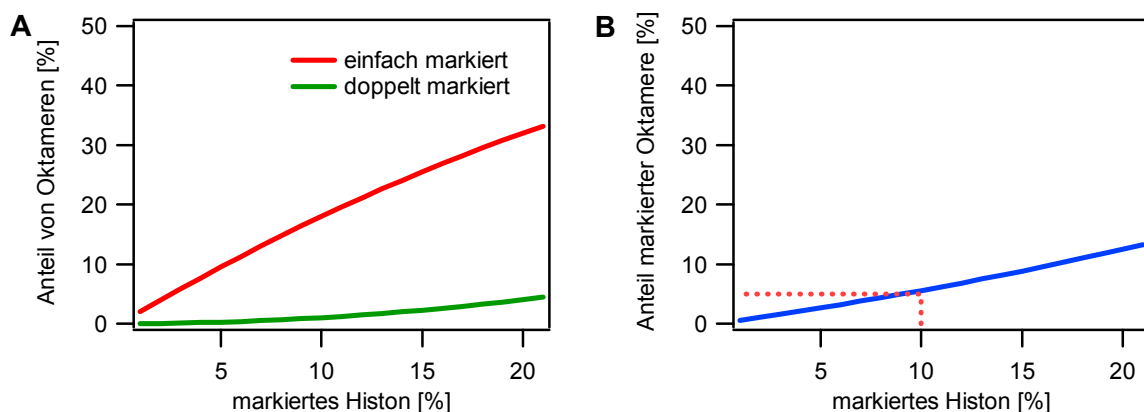


Abbildung 25: Zusammensetzung der Probe in Abhängigkeit des Anteils von markiertem Histon

A) Anteil von einfach (rot) und doppelt (grün) markiertem Oktamer an gesamten Oktameren. B) Anteil der doppelt markierten Oktamere an markierten und demnach bei den Messungen detektierten Oktameren. Rot hervorgehoben ist der Anteil von doppelt markierten Oktameren, wenn 10 % markiertes Histon bei der Oktamerfaltung eingesetzt wird.

Werden allerdings mehr als 10 % fluoreszenzmarkiertes Histon eingesetzt, wird der Anteil von Histonoktamern, die zwei Donorfluorophore tragen, so groß, dass er nicht mehr vernachlässigt werden kann. 10 % stellt daher eine obere Grenze dar.

4.1.2.2 Oktameraufreinigung und Analyse

Für die Präparation fluoreszenzmarkierter Oktamere wurden zunächst, wie in Kapitel 3.2.1.5 beschrieben, die entsprechenden Histonmutanten H2B T112C, H4 E63C oder H2B T118C durch die Addition eines Alexa488-Maleimids fluoreszenzmarkiert. Der Markierungsgrad des Oktamers kann bestimmt werden, indem man den überschüssigen freien Farbstoff vollständig abtrennt und spektroskopisch die Konzentration des gebundenen Farbstoffs und des Histons bestimmt. Da Histone und stärker noch fluoreszenzmarkierte Histone an allen Oberflächen adsorbieren, entstehen bei jedem Arbeitsschritt große Verluste der Probe. Zudem sollen die Histone nicht länger als 24 Stunden in dem Entfaltungspuffer gelagert werden, da es sonst zu Abbau des Proteins kommen kann (95). Durch die Aufreinigung des Proteins würde diese Zeit überschritten, was die Qualität der Probe beeinträchtigt. Es wurde daher darauf verzichtet, den Reaktionsansatz nach der Markierungsreaktion aufzureinigen. Der überschüssige freie Farbstoff wurde nach der Oktamerfaltung zusammen mit den dabei entstehenden Nebenprodukten abgetrennt. Für die Ausbeute der Addition des Maleimids an das Cystein des Histons wurden 90 % angenommen.

Nach der in Kapitel 4.1.2.1 beschriebenen Markierungsstrategie wurde ein entsprechend großer Anteil markiertes Histon für die Oktamerfaltung eingesetzt. Bei der Oktamerfaltung entstehen 18 % Histonoktamere, die mit einem Fluorophor markiert sind. Ist die Ausbeute der Addition geringer als angenommen, ist ein geringerer Teil der Oktamere nach der Faltung markiert (s. Abbildung 25). Die im Folgenden beschriebenen Messungen werden dadurch nicht beeinträchtigt.

Die Faltung der Oktamere wurde wie in 3.2.1.5 beschrieben durchgeführt. Die anfallenden Nebenprodukte, Histontetramere und Histondimere, sowie der freie Farbstoff unterscheiden sich signifikant in ihrer Größe und konnten daher durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt werden (Kapitel 3.2.1.4). In Abbildung 26 ist ein typisches Elutionsprofil einer Oktamerpräparation dargestellt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 250 µl aufgefangen. Jede Fraktion wurde mit einem TAU Gel auf die Zusammensetzung untersucht (s. Abbildung 26). Diese Gele wurden eigens für die Auftrennung von Histonen entwickelt (91). Die Histone werden dabei durch den Harnstoff und das nicht ionische Detergens Triton denaturiert. Im Gegensatz zu den SDS Gelen, die üblicherweise für die Auftrennung von Proteinen verwendet werden, wird die positive Ladung der basischen Histone im TAU-Gel nicht durch

ein anionisches Detergens überlagert. Durch die Essigsäure im Polyacrylamid-Gel und im Laufpuffer ist der pH-Wert dieser Gele sehr niedrig, die aufgetragenen Proteine behalten ihre positive Ladung und wandern zur Kathode. Das Auftrennungsvermögen der Gele ist so groß, dass nicht nur die verschiedenen Histone voneinander getrennt werden können, sondern auch Histonvarianten und Histonmodifikationen, die sich in nur einer Ladung unterscheiden. Mit TAU-Gelen kann man daher auch überprüfen, ob es während der Präparation der Histone und Histonoktameren zu Modifikationen (z.B. Carbamylierung durch den im Puffer enthaltenen Harnstoff) oder zum Abbau der Proteine kam. Es wurden für die im Weiteren beschriebenen Nukleosompräparationen nur solche Fraktionen verwendet, in denen alle vier Histone in gleichen Anteilen enthalten waren.

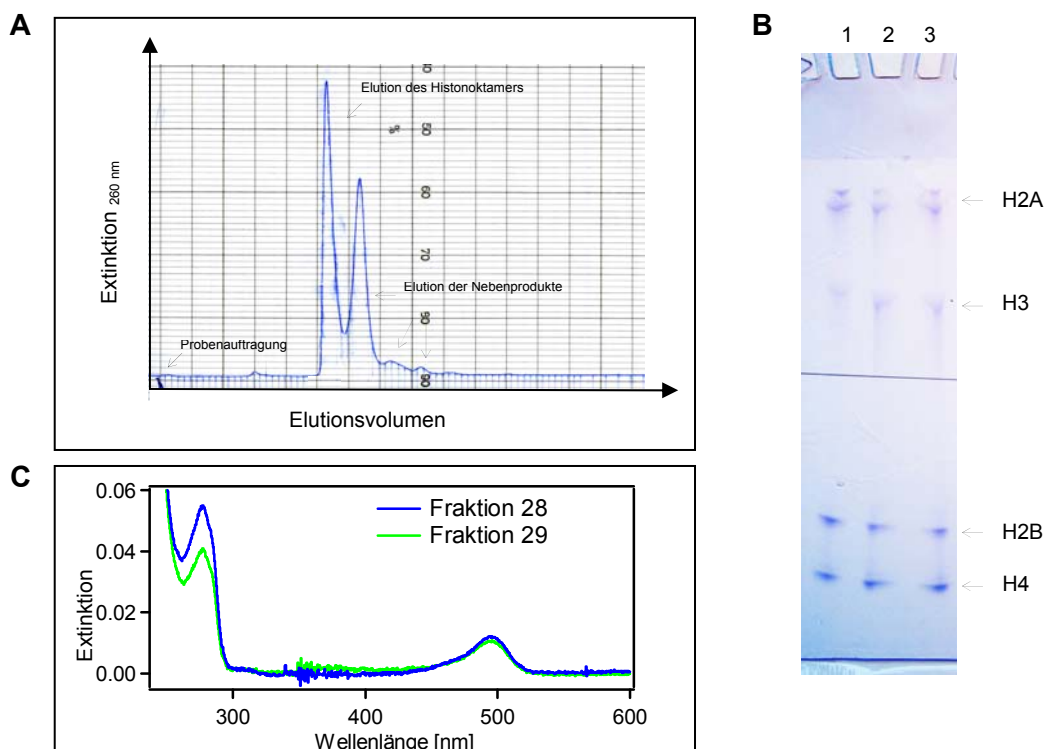


Abbildung 26: Präparation von Histonoktameren

A) Eluat einer Histonoktamerpräparation von der Superdex 200 Säule (am Beispiel der Präparation von Oktameren mit Alexa 488 markiertem H2B). Das Histonoktamer eluiert typischerweise nach 13 ml. Histontetramer, -dimer und der freie Fluorophor eluieren nach dem Histonoktamer. Fallen bei der Oktamerfaltung Aggregate an, eluieren diese deutlich vor dem Histonoktamer nach 7 ml. B) TAU Gel des Eluats der Superdex 200 Säule: 1) Histonoktamer aus *X. laevis* als Referenz, 2 und 3) Fraktionen des Histonoktamers der oben beschriebenen Präparation. Alle Histone sind in gleichen Teilen vorhanden. Bild nach Anfärben der Proteine durch Coomassie Brilliant Blue. C) Absorptionsspektrum der Fraktionen der oben beschriebenen Präparation. Der Markierungsgrad wurde wie in 3.2.4 beschrieben zu 12 % (Fraktion 28) und 14 % (Fraktion 29) berechnet.

Tabelle 9: Aufstellung der fluoreszenzmarkierten Oktamere

die für die im Folgenden beschriebenen Experimente präpariert wurden. Das mit Alexa 488 markierte Histon ist durch * gekennzeichnet. Der Markierungsgrad wurde wie in 3.2.4 beschrieben berechnet.

Oktamer	Fraktion	c [mg/ml]	Markierungsgrad
X. laevis H2B*	28	0.483	12 %
	29	0.369	14 %
X. laevis H4*	20	0.259	19 %
	21	0.420	23 %
S. cerevisiae H2A H2B*	19	0.328	5 %
	20	0.442	6 %
S. cerevisiae H2A.Z H2B*	23	0.250	4 %
	24	0.312	5 %

Aus dem Absorptionsspektrum (s. Abbildung 26) wurde für jede Fraktion der Markierungsgrad wie in 3.2.4 beschrieben bestimmt. In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit präparierten Oktamere, deren Konzentration und Markierungsgrad aufgeführt. Für die langfristige Lagerung wurden die Oktamere in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.1.3 Nukleosomrekonstitution

Für die Rekonstitution von Nukleosomen wurden Oktamere und DNA wie in Kapitel 3.2.1.7 beschrieben in TE Puffer bei 2 M NaCl gemischt und die NaCl Konzentration durch eine Dialyse reduziert.

Für die Oktamere, die aus *X. laevis* Histonen gefaltet wurden, wurde die in diesem Labor etablierte Methode für die doppelte Dialyse angewandt (21). Dabei fiel die NaCl Konzentration innerhalb von 5 Stunden auf 150 mM NaCl (s. Abbildung 27) und wurde über weiter auf 5 mM NaCl reduziert. Für Oktamere aus Histonen von *S. cerevisiae* konnte diese Methode nicht angewandt werden, da bei der Rekonstitution eine Vielzahl an Nebenprodukten anfiel (s. Abbildung 28). Hier wurde die NaCl Konzentration langsamer (innerhalb von 27 Stunden) auf 280 mM NaCl reduziert. Die Nukleosomen wurden bei dieser NaCl Konzentration gelagert.

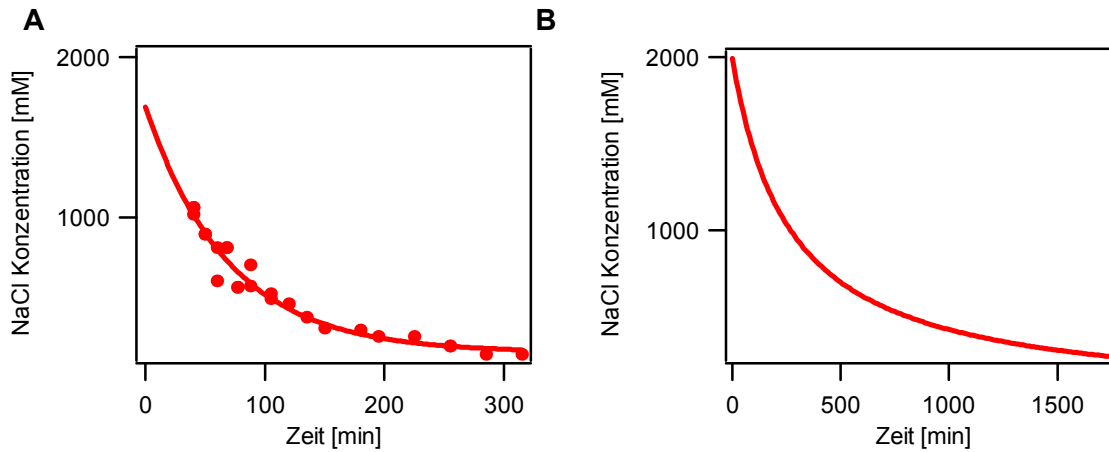


Abbildung 27: Abnahme der NaCl Konzentration während der Dialyse

A) Während der doppelten Dialyse wurde durch Messung der Leitfähigkeit die NaCl Konzentration in den Dialysehütchen ermittelt. Die NaCl Konzentration fiel exponentiell ab und erreichte in 5 Stunden 150 mM NaCl. B) Mittels einer peristaltischen Pumpe mit konstanter Flussgeschwindigkeit wurde die NaCl Konzentration des Dialysepuffers reduziert. Die Konzentration fiel innerhalb von 27 Stunden auf 280 mM NaCl.

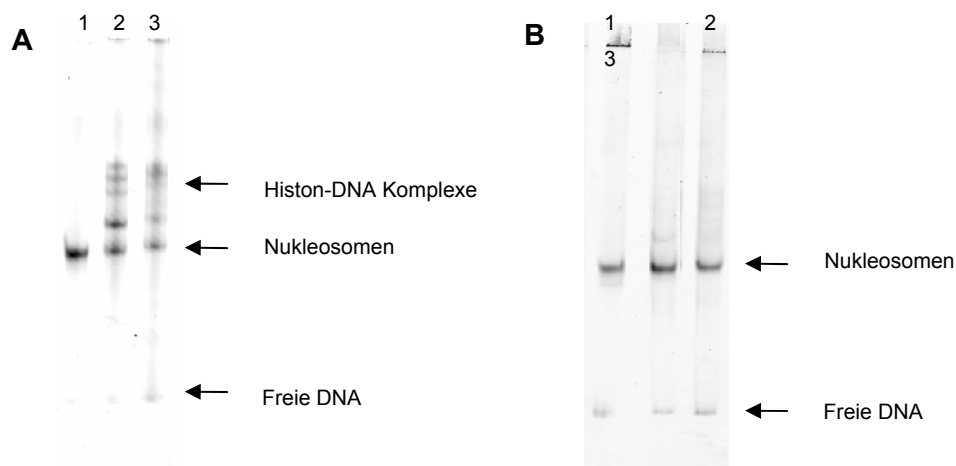


Abbildung 28: Vergleich der Nucleosompräparationen für Nucleosomen aus *S. cerevisiae*

A) Nucleosomen hergestellt durch die doppelte Dialyse (1: Nucleosomen aus Histonen von *X. laevis* als Referenz, 2: Nucleosomen aus Histonen von *S. cerevisiae* mit dem Haupthiston H2A, 3: Nucleosomen aus Histonen von *S. cerevisiae* mit der Histonvariante H2A.Z)

B) Nucleosomen hergestellt nach der Methode von K. Luger (89) (1-3 wie zuvor).

Bilder der Fluoreszenzemission von Alexa 594. Wurde die NaCl Konzentration schnell reduziert, entstand eine Vielzahl von Nebenprodukten, die langsamer im nativen Gel liefen, das heißt, größer als einfache Nucleosomen waren.

Die Qualität der Rekonstitution wurde durch UV/Vis-Spektroskopie (Kapitel 3.2.4) und gelelektrophoretisch (Kapitel 3.2.3.2) kontrolliert.

4.2 Validierung der Proben

Die verwendeten Alexafluorophore sind im Vergleich zu den Histonen sehr klein. Das Molekulargewicht beträgt ~5 % des Molekulargewichts eines Histons und ~0.5 % des Molekulargewichts des gesamten Nukleosoms. Obwohl eine Beeinträchtigung der Nukleosomen durch die Fluorophore daher unwahrscheinlich ist, wurde untersucht, ob ein Effekt auf die Struktur nachweisbar ist.

Auch die spektralen Eigenschaften der Fluorophore können durch das Anbinden an das Histon bzw. die DNA oder auch durch die in den Messungen vorliegenden Bedingungen beeinflusst werden. Es wurde überprüft, ob sich die Emission der Fluorophore unter den verwendeten Messbedingungen verändert.

4.2.1 Nukleosomstruktur

Das Laufverhalten von Nukleosomen ist ein sehr sensibles Maß für deren Struktur (89). Um zu überprüfen, ob die Fluorophore die Struktur der Nukleosoms beeinflussen, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Nukleosomproben mittels nativer PAGE verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Proben nicht in ihrem Laufverhalten unterscheiden (s. Abbildung 29). Dies deutet darauf hin, dass die Fluorophore das Falten des Oktamers und die Struktur der Nukleosomen nicht wesentlich beeinflussen.

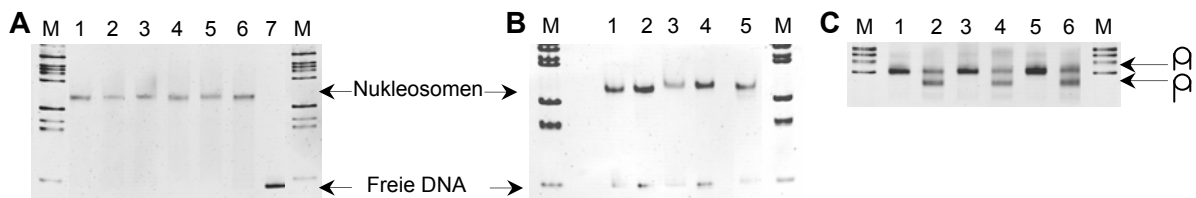


Abbildung 29: Gelelektrophoretische Analyse der Nukleosomen

A) Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* 1-7: H2B-DNA⁻⁵², H4-DNA⁻⁵², DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵², H2B-DNA⁻¹⁵, H4-DNA⁻¹⁵, unmarkierte Nukleosomen, 170 bp DNA-Fragment B) Nukleosomen aus Histonen von *S. cerevisiae* 1-4: H2B^s-DNA⁻¹⁵, H2B^s-DNA⁻⁵², H2B^{H2A,Z}-DNA⁻¹⁵, H2B^{H2A,Z}-DNA⁻⁵², 5: Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* als Referenz, C) Nukleosomen mit Alexa 488 markiert an 1-2: H2B, 3-4: H4 bzw. 5-6: unmarkiert, je nach 3 h Inkubation bei RT oder bei 55 °C, M: 100 bp DNA Standard (Bioron). Bilder nach Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid.

Darüber hinaus wurde verglichen, wie die unterschiedlich modifizierten Nukleosomen auf Erhöhung der Temperatur reagieren. Durch Erhöhung der Temperatur kann erreicht werden, dass das Oktamer die Position auf der DNA verändert. Da sich dadurch das Laufverhalten der Nukleosomen im Gel ändert, kann die Verschiebung des Oktamers auf der DNA gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.

Für die in diesen Experimenten verwendete 601 Positionierungssequenz wurden die Positionen, die das Oktamer in Abhängigkeit von der Temperatur einnimmt, von Florian Hauger im Rahmen seiner Promotion detailliert analysiert (96). Die Position des Oktamers wurde hierbei durch die Zugänglichkeit von Restriktionsschnittstellen zu den entsprechenden Restriktionsenzymen untersucht. Ist die DNA-Sequenz mit der Restriktionsschnittstelle an das Oktamer gebunden, kann die DNA nicht von dem Restriktionsenzym geschnitten werden. Liegt die Schnittstelle innerhalb des DNA-Arms des Nukleosoms, kann das Restriktionsenzym die DNA an dieser Stelle schneiden. F. Hauger hat dadurch gezeigt, dass Nukleosomen die auf einem 210 bp langen DNA-Fragment rekonstituiert wurden, nach der Rekonstitution zunächst symmetrisch positioniert sind und ungefähr gleich lange DNA-Arme aufweisen. Durch Inkubation bei erhöhter Temperatur erfolgt eine Verschiebung des Oktamers zu einer unsymmetrischen Position auf der DNA. Es wurde bereits gezeigt, dass dieses Verhalten durch die Markierung des Nukleosoms an der DNA nicht beeinträchtigt wird (96).

Das Verhalten von Nukleosomen, die an H2B oder an H4 fluoreszenzmarkiert sind, wurde mit dem unmarkierter Nukleosomen verglichen (s. Abbildung 29 c). Es konnte gezeigt werden, dass die Markierungen keinen Einfluss auf die Verschiebung des Oktamers haben. Dies ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass die Struktur des Nukleosoms durch die Markierung nicht beeinflusst wird.

4.2.2 Anisotropie der Fluorophore

Die Anisotropie gibt darüber Auskunft, ob ein an ein Biomolekül gekoppelter Fluorophor frei beweglich ist (s. Kapitel 2.4). Kommt es zur Bindung zwischen Fluorophor und Biomolekül durch sekundäre Wechselwirkungen, ist die freie Beweglichkeit nicht mehr gegeben und die Effizienz des Energietransfers wird von der Vorzugsorientierung zwischen den beiden Fluorophoren bestimmt. Um sicher zu stellen, dass dies in den fluoreszenzmarkierten Nukleosomen nicht der Fall war, wurde im Folgenden die Anisotropie der an die DNA, bzw. an die Histone gebundenen Fluorophore, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, gemessen. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass für Alexa 488 und Alexa 594 an den Positionen H2B T112C, H4 E63C, H2B T118C, DNA⁺⁴² bzw. DNA⁻⁵² und DNA⁻¹⁵ der Wert für die Anisotropie maximal 0,2 beträgt. Für diesen Bereich wird angenommen, dass eine freie Rotation vorliegt und der Energietransfer nicht von einer Vorzugsorientierung der Fluorophore abhängt (81).

Tabelle 10: Anisotropie der Fluorophore

Anisotropie der Fluorophore, die an der DNA, bzw. an den Histonen H2B (T112C) oder H4 (E63C) aus *X. laevis* oder H2B (T118C) aus *S. cerevisiae* gebunden sind, wurde nach Gleichung (3.10) berechnet.

Markierte Position	Fluorophor	Anisotropie (r)
H2B T112C	Alexa 488	0,17 ± 0,01
H4 E63C	Alexa 488	0,20 ± 0,04
H2B T118C	Alexa 488	0,18 ± 0,02
DNA ⁻¹⁵	Alexa 597	0,19 ± 0,01
DNA ⁻⁵²	Alexa 597	0,09 ± 0,01
DNA ⁺⁴²	Alexa 488	0,10 ± 0,02

4.2.3 Zählrate der Fluorophore

Das Fluoreszenzabsorptions- und emissionsspektrum sowie die Fluoreszenzquantenausbeute von Fluorophoren sind von ihrer Umgebung abhängig (81). Es ist daher möglich, dass die spektralen Eigenschaften der Fluorophore durch die hohe NaCl Konzentration, die in den Experimenten verwendet werden, beeinflusst werden. Um auszuschließen, dass die im folgenden untersuchten Änderungen der Fluoreszenzemission von Nukleosomen bei erhöhten Ionenstärken auf photophysikalischen Phänomenen beruhen, wurde in FCS Experimenten die Zählrate pro Teilchen wie in Kapitel 3.1.5.2 beschrieben bei NaCl Konzentrationen zwischen 150 und 1100 mM NaCl bestimmt (s. Abbildung 30).

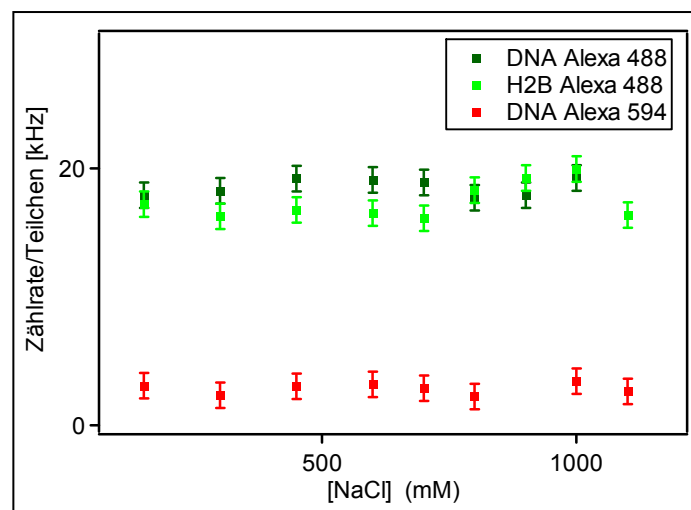


Abbildung 30: Zählrate der Fluorophore in Abhängigkeit der NaCl Konzentration

Zählrate pro Teilchen für Alexa 488 markierte Histone (hellgrün), für Alexa 488 markierte DNA (dunkelgrün) und Alexa 594 markierte DNA (rot) in Abhängigkeit der NaCl Konzentration. Der fehlende Zusammenhang zwischen der Zählrate pro Teilchen und der NaCl Konzentration zeigt, dass ein evt. Einfluss der NaCl Konzentration auf die Eigenschaften der Fluorophore vernachlässigt werden kann.

Dabei wurde unterschieden, ob der Donorfluorophor an ein Histon oder an die DNA gebunden war. Eine Verschiebung des Emissionsspektrums sowie eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute würde verursachen, dass weniger Photonen pro Teilchen detektiert werden. Abbildung 30 zeigt, dass die Zählrate pro Teilchen weitgehend von der NaCl Konzentration unabhängig ist. Ein Einfluss der NaCl Konzentration auf die Emission der Fluorophore wurde somit ausgeschlossen.

4.3 Zusammenfassung

Aus den Haupthistonen der Organismen *X. laevis* und *S. cerevisiae* und der Histonvariante H2A.Z aus *S. cerevisiae* wurden Oktamerproben hergestellt, die entweder an dem Histon H4 oder an dem Histon H2B mit dem Donorfluorophor Alexa 488 markiert waren. Für die Verwendung dieser Oktamere in der Einzelmolekülspektroskopie wurde eine spezielle Markierungsstrategie entwickelt, bei der nur ein geringer Anteil (maximal 10 %) von H4, bzw. H2B fluoreszenzmarkiert wird. So konnte erreicht werden, dass obwohl die Histone doppelt im Histonoktamer vorliegen, nur ein vernachlässigbarer Anteil der Oktamere zwei Fluorophore trägt. Aus den Oktameren und unmarkierter DNA wurden Nukleosomproben für FCS Messungen hergestellt. Aus den Oktameren und aus DNA, die mit dem Akzeptorfluorophor Alexa 594 markiert war, wurden FRET markierte Nukleosomen für spFRET Messungen hergestellt.

Ein signifikanter Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die Struktur der Nukleosomen konnte ausgeschlossen werden, da sich die Proben bei der nativen Gelelektrophorese und bei der temperaturabhängigen Repositionierung des Histonoktamers auf der DNA nicht von unmarkierten Nukleosomen unterscheiden.

Durch Messungen der Anisotropie der Fluorophore konnte gezeigt werden, dass die Fluorophore frei beweglich an der DNA, bzw. den Histonen gebunden vorliegen. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass ein evt. Einfluss hoher NaCl Konzentrationen auf die spektralen Eigenschaften der Fluorophore vernachlässigt werden kann.

Die markierten Nukleosomen sind daher die Einzelmolekülspektroskopie geeignet und mit dem verwendeten Fluorophorpaar können auch bei hohen NaCl Konzentrationen Messungen durchgeführt werden.

5 Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung der Nukleosomen

5.1 Öffnen des Nukleosoms

Das Öffnen des Nukleosoms wurde mittels FCS und spFRET Experimenten an Nukleosomen aus *X. laevis* untersucht. Im Folgenden wird zunächst der experimentelle Ansatz (5.1.1 Experimenteller Ansatz) und die Optimierung der Messbedingungen (5.1.2 Optimierung der Messbedingungen) erklärt. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der FCS (5.1.3 Öffnen des Nukleosoms untersucht durch FCS) und spFRET Experimente (5.1.4 Öffnen des Nukleosoms untersucht durch spFRET) zum Öffnen der Nukleosoms gezeigt und es wird beschrieben, wie aus den Ergebnissen der spFRET Experimente die Anzahl der Ionenbindungen zwischen den einzelnen Untereinheiten des Nukleosoms berechnet werden kann (5.1.5 Thermodynamische Analyse).

5.1.1 Experimenteller Ansatz

5.1.1.1 Verschiedene Konstrukte

Die Positionen der Fluorophore in den verschiedenen Konstrukten wurden so gewählt, dass das Verhalten der einzelnen Untereinheiten, H2A-H2B Dimer, (H3-H4)₂ Tetramer und DNA, beim Öffnen von Nukleosomen untersucht werden konnte. Das Öffnen der Nukleosomen wurde dabei durch eine Erhöhung der Ionenstärke induziert.

Für die FCS Messungen wurden Nukleosomen entweder an H2B (T112C), H4 (E63C) oder der DNA (+42) mit Alexa 488 markiert (s. Abbildung 31). Der Diffusionskoeffizient, der ein Maß für die Größe und Form eines Moleküls ist, wurde bei verschiedenen Ionenstärken bestimmt. Die Dissoziation einer markierten Untereinheit, die mit einer signifikanten Änderung der Größe einhergeht, kann durch eine Änderung des Diffusionskoeffizienten detektiert werden (s. Kapitel 2.6).

Die Abständen innerhalb des Nukleosoms wurden mittels spFRET untersucht (s. Kapitel 2.3). Nukleosomen wurden hierfür mit dem Fluorophorpaar Alexa 488 und Alexa 594 an folgende Positionen markiert (s. Abbildung 31): H2B (T112C) und die Position -15, bzw. -52 an der DNA (H2B -DNA⁻¹⁵ und H2B -DNA⁻⁵²), H4 (E63C) und die Position -15 und -52 an der DNA (H4-DNA⁻¹⁵ und H4-DNA⁻⁵²), die Positionen +42 und -52 an der DNA.

Damit kann man direkt zeigen, wenn:

- das H2A-H2B Dimer seine Position auf der DNA verändert (H2B-DNA⁻⁵²)
- sich der Abstand zwischen H2A-H2B Dimer und der DNA an der Dyadenachse verändert (H2B-DNA⁻¹⁵)
- das (H3-H4)₂ Tetramer seine Position auf der DNA verändert (H4-DNA⁻¹⁵ und H4-DNA⁻⁵²)
- sich die DNA-Arme vom Oktamer lösen und die DNA eine ausgestreckte Konformation einnimmt (DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵²)

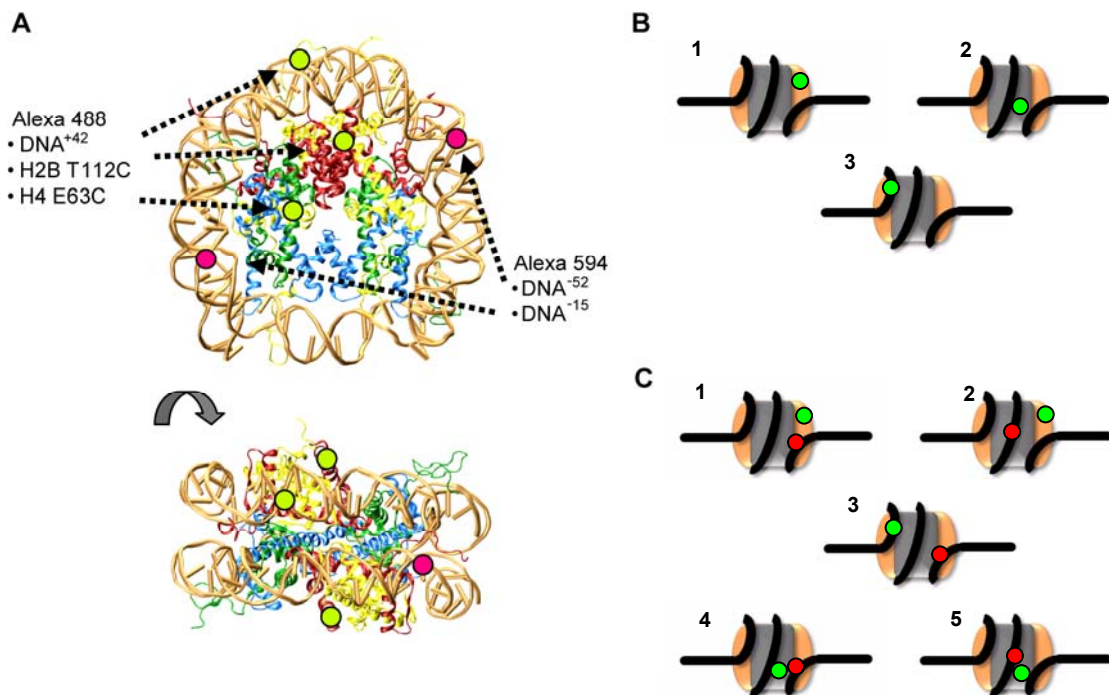


Abbildung 31: Darstellung der markierten Positionen innerhalb des Nukleosoms

A) Kristallstruktur des Nukleosoms in zwei verschiedenen Orientierungen (DNA dargestellt in orange, H2A in rot, H2B in gelb, H3 in blau und H4 in grün). Die Positionen von Alexa 488 sind durch einen grünen Kreis hervorgehoben, die von Alexa 594 durch einen roten Kreis. Je nach Orientierung sind einzelne markierte Positionen nicht sichtbar (oben je eine an den Histone H2B und H4; unten beide an H4 und an DNA⁻¹⁵). Darstellung modifiziert aus (97). B) Schematische Darstellung der Konstrukte für die FCS Messung. 1: Alexa 488 an H2A-H2B Dimer; 2: Alexa 488 an (H3-H4)₂ Tetramer; 3: Alexa 488 an der DNA. C) Schematische Darstellung der Konstrukte für spFRET Messungen. 1: H2B-DNA⁻⁵²; 2: H2B-DNA⁻¹⁵; 3: DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵²; 4: H4-DNA⁻⁵²; 5: H4-DNA⁻¹⁵. In der schematischen Darstellung der Nukleosomen sind die H2A-H2B Dimere in orange, das (H3-H4)₂ Tetramer in grau und die DNA in schwarz dargestellt.

Die Abstände zwischen den Fluorophoren innerhalb des Nukleosoms wurden aus der Kristallstruktur abgeschätzt (2). Dazu wurden die Abstände zwischen den Positionen, an die der Fluorophor über den Linker gebunden ist, gemessen (s. Tabelle 11). Dabei ist zu beachten, dass in proteinmarkierten Proben entweder das eine oder das andere Histon markiert sein kann und daher zwei Abstände auftreten. In Nukleosomen, die an H2B und der

Position -15 der DNA markiert sind, haben zufällig beide Histonen den gleichen Anstand zum DNA-Marker.

Tabelle 11: Interfluorophorabstand in den unterschiedlichen Nukleosomproben

In proteinmarkierten Proben kann entweder das eine oder das andere Histon markiert sein. Es sind daher zwei Interfluorophorabstände angegeben.

Konstrukt	Abstände aus Kristallstruktur	
H2B-DNA ⁻¹⁵	5.6 nm	5.9 nm
H2B-DNA ⁻⁵²	4.2 nm	6.1 nm
H4-DNA ⁻¹⁵	3.2 nm	5.4 nm
H4-DNA ⁻⁵²	4.9 nm	5.8 nm
DNA ⁺⁴² -DNA ⁻⁵²	5.9 nm	-

5.1.1.2 Charakterisierung der Nukleosomen in spFRET

Zur Optimierung der Messbedingungen muss man die Stabilität der Nukleosomen beurteilen können. Hier wird zunächst beschrieben, wie Nukleosomen in spFRET Experimenten analysiert werden und aus den in spFRET Experimenten erhaltenen Histogrammen Informationen über die Stabilität der Probe gewonnen werden können.

In einer spFRET Messung wurde jeweils für ca. 1000 einzelne Nukleosomen die Emission des Donor- und Akzeptorfluorophors bestimmt. Diese wurde wie in 3.2.6.3 beschrieben um das Hintergrundsignal und das Übersprechen der Donoremission in den Akzeptordetektionskanal korrigiert und daraus nach Gleichung (2.9) die Proximity Ratio P berechnet. Die resultierenden Werte wurden in Histogrammen dargestellt, aus den sich ablesen lässt, wie die Proximity Ratio, und damit auch der Interfluorophorabstand, in der Probe verteilt ist.

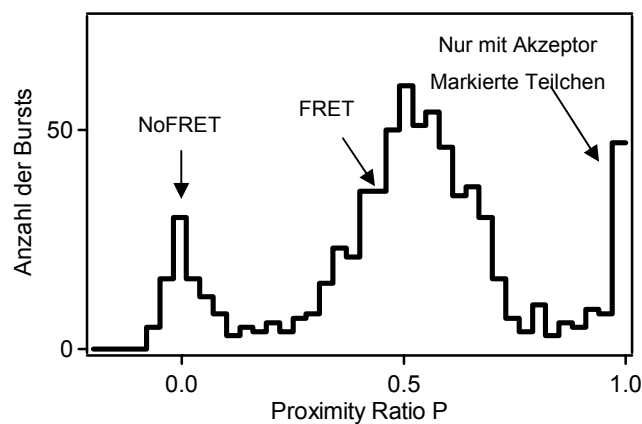


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung eines Histogramms

Darstellung modifiziert aus (97).

In den Histogrammen von Nukleosomen treten drei Populationen auf, eine bei $P = 0$, eine bei $P = 1$ und eine zwischen diesen beiden Bereichen (s. Abbildung 32). Ist $P = 0$ bedeutet das, dass keinerlei Emission des Akzeptor detektiert wurde, also kein Energietransfer auftrat. Aus diesem Grund wird diese Population im Folgenden als NoFRET-Population bezeichnet. Sie kommt dadurch zustande, dass die Fluorophore zu weit für Energietransfer auseinander liegen, wozu es durch die Dissoziation der markierten Untereinheiten oder durch Konformationsänderungen kommen kann. Liegt P im mittleren Bereich, wurde sowohl Donor- als auch Akzeptoremission detektiert, d.h. es fand Energietransfer statt. Diese Population wird daher als FRET-Population bezeichnet. In diesen Bereich fallen intakte Nukleosomen, aber auch deren Zerfallsprodukte, in denen die markierten Positionen noch in einem Abstand zueinander liegen, der Energietransfer erlaubt. Ist $P = 1$, bedeutet das, dass keinerlei Emission des Donors detektiert wurde. Diese Population kommt dadurch zustande, dass Nukleosomen, die nur mit dem Akzeptorfluorophor markiert sind, auch von dem Laser angeregt werden können, wenn auch nur sehr schwach. Diese Bursts weisen im Vergleich zu Bursts, die durch Energietransfer entstehen, eine geringere Burstrate auf (s. Abbildung 33). Diese Population kann für die Auswertung vernachlässigt werden.

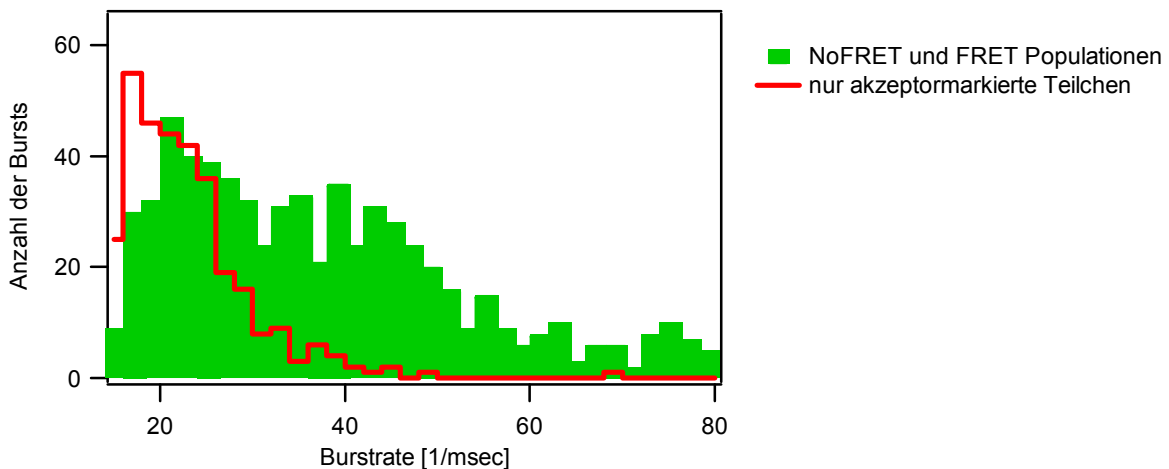


Abbildung 33: Burstrate der verschiedenen Populationen einer spFRET Messungen

Nur akzeptormarkierte Teilchen weisen eine kürzere Burstrate auf als Teilchen, die mit einem Donor- und einem Akzeptor markiert sind, und können daher von der FRET-Populationen unterschieden werden.

In diesen Histogrammen ist eine Vielzahl von Informationen erhalten. Die offensichtlichste und auch am einfachsten zugängliche Information ist das Verhältnis von FRET zu NoFRET-Population. Dieses Verhältnis beschreibt, wie groß der Anteil der Probe ist, in dem sich die beiden Fluorophore durch Konformationsänderung über den Abstand für Energietransfer hinaus entfernt haben (Anteil der NoFRET-Population). Dies ist ein Vorteil gegenüber Ensemble Messungen, in denen lediglich ein einzelner Wert für den durchschnittlichen

Energietransfer der Probe bestimmt werden kann. Dabei kann nicht zwischen einer Veränderung der Transfereffizienz und dem vollständigen Verlust von Energietransfer unterschieden werden. Auf eine weitere Datenanalyse wird in Kapitel 5.1.4 eingegangen.

Die Histogramme von intakten Nukleosomen sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Histogramme weisen eine sehr kleine NoFRET-Population auf. Die wenigen Bursts, die keinen Energietransfer zeigen, stammen vermutlich von Nukleosomen, in denen die DNA nicht mit dem Akzeptorfluorophor markiert ist (der Markierungsgrad der DNA beträgt nur annähernd 100 %, Markierungsgrade s. Tabelle 8), bzw. in denen der Akzeptorfluorophor gebleicht ist. Die meisten Bursts fallen in die FRET-Population. Diese kann mit einer Gaussfunktion beschrieben werden, wenn der Interfluorophorabstand in allen Nukleosomen gleich ist. Dies ist für DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² und H2B-DNA⁻⁵² der Fall. Die FRET-Population kann mit einer Doppelgaussfunktion beschrieben werden, wenn zwei unterschiedliche Interfluorophorabstände auftreten (siehe Fits in den Histogrammen Abbildung 34). Dies ist für H2B-DNA⁻¹⁵, H4-DNA⁻⁵² und H4-DNA⁻¹⁵ der Fall.

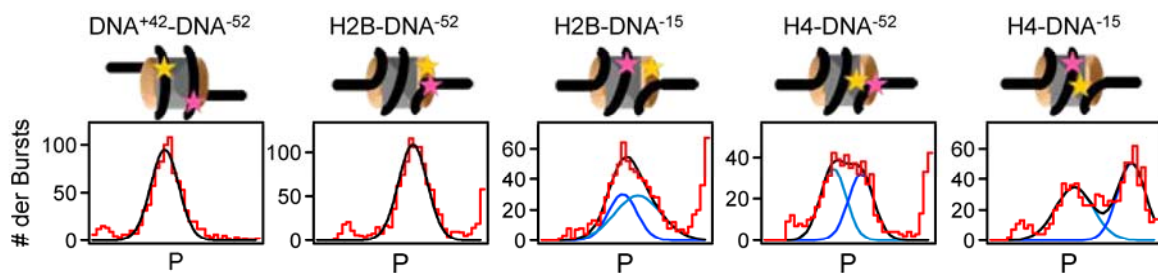


Abbildung 34: spFRET-Analyse intakter Nukleosomen

In schwarz ist der Fit der FRET-Population dargestellt. Wenn sich die Abstände zwischen dem Fluorophor auf der DNA und den markierten Position auf den beiden identischen Histonen unterscheiden, kann die FRET-Population durch zwei Gaussfunktionen beschrieben werden. Diese sind in blau dargestellt. Die Positionen der Fluorophore sind in den schematischen Darstellungen der Nukleosomen durch Sterne markiert. Darstellung modifiziert aus (97).

Vergleich man die Form der FRET-Populationen mit den aus der Kristallstruktur ermittelten Werten für die Interfluorophorabstände (siehe Tabelle 11), dann fällt auf, dass nach der Kristallstruktur für H2B-DNA⁻¹⁵ nur ein Abstand vorliegen sollte, für H2B-DNA⁻⁵² hingegen zwei. Für alle anderen Konstrukte stimmen die Erwartungen nach der Kristallstruktur mit den Verteilungen in den Histogrammen überein.

Es muss allerdings beachtet werden, dass bei der Ermittlung der Abstände aus der Kristallstruktur die Linker zwischen den Fluorophoren und der markierten Position am Nukleosom vernachlässigt wurden. Die Diskrepanz für die Proben, die an H2B markiert sind, können daher stammen, dass der Linker eine Vorzugsgeometrie einnimmt, die den Abstand verändert. Dafür spricht, dass die Diskrepanz für beide Konstrukte auftritt, die an H2B markiert sind.

5.1.2 Optimierung der Messbedingungen

5.1.2.1 Oberflächenadsorption

Effektives Messen von Energietransfer in einzelnen diffundierenden Nukleosomen erfordert, dass möglichst viele Photonen pro Fluorophor detektiert werden. Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Zahl der detektierten Photonen. Durch die geeignete Wahl der Intensität der zur Anregung verwendeten Laserstrahlung und von Bedingungen, die die Photostabilität der Fluorophore unterstützen, kann eine maximale Emission von Photonen erreicht werden. Durch eine geeignete Wahl der Filter kann die Fluoreszenzdetektion optimiert werden. Geeignete Messbedingungen für die Einzelmolekülspektroskopie an Nukleosomen, die mit Alexa 488 und Alexa 594 markiert sind, wurden von Alexander Gansen im Rahmen seiner Dissertation etabliert (88). Proben werden danach mit 100 μW angeregt. Bei dieser Intensität wurde das beste Signal-Rausch-Verhältnis erzielt. Bei weiterer Erhöhung wird der Fluorophor gesättigt, so dass die Anzahl der emittierten Photonen nicht, das Hintergrundsignal jedoch weiter ansteigt.

Die Photostabilität der Fluorophore wurde durch die Zugabe von Vitamin C (1 mM) optimiert. Vitamin C reagiert mit Sauerstoffradikalen, die hauptsächlich für das irreversible Bleichen der Fluorophore verantwortlich sind (98). Die Dosierung ist allerdings kritisch, da Sauerstoffradikale auch den Triplettzustand quenchen. Durch eine verminderte Sauerstoffradikalkonzentration wird die Lebensdauer des Triplettzustands und somit der Triplettanteil erhöht. Die Verbesserung der Photostabilität geht somit auf Kosten der Anzahl an emittierten Photonen. Die optimale Konzentration von Vitamin C wurde zu 1 mM bestimmt (88).

Eine Erhöhung des Triplettanteils erschwert zudem die Auswertungen der FCS Messungen (79). Dieser Nachteil überwiegt den positiven Effekt des Vitamin C auf die Photostabilität. Für FCS Messungen wurde daher auf die Zugabe von Vitamin C verzichtet.

Die zuvor beschriebenen Messbedingungen wurden für die im Folgenden durchgeführten Messungen übernommen. Ein weiterer Effekt, die Adsorption an die Oberfläche, wurde bislang nur unzureichend analysiert.

Es ist bekannt, dass Nukleosomen an der Oberfläche der Messkammer adsorbieren. Die Adsorption ist besonders bei niedrigen Probenkonzentrationen kritisch, wie es bei Einzelmolekülmessungen der Fall ist. Zwei Verfahren existieren, um diesem Effekt entgegen zu wirken. Der Anteil an adsorbierten Nukleosomen kann durch Zugabe von inertem Protein, in der Regel BSA, das die Gefäßwand auskleidet, verringert werden (93,99). Es wurde allerdings beobachtet, dass durch BSA das Hintergrundsignal deutlich erhöht wird und die Zugabe zu Aggregation führt. Es sollte versucht werden, eine Alternative für die Zugabe von

BSA zu finden. Eine alternative Methode, der Adsorption entgegenzuwirken, ist der Probe nicht-ionische Detergentien zuzufügen. In der Regel werden Konzentrationen von 0,02 -0,03 % (v/v) eingesetzt (12,24).

Im Folgenden wurde das Detergens Nonidet P40 getestet. Darüber hinaus wurde versucht, die Oberfläche der Gefäßkammer zu behandeln, um der Adsorption vorzubeugen. Hierzu wurde sigmacote, ein Reagenz der Firma sigma, verwendet. Es handelt sich dabei um eine Lösung eines Silikon in Heptan. Auf eine Glasoberfläche aufgetragen formt es nach Angabe des Herstellers einen kovalenten, mikroskopisch dünnen, hydrophoben Film. Die bislang verwendeten IBIDI Platten konnten nicht mit diesem Reagenz behandelt werden, da sie sich in dem organischen Lösungsmittel auflösen. Daher wurden Mikrotiterplatten der Firma Greiner mit einem Glasboden verwendet. Die Beschichtung wurde wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben durchgeführt.

Dann wurden Proben (markiert am H2A-H2B Dimer ($H2B-DNA^{-52}$), am $(H3-H4)_2$ Tetramer ($H4-DNA^{-15}$) oder an der DNA ($DNA^{+42}-DNA^{-52}$)) bei einer Konzentration von 250 pM mit oder ohne Nonidet P40 (0.02 %) in beide Messkammern gegeben. Die Anzahl der Bursts und der Anteil an intakten Nukleosomen wurde bestimmt (s. Abbildung 35).

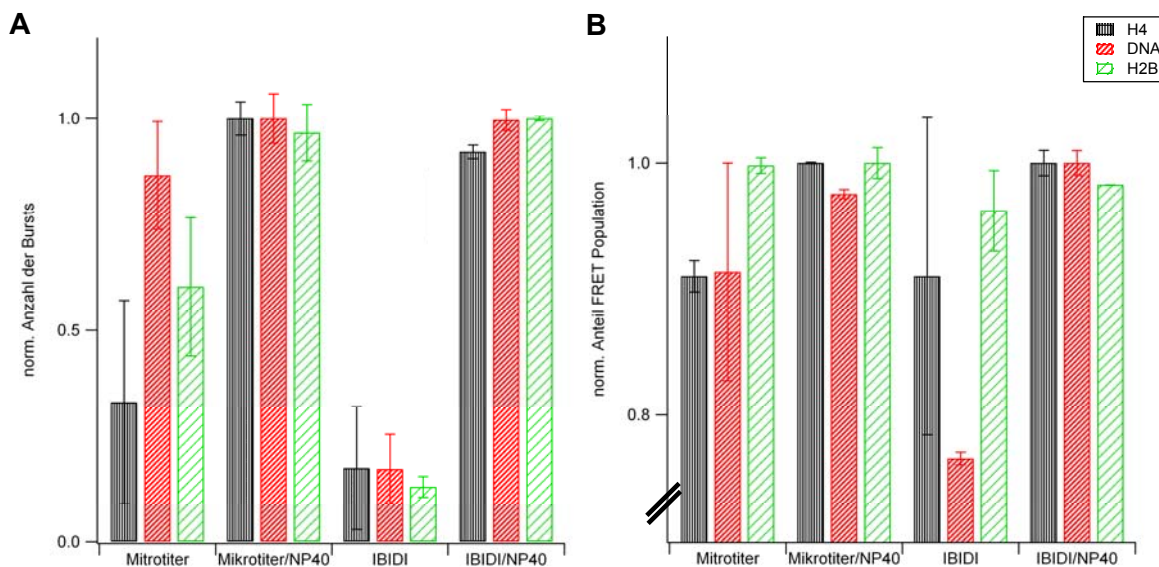


Abbildung 35: Effekt von Nonidet P40 auf die Adsorption der Probe an die Oberfläche

A) Anzahl der Bursts, die für die gleiche Probenlösung (250 pM Nukleosomenkonzentration, 150 mM NaCl) unter den verschiedenen angeführten Bedingungen erhalten wurden. Die Proben waren entweder an H2B ($H2B-DNA^{-52}$), H4 ($H4-DNA^{-15}$) oder ausschließlich an der DNA ($DNA^{+42}-DNA^{-52}$) markiert. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei Messungen. B) Anteil der Bursts, der zu der FRET-Population gehört, für die unter A) aufgeführten Proben und Bedingungen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei Messungen.

Bei gleicher Nukleosomenkonzentration wurden in Anwesenheit von Nonidet P40 sowohl in IBIDI als auch in sigmacote-behandelten Mikrotiterplatten deutlich mehr Bursts detektiert.

Wird dem Puffer kein Nonidet P40 zugesetzt, unterscheiden sich die beiden Messkammern allerdings deutlich. In beschichteten Mikrotiterplatten wurden mindestens doppelt so viele Bursts detektiert. Dabei fällt auf, dass die Zahl der detektierten Bursts in Mikrotiterplatten stark streut. Dies kann durch die wechselnde Qualität der Beschichtung verursacht werden. Wenn die Beschichtung optimal ist, ist die Zahl der Bursts annähernd so hoch wie bei Zugabe von Nonidet P40. Die angewandte Beschichtungsmethode scheint also nicht zu einer zuverlässigen Beschichtung der Oberfläche zu führen.

Aus praktischen Gründen wurde für die weiteren Messungen die Mikrotiterplatte verwendet. Die Zugabe von Nonidet P40 reduziert die Oberflächenspannung der Probe. In den IBIDI Platten, die sehr flach aufgebaut sind, führt dies dazu, dass die Proben leicht aus der Kammer austreten. Es kommt zur Kontamination von benachbarten Messkammern. Die einzelnen Messkammern auf der Mikrotiterplatte sind durch hohe Wände voneinander getrennt, eine Kontamination kann ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, dass sich Nonidet P40 stabilisierend auf Nukleosomen auswirkt. Wie Nonidet P40 die Stabilität von Nukleosomen erhöht, ist nicht bekannt. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde der Anteil der FRET-Population an der Gesamtzahl der detektierten Bursts bestimmt. Der Anteil der FRET-Population von H2B-DNA⁻⁵² Nukleosomen war unter allen Bedingungen konstant hoch. Für H4-DNA⁻¹⁵ Nukleosomen konnte eine geringe Abnahme der FRET-Population (10 %) beobachtet werden, wenn die Probe kein Nonidet P40 enthielt. Auch für DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² wurde ohne Nonidet P40 eine Abnahme der FRET-Population beobachtet. In IBIDI Platten war der Anteil der FRET-Population in Abwesenheit von Nonidet P40 um ca. 20 % niedriger, in Mikrotiterplatten lediglich um 10 %.

Der beobachtete Effekt von Nonidet P40 auf die Stabilität der Nukleosomen könnte ein Konzentrationseffekt sein. Es ist bekannt, dass die Nukleosomenkonzentration die Stabilität beeinflusst (11,28,32,92). Wird die Adsorption der Probe an die Gefäßwand nicht durch Nonidet P40 verhindert, sinkt die Nukleosomenkonzentration und die Stabilität der Nukleosomen wird herabgesetzt.

Dafür spricht, dass der Anteil der FRET-Population für DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² in der IBIDI Platte, in der die Konzentration durch Adsorption deutlich reduziert ist, nur 80 % beträgt, während er in der Mikrotiterplatte, in der die Nukleosomenkonzentration höher ist, 90 % beträgt. Für H4-DNA⁻¹⁵ unterscheiden sich die Kammern nicht deutlich in der Nukleosomenkonzentration und auch der Anteil der FRET-Population ist annähernd gleich. Dass keine Abnahme der FRET-Population für H2B-DNA⁻⁵² beobachtet wurde, scheint zunächst widersprüchlich. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sich Histone, Nukleosomen und freie DNA in ihrer Affinität für die Oberfläche unterscheiden und H2A-H2B Dimere stärker als Nukleosomen, freie DNA und (H3-H4)₂ Tetramere an die Oberfläche adsorbieren. In diesem Fall würden bei

der Dissoziation die frei werden H2A-H2B Dimere bevorzugt an die Oberfläche adsorbieren, wohingegen ein größerer Anteil der noch intakten Nukleosomen in Lösung bliebe. Da die Messungen direkt nach dem Befüllen der Messkammern durchgeführt wurden, hätte sich ein neues Gleichgewicht noch nicht eingestellt. Dies könnte erklären, dass nur Bursts von intakten H2B-DNA⁻⁵² und keine von freiem H2A-H2B Dimer detektiert wurden.

Auf der Basis der hier vorliegenden Ergebnisse ist es nicht möglich, die Grundlage des stabilisierenden Effekts zu erklären. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Nonidet P40 die Adsorption der Probe an die Gefäßwand verhindert. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Tatsache wichtig, dass sich die fluoreszenzmarkierten Teilchen in ihrer Affinität für die Oberfläche unterscheiden könnten. Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden daher alle in Anwesenheit von 0.02 % Nonidet P40 durchgeführt.

5.1.2.2 Gleichgewichtsbedingungen

In vivo wird das Nukleosom durch zahlreiche Enzyme und mit Hilfe von Chaperonen abgebaut. *In vitro* können diese Faktoren sehr einfach nachgestellt werden. Eine Erhöhung der NaCl Konzentration bewirkt, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Histon und DNA aufgehoben werden und es kommt zur Dissoziation des Nukleosoms. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde diese Methode angewandt, um das Öffnen des Nukleosoms zu induzieren. Bei jeder Messung wurden die Nukleosomen in einem Puffer mit der entsprechenden NaCl Konzentration verdünnt. Idealerweise sollten die Messungen zur Stabilität von Nukleosomen durchgeführt werden, wenn sich der Gleichgewichtszustand eingestellt hat. Im Folgenden wird untersucht, wie schnell Nukleosomen nach der Verdünnung den Gleichgewichtszustand erreichen. Dazu wurde eine Nukleosomprobe (H2B-DNA⁻⁵²) in Puffern verschiedener NaCl Konzentrationen verdünnt und der Anteil der FRET-Population, also der Nukleosomen, die Energietransfer aufweisen, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verdünnung bestimmt (s. Abbildung 36). Es wurde beobachtet, dass der Anteil der FRET-Population über einen Zeitraum von ca. 40 Minuten abnimmt und danach näherungsweise konstant bleibt. Der Abfall der FRET-Population konnte durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden. Für die im Folgenden durchgeführten Messungen wurden die Nukleosomen jeweils 90 Minuten nach der Verdünnung in dem Puffer mit der entsprechenden NaCl Konzentration inkubiert und danach mittels FCS oder spFRET untersucht.

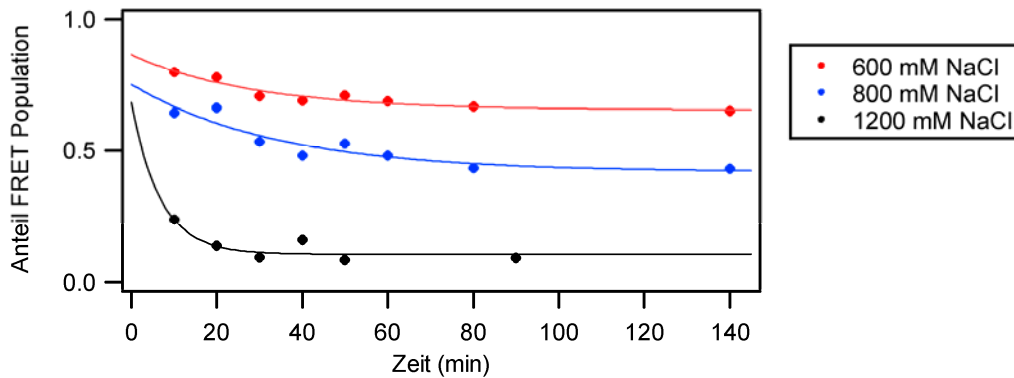


Abbildung 36: Abnahme der FRET-Population mit der Zeit

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verdünnung wurde der Anteil der FRET-Population für Nukleosomen (H2B-DNA⁻⁵²) in Puffer mit 600, 800 oder 1200 mM NaCl bestimmt. Der Abfall der FRET-Population konnte durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden.

5.1.3 Öffnen des Nukleosoms untersucht durch FCS

Nukleosomen, die entweder am H2A-H2B Dimer, am (H3-H4)₂ Tetramer oder an der DNA markiert waren, wurden bei NaCl Konzentrationen zwischen 150 mM NaCl und 1200 mM NaCl mittels FCS analysiert. Der Diffusionskoeffizient wurde wie in 3.1.5.2 beschrieben aus der Autokorrelationsfunktion bestimmt. Dieser ist ein Maß für die Größe und Form eines Moleküls (s. Kapitel 2.6). Nimmt durch Dissoziation einer Untereinheit die Größe des Nukleosoms ab, kann dies durch einen Anstieg des Diffusionskoeffizienten nachgewiesen werden.

Mit FCS wird jeweils das Molekül untersucht, an das der Fluorophor gebunden ist. Dies ist bei niedrigen NaCl Konzentrationen das ganze Nukleosom. Bei hohen NaCl Konzentrationen dissoziiert das Nukleosom und lediglich der Teil, der den Fluorophor trägt – eine oder mehrere Untereinheiten des Nukleosoms –, ist in FCS sichtbar. Es wird daher im Folgenden nicht von dem Diffusionskoeffizient der Nukleosomen, sondern von dem Diffusionskoeffizient der markierten Teilchen gesprochen.

Bei jeder NaCl Konzentration wurde auch der Diffusionskoeffizient von freiem Alexa 488-Fluorophor bestimmt und der Diffusionskoeffizient der Probe relativ zu Alexa 488 angegeben. Die Verwendung von Alexa 488 als interner Standard war nötig, da eine Erhöhung der NaCl Konzentration den Brechungsindex und die Viskosität des Puffers erhöht und somit die Diffusionszeit verlängert. Dieser vom Zerfall unabhängige Effekt auf den Diffusionskoeffizienten konnte durch die Bestimmung von relativen Diffusionskoeffizienten ausgeglichen werden.

Der Diffusionskoeffizient von H2B markierten Teilchen war bis 700 mM NaCl annähernd konstant und stieg bei einer NaCl Konzentration von 800 mM an (s. Abbildung 37). Bei 1000 mM NaCl erreichte der Wert ein Plateau. Der Diffusionskoeffizient von H4 markierten

Teilchen war bis zu deutlich höheren NaCl Konzentrationen konstant und stieg erst bei 1100 mM NaCl. Der Diffusionskoeffizient von DNA markierten Teilchen fiel leicht ab und näherte sich dem Diffusionskoeffizienten von freier DNA an.

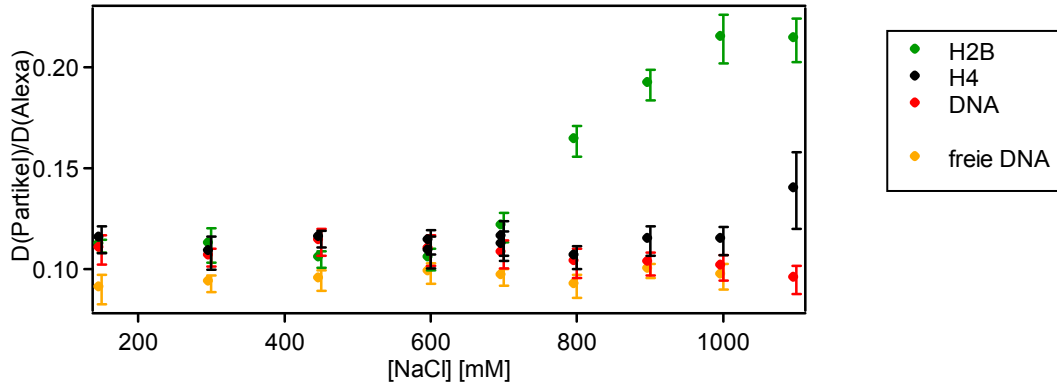


Abbildung 37: Diffusionskoeffizienten der Nukleosomuntereinheiten während der Dissoziation
 Durch Erhöhung der NaCl Konzentration wurde die Dissoziation induziert und die relativen Diffusionskoeffizienten der verschiedenen Untereinheit des Nukleosoms gemessen. Aus der Reihenfolge der Änderungen kann man darauf schließen, dass zunächst das H2A-H2B Dimer und erst danach das $(H3-H4)_2$ Tetramer von der DNA abdissoziiert. Darstellung modifiziert aus (97).

Der Anstieg des Diffusionskoeffizienten deutet auf eine Dissoziation hin. Aus der Reihenfolge, in der sich die Diffusionskoeffizienten ändern, kann man ablesen, in welcher Reihenfolge sich die Untereinheiten des Nukleosoms voneinander trennen. Während die Diffusionskoeffizienten von H4- und DNA-markierten Teilchen annähernd identisch sind, steigt der von H2B-markierten Teilchen. Dies zeigt, dass im ersten Schritt das H2A-H2B Dimer vom Nukleosom abdissoziiert. Erst bei 1100 mM NaCl unterscheiden sich die Diffusionskoeffizienten von H4 und DNA markierten Teilchen. Dies deutet darauf hin, dass erst bei diesen NaCl Konzentrationen $(H3-H4)_2$ Tetramer und DNA dissoziieren. Die leichte Abnahme des Diffusionskoeffizienten von DNA markierten Teilchen weist darauf hin, dass die DNA eine ausgedehntere Form annimmt. Wie hier gezeigt, ist der Diffusionskoeffizient der DNA wegen der ausgedehnten Form trotz niedrigerer molekularer Masse geringer als der des kompakten Nukleosoms.

Um zu bestätigen, dass es sich bei hohen NaCl Konzentrationen bei dem diffundierenden Teilchen in den H2B markierten Nukleosomproben wirklich um H2A-H2B Dimere handelt, wurden die Proben in FCS Messungen mit freiem H2A-H2B Dimer verglichen. Die relativen Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 12 aufgeführt. Während bei 300 mM NaCl der Diffusionskoeffizient des freien H2A-H2B Dimer höher ist als der des an das Nukleosom gebundenen Dimer, weisen bei 1100 mM NaCl beide Proben innerhalb der Fehlergrenzen denselben Diffusionskoeffizienten auf. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass in H2B markierten Nukleosomproben bei hoher NaCl Konzentration freies H2A-H2B Dimer vorliegt.

Tabelle 12: Diffusionskoeffizienten von freiem H2A-H2B und an H2B markierten Nukleosomen
 Der relative Diffusionskoeffizient von freiem H2A-H2B Dimer und von Proben, in denen Nukleosomen am H2A-H2B Dimer markiert waren, wurde bei niedrigen und hohen NaCl Konzentrationen bestimmt.

[NaCl]	freies H2A-H2B	an H2A-H2B markiertes Nukleosom
300 mM NaCl	0.21±0.01	0.11±0.01
1100 mM NaCl	0.23±0.01	0.21±0.01

5.1.4 Öffnen des Nukleosoms untersucht durch spFRET

Durch die FCS Messungen konnte gezeigt werden, dass bei Erhöhung der NaCl Konzentration sich zunächst das H2A-H2B Dimer vom Nukleosom ablöst und in einem zweiten Schritt das (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA dissoziiert. Konformationsänderungen, die der Dissoziation voraus gehen, können mit FCS nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde der Mechanismus mit spFRET analysiert. Hierfür wurden die Proben unter Einzelmolekülbedingungen (d.h. 250 pM Nukleosomenkonzentration) bei verschiedenen NaCl Konzentrationen inkubiert und der Gleichgewichtszustand bei der entsprechenden NaCl Konzentration in einer spFRET Messung untersucht.

Wie in Kapitel 3.1.5.5 beschrieben wird für jede Messung der Anteil der FRET-Population bestimmt. Bei 150 mM NaCl beträgt dieser 100 %. Erhöht man die NaCl Konzentration, steigt der Anteil der Nukleosomen in der NoFRET-Population auf Kosten der FRET-Population. Die Abnahme der FRET-Population mit der NaCl Konzentration ist in Abbildung 38 dargestellt. Die NaCl Konzentration, bei der die Konzentration der FRET-Population noch 50 % beträgt, wird verwendet, um die Abnahme von Energietransfer zwischen den unterschiedlichen Positionen zu beschreiben. Sie ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: NaCl Konzentrationen, bei denen die FRET-Populationen auf 50 % gefallen sind

Konstrukt	c _{1/2} in mM
H2B-DNA ⁻¹⁵	620 ± 30
H2B-DNA ⁻⁵²	760 ± 30
DNA ⁺⁴² -DNA ⁻⁵²	870 ± 10
H4-DNA ⁻⁵²	900 ± 10
H4-DNA ⁻¹⁵	930 ± 10

Der Anteil der FRET-Population von H2B-DNA⁻¹⁵ beginnt bei der niedrigsten NaCl Konzentration (bei 300 mM) zu sinken, gefolgt von dem Anteil der FRET-Population von

H2B-DNA⁻⁵² bei 400 mM NaCl. Der Anteil der FRET-Population von DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² fällt bei deutlich höheren NaCl Konzentrationen (700 mM NaCl). Für H4-DNA⁻⁵² und H4-DNA⁻¹⁵ fällt der Anteil bei noch höheren NaCl Konzentrationen (800 mM). Bei 1200 mM NaCl ist für alle Konstrukte die FRET-Population verschwunden. Dies deutet darauf hin, dass bei dieser NaCl Konzentration die Nukleosomen vollständig zerfallen sind.

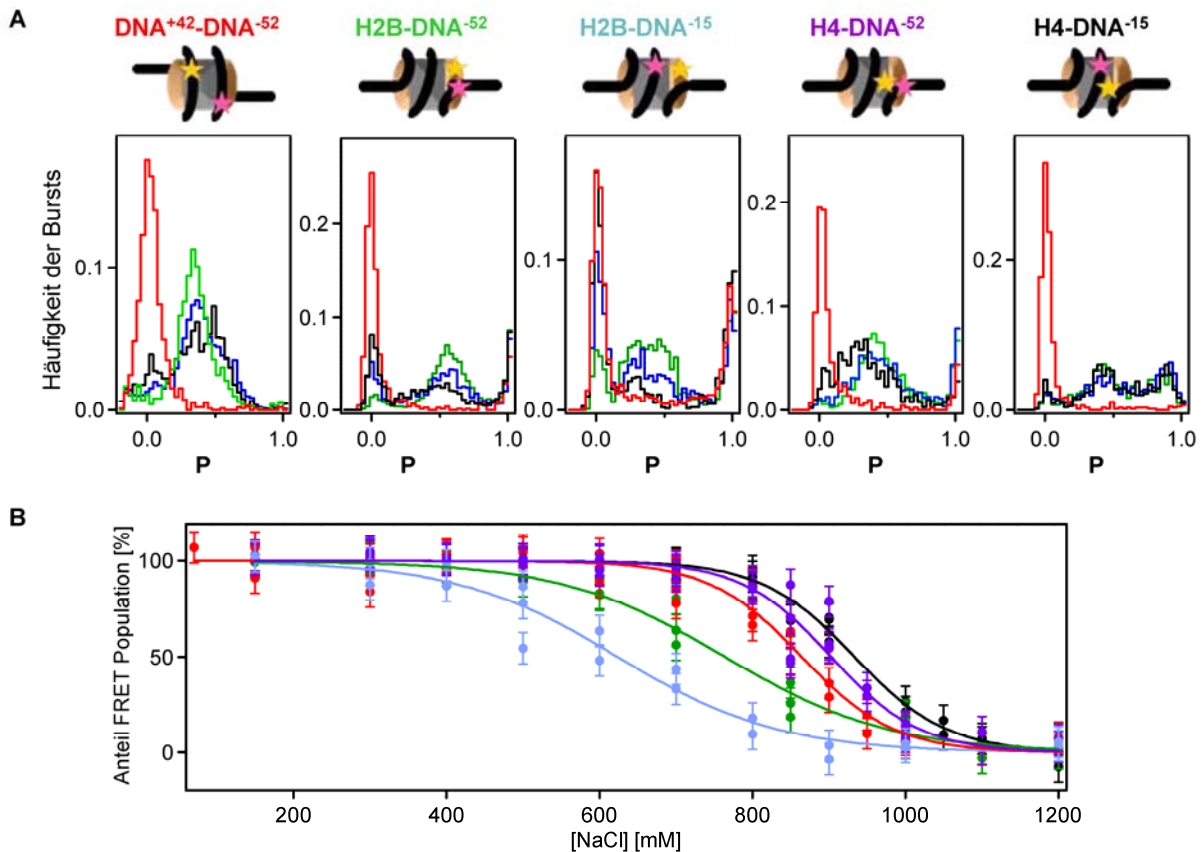


Abbildung 38: Abnahme der FRET-Populationen mit der NaCl Konzentration

A) Darstellung von Histogrammen bei erhöhter NaCl Konzentration. Als Beispiele sind Histogramme bei 400 mM (grün), 600 mM (blau), 800 mM (schwarz) und 1200 mM NaCl (rot) dargestellt. Der Anteil der NoFRET-Population steigt auf Kosten der FRET-Population. Zudem können, mit Ausnahme von H4-DNA⁻¹⁵, Veränderungen in der Form der FRET-Population beobachtet werden. B) Der Anteil der FRET-Population wurde für jede NaCl Konzentration quantifiziert (Farben der einzelnen Konstrukte wie unter A angegeben, die Positionen der Fluorophore sind in den schematischen Darstellungen der Nukleosomen durch Sterne markiert.). Die Abnahme folgt einem sigmoidalen Verlauf. Darstellung modifiziert aus (97).

Die Reihenfolge, mit der die FRET-Populationen abnehmen, gibt Aufschluss über die Konformationsänderungen, die während der Dissoziation der Untereinheiten auftreten. Der Verlust von Energietransfer zwischen H2A-H2B Dimer und DNA deutet auf die Dissoziation von H2A-H2B Dimer und DNA hin. Dabei ist entscheidend, dass der Energietransfer zwischen H2A-H2B Dimer und der Position -15 auf der DNA bei einer niedrigeren NaCl Konzentration verschwindet als der Energietransfer zwischen H2A-H2B Dimer und der Position -52. Dies bedeutet, dass sich der Abstand zwischen H2A-H2B Dimer und der

Dyadenachse vergrößert, während der zwischen Dimer und der benachbarten DNA unverändert ist. Bei einer weiteren Erhöhung der NaCl Konzentration kommt es zum Verlust von Energietransfer zwischen den Positionen +42 und -52 auf der DNA. Dies deutet an, dass die DNA von den übrigen Histonen abrollt und eine lineare Struktur einnimmt. Bei noch etwas höheren NaCl Konzentrationen verschwindet der Energietransfer zwischen (H3-H4)₂ Tetramer und DNA, was auf die Dissoziation von (H3-H4)₂ Tetramer und DNA hindeutet.

Aus dieser sehr einfachen Betrachtung der spFRET Ergebnisse, der Quantifizierung der FRET-Population für die verschiedenen Konstrukte, lassen sich viele Informationen über den Mechanismus gewinnen. Es wurde gezeigt, dass sich, während H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer noch an ihren Positionen auf der DNA gebunden vorliegen (keine Veränderung im FRET zwischen H2B und DNA⁻⁵² und zwischen H4 und DNA⁻¹⁵), der Abstand zwischen H2B und DNA⁻¹⁵ vergrößert. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtung ist, dass sich die Bindungen von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer öffnen, während alle Histone noch an der DNA gebunden vorliegen. Diese Strukturänderung ist der erste Schritt beim Öffnen des Nukleosoms.

Die spFRET Analyse von Nukleosomen erlaubt jedoch nicht nur, bei jeder NaCl Konzentration den Anteil der Nukleosomen zu bestimmen, die Energietransfer aufweisen. Darüber hinaus kann auch untersucht werden, ob sich die FRET-Population verschiebt, was eine kleinere Änderung des Abstands zwischen den Fluorophoren anzeigt, die nicht mit dem Verlust von Energietransfer einhergeht. Im Folgenden wird gezeigt, dass die Änderungen der FRET Histogramme mit den zuvor beobachteten Konformationsänderungen im Einklang stehen (Beispiele für Histogramme bei erhöhten NaCl Konzentrationen sind in Abbildung 38 dargestellt).

Die deutlichste Veränderung der FRET-Verteilung wurde für DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² beobachtet. Ab einer NaCl Konzentration von 300 mM konnte eine zweite FRET-Population mit einer höheren Transfereffizienz beobachtet werden. Der Anteil dieser Population an der Gesamtzahl der Bursts stieg, bis beide Populationen bei 800 mM gleich groß waren. Dies deutet darauf hin, dass bei Erhöhung der NaCl Konzentration eine Konformation des Nukleosoms entsteht, in der die Fluorophore an den Positionen +42 und -52 näher zusammen liegen. Bei 800 mM NaCl liegen 50 % der Nukleosomen in dieser Konformation vor. Bei dieser Konformation kann es sich um den Zustand handeln, in dem die Bindungen zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer geöffnet sind. Es kann auch ein Zustand sein, in dem ein oder beide H2A-H2B Dimere bereits vom Nukleosom dissoziiert sind.

Weitere Verschiebungen der FRET-Populationen wurden für H2B-DNA⁻¹⁵ und H2B-DNA⁻⁵² beobachtet. In diesem Fall sind Bursts mit niedrigen Proximity Ratios aufgetreten, die außerhalb der gaussförmigen FRET-Population lagen. Diese Bursts stammen von

Nukleosomen, in denen der Abstand zwischen den Fluorophoren erhöht ist, es allerdings noch zu Energietransfer kommt. Diese Verschiebung der FRET-Population lässt sich mit einem allgemeinen Öffnen der Struktur erklären.

Auch für H4-DNA⁻⁵² wurden Bursts mit niedrigen Proximity Ratios detektiert. Diese Bursts traten allerdings erst ab einer NaCl Konzentration von 800 mM auf. Bei dieser Konzentration beginnt die DNA sich von den übrigen Histonen zu lösen und eine ausgestreckte Struktur einzunehmen. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des Abstands zwischen (H3-H4)₂ Tetramer und DNA an der Position -52. Das Auftreten von Bursts mit niedrigen Proximity Ratios weist auf das Vorliegen dieser Konformation hin.

Nur für H4-DNA⁻¹⁵ konnte keinerlei Verschiebung der FRET-Population beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass das (H3-H4)₂ Tetramer unverändert an seiner ursprünglichen Position an der DNA Dyadenachse gebunden bleibt, bis es durch die Erhöhung der NaCl Konzentration abdissoziiert.

5.1.5 Thermodynamische Analyse

Wenn Histone an DNA binden, werden Ionenbindungen ausgebildet und gleichzeitig die zuvor gebundenen Gegenionen abgegeben. Die Erhöhung der NaCl Konzentration bewirkt eine Umkehrung dieser Prozesse. Die Ionenbindungen zwischen Histonen und DNA werden gebrochen und Na⁺ Ionen als Gegenionen an die DNA gebunden. Die NaCl-Abhängigkeit dieses Prozesses kann genutzt werden, um die Anzahl der Ionenbindungen zwischen Histonuntereinheiten und DNA und die Anzahl der Gegenionen, die als Ausgleich gebunden werden, zu bestimmen. Hierfür wurde eine Methode von Record et al. angewandt (100). Dabei wird die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation (Dissoziationsgleichung (5.1)) in eine Konstante K_{obs} , die experimentell zugänglich ist (Gleichung (5.2)), und die Ionenkonzentration getrennt. Dabei ist φ ein Faktor, der angibt, wie viele Gegenionen pro Ladung an die DNA binden. Dieser Faktor beträgt 0,88 (100).



$$K = \frac{[N_{diss}][Histon]}{[N][Na^+]^{m\varphi}} = -K_{obs} \cdot [Na^+]^{m\varphi} \quad (5.2)$$

$$K_{obs} = \frac{[N_{diss}][Histon]}{[N]} \quad (5.3)$$

- N = Nukleosomen, in denen das untersuchte Histone gebunden vorliegen
- m = Anzahl der Ionenbindungen zwischen DNA und untersuchtem Histon
- φ = Faktor, der angibt, wie viele Gegenionen pro Ladung an DNA binden (0,88)
- N_{diss} = Nukleosomen, in denen das untersuchte Histon dissoziiert ist
- K = Gleichgewichtskonstante
- K_{obs} = experimentell zugängliche Gleichgewichtskonstante

Die Konzentration der Nukleosomen, in denen das untersuchte Histon gebunden vorliegt, entspricht dem Anteil der FRET-Population einer spFRET Messung, in der das entsprechende Histon und die DNA markiert ist. Die Konzentration der Nukleosomen, in denen das untersuchte Histon dissoziiert ist, und die Konzentration des dissoziierten Histons entsprechen jeweils dem Anteil der NoFRET-Population. K_{obs} kann daher aus dem aus den Ergebnissen der FRET Messungen nach Gleichung (5.4) berechnet werden.

$$K_{obs} = \frac{[N_{diss}][Histon]}{[N]} = \frac{[NoFRET]^2}{[FRET]} \quad (5.4)$$

$[NoFRET]$ = Anteil der NoFRET-Population

$[FRET]$ = Anteil der FRET-Population

Aus Gleichung (5.2) erhält man durch Logarithmieren und partiellem Ableiten Gleichung (5.5) (100).

$$-\frac{\partial \lg(K_{obs})}{\partial \lg[Na^+]} = -\frac{\partial \lg\left(\frac{[N_{diss}][Histon]}{[N]}\right)}{\partial \lg[Na^+]} = \varphi \cdot m \quad (5.5)$$

$$\lg(K_{obs}) = -\varphi \cdot m \cdot \lg[Na^+] \quad (5.6)$$

Die Steigung m einer linearen Regressionsgeraden einer Auftragung von K_{obs} gegen $\lg(NaCl)$ ist gleich der Zahl der Ionenbindungen, die bei der Dissoziation des H2A-H2B Dimers bzw. des $(H3-H4)_2$ Tetramers gebrochen werden. K_{obs} wurde dafür nach Gleichung (5.3) aus den FRET Daten von H2B-DNA⁻⁵², H4-DNA⁻⁵² und H4-DNA⁻¹⁵ berechnet (Abbildung 39 und Tabelle 14). Die Anzahl an Ionenbindungen zwischen $(H3-H4)_2$ Tetramer und DNA wurde aus den aus H4-DNA⁻⁵² und H4-DNA⁻¹⁵ ermittelten Werten für K_{obs} bestimmt. Die Werte stimmten innerhalb der Fehlergrenzen überein (23 ± 2 und 24 ± 2). Für die Bindung zwischen H2A-H2B Dimer und DNA wurden aus den K_{obs} -Werten aus H2B-DNA⁺⁵² die Anzahl an Ionenbindungen zu 11 ± 1 bestimmt.

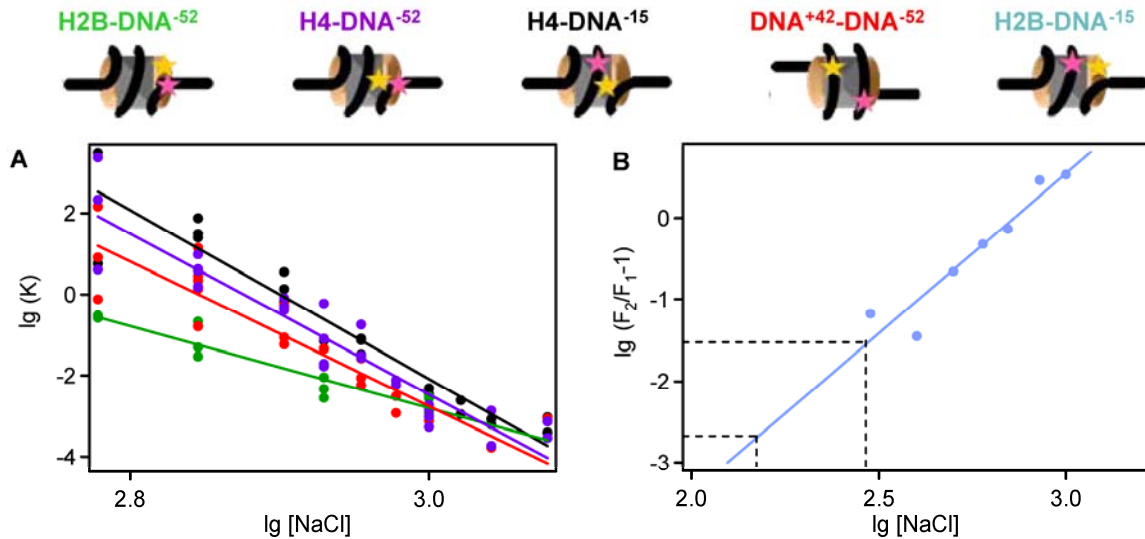


Abbildung 39: Anzahl der Ionenbindungen zwischen den Untereinheiten des Nukleosoms

A) Aus der Ionenstärkeabhängigkeit der Dissoziation konnte die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und DNA und $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer und DNA bestimmt werden. B) Das Verhältnis von Nukleosomen in der offenen Konformation zu intakten Nukleosomen kann aus dem Anteil der FRET-Population von H2B-DNA⁻¹⁵ und H2B-DNA⁻⁵² ermittelt werden. Aus der Ionenstärkeabhängigkeit dieses Verhältnisses lässt sich die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer ermitteln. Die Farbe der einzelnen Konstrukte ist in den schematischen Abbildungen darüber dargestellt. Die Positionen der Fluorophore sind dabei durch Sterne markiert. Darstellung modifiziert aus (97).

Tabelle 14: Anzahl der Ionenbindungen zwischen den Untereinheiten des Nukleosoms

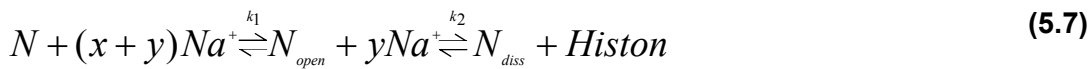
Angegeben ist, welche FRET Daten für die Berechnung von K_{obs} verwendet wurden, zwischen welchen Untereinheiten die Bindung vorliegt und welche Anzahl an Ionenbindungen ermittelt wurden.

FRET Daten	Untereinheiten	Anzahl der Ionenbindungen
H2B-DNA ⁻⁵²	H2A-H2B / DNA	11 ± 1
H4-DNA ⁻⁵²	$(\text{H3-H4})_2$ / DNA	23 ± 2
H4-DNA ⁻¹⁵	$(\text{H3-H4})_2$ / DNA	24 ± 2
DNA ⁺⁴² -DNA ⁻⁵²	nicht definiert	20 ± 2
H2B-DNA ⁻¹⁵	H2A-H2B / $(\text{H3-H4})_2$	4 ± 1

Der Verlust von FRET zwischen H2B und DNA an der Position -15 bzw. FRET zwischen den Positionen +42 und -52 auf der DNA stammt nicht von einer Dissoziation nach Gleichung (5.1). Der Verlust von FRET zwischen H2B und DNA an der Position -15 wurde einer Konformationsänderung, bei der die Bindung zwischen H2A-H2B Dimer und $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer geöffnet wird, zugeordnet. Der Verlust von FRET zwischen den zwei Positionen auf der DNA entsteht durch das Öffnen der DNA. Gleichung (5.6) lässt sich nicht für diese monomolekularen Prozesse anwenden.

Unter der Annahme, dass das Öffnen der DNA mit einem Dissoziationsschritt gekoppelt ist, wurde die Gleichgewichtskonstante für $\text{DNA}^{+42}\text{-DNA}^{-52}$ nach Gleichung (5.6) aufgetragen (s. Abbildung 39). Der aus der Steigung ermittelte Wert (20 ± 2) entspricht innerhalb der Fehlergrenzen dem doppelten Wert für die Bindung von H2A-H2B Dimer und DNA. Dies kann als Hinweis darauf interpretiert werden, dass das Öffnen der DNA der Dissoziation beider H2A-H2B Dimere folgt.

Um zu bestimmen, wie viele Ionenpaare gebrochen werden, wenn sich das Nukleosom öffnet, wurde ein anderer Ansatz gewählt (97), der im Folgenden hergeleitet wird. Die Dissoziation des Nukleosoms (N) wird in zwei Prozesse unterteilt: Dem ersten, in dem die offene Konformation (N_{open}) entsteht, und dem zweiten, in dem die Histonuntereinheiten von der DNA abdissoziieren. Alle Teilchen, die bei der Dissoziation von Histonen von Nukleosomen entstehen, also freie DNA und Histon-DNA Komplexe, werden in diesem Gleichgewicht unter dissoziierte Nukleosomen (N_{diss}) zusammengefasst.



$$K_1 = \frac{[N_{\text{open}}]}{[N][Na^+]^x} \quad (5.8)$$

$$K_2 = \frac{[N_{\text{diss}}][\text{Histon}]}{[N_{\text{open}}][Na^+]^y} \quad (5.9)$$

- N = intakte Nukleosomen
- N_{open} = Nukleosomen, in denen die Grenzfläche zwischen H2A-H2B/(H3-H4)₂ geöffnet ist
- N_{diss} = Nukleosomen, in denen mindestens ein Histon dissoziiert ist
- x = Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B/(H3-H4)₂
- y = Anzahl der Ionen, die bei der Dissoziation der Histone an die DNA binden
- K_1 = Gleichgewichtskonstante des Öffnens der H2A-H2B/(H3-H4)₂ Grenzfläche
- K_2 = Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von Histonen und DNA

Aus den spFRET Daten konnte der Anteil an intakten Nukleosomen (N) bestimmt werden. Er entspricht dem Anteil der FRET-Population von H2B-DNA⁻¹⁵ (F_1 nach Gleichung (5.10)). Der Anteil an Nukleosomen, in denen die Grenzfläche zwischen H2A-H2B/(H3-H4)₂ geöffnet ist aber in denen noch keine Dissoziation stattgefunden hat (N_{open}), ist nicht direkt aus den spFRET Daten zugänglich. Mit Hilfe dieser FRET-Population von H2B-DNA⁻⁵² (F_2 nach

Gleichung (5.11)) kann jedoch das Verhältnis von Nukleosomen in der offenen Konformation (N_{open}) zu intakten Nukleosomen (N) ermittelt werden (Gleichung (5.12)).

$$F_1 = \frac{[N]}{[N] + [N_{open}] + [N_{diss}]} \quad (5.10)$$

$$F_2 = \frac{[N] + [N_{open}]}{[N] + [N_{open}] + [N_{diss}]} \quad (5.11)$$

F_1 = Anteil der FRET-Population in Nukleosomen, in denen H2B und DNA⁻¹⁵ markiert ist

F_2 = Anteil der FRET-Population in Nukleosomen, in denen H2B und DNA⁻⁵² markiert ist

Hierfür wird das Verhältnis von Gleichung (5.10) und Gleichung (5.11) gebildet.

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{[N]}{[N] + [N_{open}]} \quad (5.12)$$

$$\frac{[N_{open}]}{[N]} = \frac{F_2}{F_1} - 1 \quad (5.13)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (5.13) in das Massenwirkungsgesetz (Gleichung ((5.8))) erhält man nach Logarithmieren Gleichung (5.14).

$$\lg\left(\frac{F_2}{F_1} - 1\right) = \lg(K_1) + x \lg([Na^+]) \quad (5.14)$$

Durch die Auftragung nach Gleichung (5.14) konnte aus der Steigung die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer bestimmt werden (Abbildung 39). Durch Extrapolation konnte daraus abgelesen werden, wie groß die Gleichgewichtskonstante bei physiologischen Bedingungen (150- 300 mM NaCl) ist. Zum einen konnte aus der Gleichgewichtskonstanten der Anteil an Nukleosomen in der offenen Konformation zu 0,2 - 3 % berechnet werden. Zum anderen konnte nach Gleichung (5.15) die frei Energie, die unter physiologischen Bedingungen für das Öffnen der Grenzfläche nötig ist, zu 3,5 – 2 kcal/mol bestimmt werden.

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (5.15)$$

- ΔG = freie Reaktionsenergie
 R = allgemeine Gaskonstante
 T = Temperatur
 K = Gleichgewichtskonstante

5.1.6 Vergleich von FCS und spFRET Ergebnissen

Dissoziation von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA wurden sowohl in FCS (als Anstieg des Diffusionskoeffizienten) als auch in spFRET Experimenten (als Zunahme der NoFRET-Population auf Kosten der FRET-Population) detektiert. Allerdings unterschied sich die NaCl Konzentration, bei der die jeweilige Dissoziation gemessen wurde. Während in FCS Messungen erst bei 800 mM ein signifikanter Anstieg des Diffusionskoeffizienten des H2A-H2B Dimer detektiert wurde, konnte schon bei 400 mM NaCl eine Abnahme der FRET-Population von H2B-DNA⁻⁵² beobachtet werden. Der Diffusionskoeffizient des (H3-H4)₂ Tetramer stieg bei 1100 mM NaCl an, während die FRET-Population von H4-DNA⁻⁵² und H4-DNA⁻¹⁵ schon bei 800 mM abfiel.

Es scheint zunächst, als würden sich die Ergebnisse der FCS und spFRET Messungen widersprechen. Es ist aber bekannt, dass viele Faktoren wie die Temperatur, der pH-Wert und die Nukleosomenkonzentration die Stabilität von Nukleosomen beeinflussen (11,29,32,92,101). Während FCS und spFRET Messungen in dem gleichen Puffer und bei derselben Temperatur durchgeführt werden, unterscheiden sie sich in der eingesetzten Nukleosomenkonzentration.

In spFRET Messungen musste die Nukleosomenkonzentration so gewählt werden, dass sich jeweils maximal ein FRET markiertes Nukleosom im Fokus befindet. Diese Bedingung ist bei 250 pM Nukleosomenkonzentration erfüllt. Für FCS Messungen wurde die Nukleosomenkonzentration höher gewählt (20 nM), um den Fehler bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten gering zu halten (83). Im Folgenden soll gezeigt werden, dass diese Differenz in der NaCl Konzentration zwischen spFRET und FCS auf den Unterschied in der Nukleosomenkonzentration im experimentellen Ansatz zurückzuführen ist.

Hierfür wurde eine spFRET Messung bei 250 pM Nukleosomenkonzentration durchgeführt und mit einer Messung verglichen, in der die Nukleosomenkonzentration durch Zugabe von unmarkierten Nukleosomen auf 20 nM erhöht wurde. Für dieses Experiment wurden DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² Nukleosomen bei einer NaCl Konzentration von 860 mM NaCl verwendet. Diese NaCl Konzentration wurde gewählt, da sie $c_{1/2}$ für das Konstrukt entspricht. Ein

Vergleich der Histogramme ist in Abbildung 40 dargestellt. Während bei 250 pM Nukleosomenkonzentration 50 % der Nukleosomen Energietransfer zeigte, war der Anteil der FRET-Population bei einer Nukleosomenkonzentration von 20 nM deutlich höher (80 %). Man kann daraus schließen, dass der Unterschied in der NaCl Konzentration zwischen FCS und spFRET auf den Unterschied in der Nukleosomenkonzentration zurückzuführen ist. 100 % FRET-Population werden nicht erreicht, da auch andere Effekte zu der NoFRET-Population beitragen (Bleichen des Akzeptors und unvollständige Markierung der DNA).

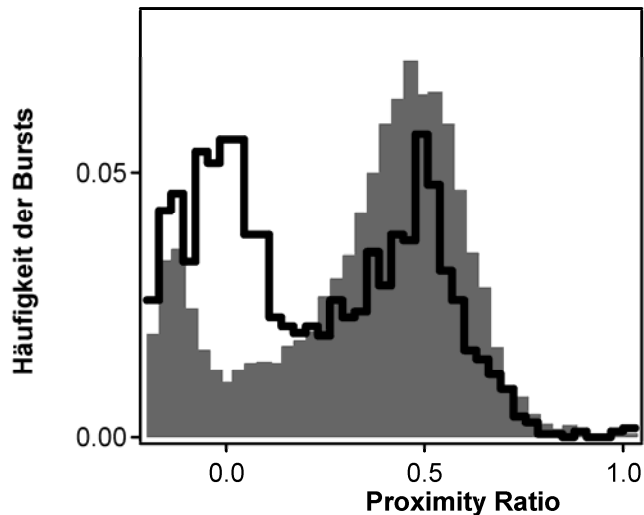


Abbildung 40: Einfluss der Konzentration in FCS vs. spFRET

Dargestellt sind die Histogramme zweier spFRET Messungen von DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² Nukleosomen bei 860 mM NaCl. Unter Einzelmolekülbedingungen (dargestellt in schwarz) zeigen ca. 50 % der Nukleosomen FRET. Wurde die Nukleosomenkonzentration durch Zugabe von unmarkierten Nukleosomen auf 20 nM erhöht (dargestellt in grau), war der Anteil der FRET-Population signifikant höher (80 %). Darstellung modifiziert aus (97).

5.1.7 Diskussion

Durch Erhöhen der Ionenstärke wurde das Öffnen von Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* induziert. Dieser Prozess wurde mit FCS und spFRET beobachtet. Mittels FCS wurde der Diffusionskoeffizient, ein Maß für die Form und Größe eines Moleküls, untersucht. Die Dissoziation einer Untereinheit vom Nukleosom kann durch die Änderung des Diffusionskoeffizienten beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass zunächst das H2A-H2B Dimer und erst bei höheren NaCl Konzentrationen das (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA dissoziiert.

Mit spFRET wurde der Energietransfer zwischen 5 verschiedenen Positionen während des Öffnens verfolgt. Zusammen mit den Ergebnissen der FCS Messungen kann hieraus ein Modell für das Öffnen des Nukleosoms hergeleitet werden (s. Abbildung 41). Die Ergebnisse der spFRET Experimente bestätigten, dass zunächst das H2A-H2B Dimer und erst bei höheren NaCl Konzentrationen das (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA dissoziiert. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Dissoziation des H2A-H2B Dimers eine Konformationsänderung des Nukleosoms voraus geht. In dieser Konformation sind alle Histone noch an die DNA gebunden, während die Bindung zwischen H2A-H2B und (H3-H4)₂ geöffnet ist.

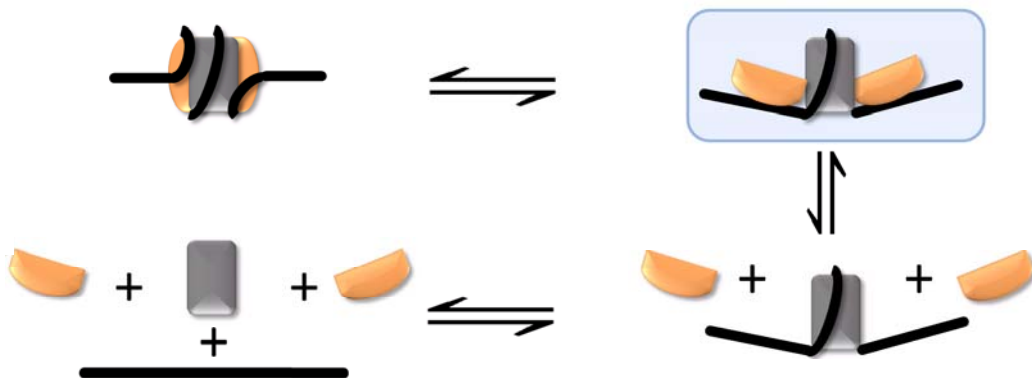


Abbildung 41: Modell für das Öffnen des Nukleosoms

Durch FCS Messungen konnte gezeigt werden, dass das Histonoktamer in zwei Schritten zerfällt. In einem ersten dissoziiert H2A-H2B, während (H3-H4)₂ erst in einem zweiten Schritt dissoziiert. In spFRET Messungen wurde dies bestätigt. Darüber hinaus wurde eine Konformationsänderung detektiert, die der Dissoziation vorausgeht. In diese Konformation (hier blau hinterlegt) öffnet sich die Bindung zwischen H2A-H2B und (H3-H4)₂. Darstellung modifiziert aus (97).

Durch die limitierte Anzahl von FRET Abständen, die beobachtet wurden, können wenig Aussagen über die Struktur getroffen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich nicht das gesamte H2A-H2B Histondimer, sondern lediglich die markierte

Struktureinheit, die α C-Helix von H2B, verschiebt. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die α C-Helix von H2B über zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen im Oktamer gebunden wird (2). Zudem sind die Kristallstrukturen des Oktamers bei 2 M NaCl und die des Oktamers innerhalb des Nukleosoms unter physiologischen Bedingungen annähernd identisch (49). Es ist nicht davon auszugehen, dass sich Struktur des Oktamers bei dazwischen liegenden Ionenstärken verändert. Die Vergrößerung des Abstands von Dimer H2B T112C zur Position der DNA an der Dyadenachse ist daher am wahrscheinlichsten auf das hier vorgeschlagene Öffnen der Grenzfläche zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer zurückzuführen. Aus der Ionenstärkeabhängigkeit des FRET Anteils lässt sich die Anzahl an Ionenbindungen zwischen den einzelnen Untereinheiten bestimmen. Interessanterweise zeigt sich, dass die Zahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und DNA ungefähr halb so groß ist (11 ± 1) wie die zwischen (H3-H4)₂ und DNA (24 ± 2). Unter der Annahme, dass die Bindungen zwischen Histonen und DNA gleichmäßig im Nukleosom verteilt sind, bestätigt dies, dass H2A-H2B als ein Dimer aus zwei Histonen und (H3-H4) als ein Tetramer aus vier Histonen bindet. Die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B und (H3-H4)₂ wurde zu 4 ± 1 bestimmt. Dies bestätigt, dass es sich hierbei um die schwächste Bindung handelt, die beim Öffnen des Nukleosoms zuerst gebrochen wird.

5.2 Assemblierung des Nukleosoms

Im Folgenden soll untersucht werden, ob die Dissoziation und die dabei auftretenden Konformationsänderungen reversibel sind. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurden intakte Nukleosomen teilweise dissoziiert und der Prozess der Reassemblierung beobachtet (5.2.1 Reassemblierung). Dieser Ansatz wurde dafür verwendet, den Austausch von H2A-H2B Dimer zwischen Nukleosomen nachzuweisen (5.2.2 Austausch von H2A-H2B Dimeren zwischen Nukleosomen). Zum anderen wurde ausgehend von den einzelnen Komponenten die Assemblierung zum Nukleosom beobachtet. Dies wurde mit FCS (5.2.3 Assemblierung des Nukleosoms untersucht durch FCS) und spFRET (5.2.4 Assemblierung des Nukleosoms untersucht durch spFRET) analysiert.

5.2.1 Reassemblierung

Bei einer NaCl Konzentration von 900 mM macht die FRET-Population aller verwendeten Konstrukte mit Histonen aus *X. laevis* unter Einzelmolekülbedingungen (250 pM Nukleosomenkonzentration) ~ 50 % oder weniger der Gesamtburstzahl aus. Die Abnahme der FRET-Populationen wurde so interpretiert, dass in einem großen Teil der Nukleosomen beide H2A-H2B Dimere dissoziiert sind, die DNA eine lineare Struktur eingenommen hat und in ungefähr der Hälfte der Nukleosomen das (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA dissoziiert ist. Um zu untersuchen, ob diese NaCl induzierten Strukturänderungen reversibel sind, wurden Experimente durchgeführt, in denen die NaCl Konzentration nach Erreichen dieses Zustands wieder reduziert wurde.

Dazu wurden Nukleosomen bei 900 mM NaCl bis zum Erreichen des Gleichgewichts inkubiert. Ein Aliquot des Ansatzes wurde in einer spFRET Messung analysiert, um den Ausgangszustand der Reassemblierung zu quantifizieren. Die übrige Probe wurde durch Verdünnen mit Puffer, der kein NaCl enthielt, zu einer NaCl Konzentration zwischen 450 und 300 mM gebracht. Diese Konzentration wurde gewählt, weil Nukleosomen bei diesen NaCl Konzentrationen unter Einzelmolekülbedingungen stabil sind. Nach der Inkubation wurden die Proben ebenfalls in einer spFRET Messung analysiert. Ein Anstieg des Anteils der FRET-Population weist dabei die Reassemblierung von Nukleosomen nach. Der Anstieg von Energietransfer zwischen (H3-H4)₂ Tetramer und DNA zeigt, dass das Tetramer wieder an die DNA bindet, der Anstieg von Energietransfer zwischen den Positionen +42 und -52 auf der DNA, dass sich die DNA wieder um die Histone legt, und der Anstieg von Energietransfer

zwischen H2A-H2B Dimer und DNA, dass das H2A-H2B Dimer wieder an die DNA (Position -52) und an das (H3-H4)₂ Tetramer (Position -15 auf der DNA) bindet. In Abbildung 42 ist der schematische Ablauf der Experimente dargestellt.

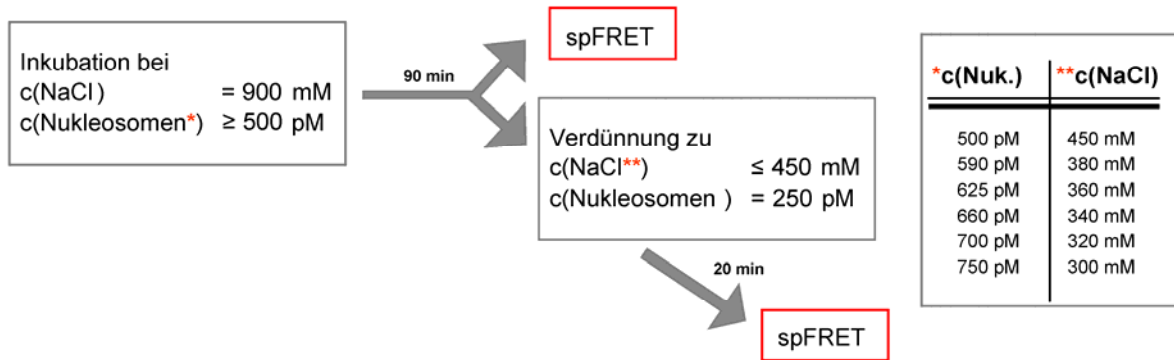


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Experimente zur Reassemblierung

Damit die Nukleosomenkonzentration der Probe nach der Verdünnung 250 pM beträgt, muss die Inkubation bei 900 mM bei einer höheren Nukleosomenkonzentration erfolgen. Die eingesetzte Nukleosomenkonzentration ist von der NaCl Endkonzentration nach der Verdünnung abhängig. Die Werte sind in der Tabelle aufgeführt.

Der durchschnittliche Anteil der FRET-Population nach Inkubation bei 900 mM NaCl ist in Abbildung 43 dargestellt. Der Anteil der FRET-Population war höher als der, der in den Experimenten zur Dissoziation bestimmt wurde (s. Abbildung 43 a). Dies bedeutet, dass unter den vorliegenden Messbedingungen die Dissoziation der Nukleosomen nicht so weit vorgeschritten war. Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass sich die Messungen zur Reassemblierung und zur Dissoziation in ihrer Nukleosomenkonzentration unterscheiden. Dies beeinflusst wie zuvor beschrieben (s. Kapitel 5.1.2.1) die Stabilität der Nukleosomen.

Die unterschiedlichen Nukleosomenkonzentrationen in den Messungen zur Reassemblierung sind jedoch unvermeidbar. Um bei der Messung nach der Verdünnung 250 pM Nukleosomenkonzentration zu erreichen, muss der erste Inkubationsschritt (bei 900 mM NaCl) bei einer Nukleosomenkonzentration zwischen 500 und 750 pM erfolgen (s. Schema in Abbildung 42). Die Experimente zur Dissoziation wurden direkt bei 250 pM Nukleosomenkonzentration durchgeführt. Da die Dissoziation begonnen hat und für alle Proben der Anteil der FRET-Population gegenüber intakten Nukleosomen abgenommen hat, ist es gleichwohl möglich, die Reversibilität zu untersuchen.

Um zu überprüfen, ob der Ausgangszustand für die Reassemblierung einheitlich ist, wurde der Anteil FRET-Population bei der niedrigsten (500 pM) und höchsten (750 pM) Nukleosomenkonzentration verglichen (s. Abbildung 43 b). Da dieser Unterschied nicht signifikant ist, kann näherungsweise ein einheitlicher Ausgangszustand angenommen werden.

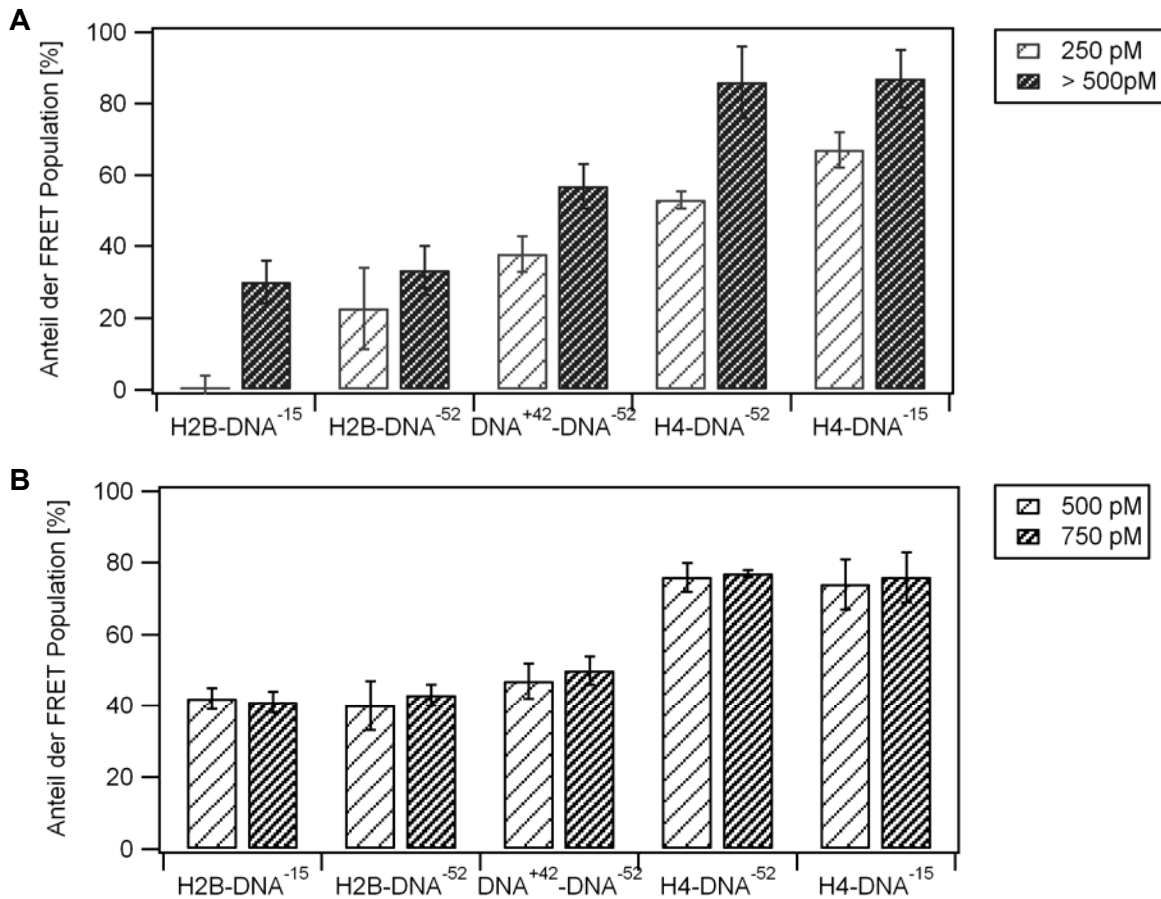


Abbildung 43: Anteil der FRET-Population bei verschiedenen Nukleosomenkonzentrationen

A) Der Anteil der FRET-Population, der bei 250 pM Nukleosomenkonzentration vorliegt, ist signifikant größer als der bei Nukleosomenkonzentrationen über 500 pM. B) Der Anteil der FRET-Population bei 500 und 750 pM Nukleosomenkonzentration ist annähernd gleich groß. Es kann näherungsweise von einem einheitlichen Ausgangszustand für die Reassemblierung ausgegangen werden. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichung aus mindestens drei Messungen.

Für alle Proben konnte gezeigt werden, dass bei Verdünnung der Anteil der FRET-Population zunahm (s. Abbildung 44, a und c). Für H4 markierte Nukleosomen konnte die FRET-Population durch Reduktion der NaCl Konzentration auf 450 mM wieder hergestellt werden. Dies zeigt, dass das (H3-H4)₂ Tetramer durch Reduktion der NaCl Konzentration wieder vollständig an die DNA bindet. Für DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵² und H2B markierte Nukleosomen musste die NaCl Konzentration weiter reduziert werden. Selbst bei 300 mM ist der Anteil der FRET-Population geringer als der in intakten Nukleosomen. Der Anstieg der FRET-Population zeigt, dass ein Teil der DNA sich wieder um die Histone legt (FRET zwischen DNA⁺⁴² und DNA⁻⁵²) und das H2A-H2B Dimer an die DNA (FRET zwischen H2B und DNA⁻⁵²) und an das (H3-H4)₂ Tetramer (FRET zwischen H2B und DNA⁻¹⁵) bindet. Die Form der FRET-Population entspricht derjenigen intakter Nukleosomen (s. Abbildung 44 b). Dies deutet darauf hin, dass die Nukleosomen, die so gebildet werden, die ursprüngliche Struktur

aufweisen. Die Tatsache, dass der Anteil der FRET-Population geringer ist als in intakten Nukleosomen, zeigt, dass durch Verdünnung die Konformationsänderungen nicht vollständig rückgängig gemacht wurden. Möglicherweise sind die Konformationsänderungen nicht vollständig reversibel. Es ist allerdings auch möglich, dass die Prozesse nicht vollständig ablaufen, da die NaCl Konzentration sehr schnell in einem Schritt reduziert wird.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein grundsätzlich anderer Mechanismus gewählt, um die Reversibilität zu untersuchen.

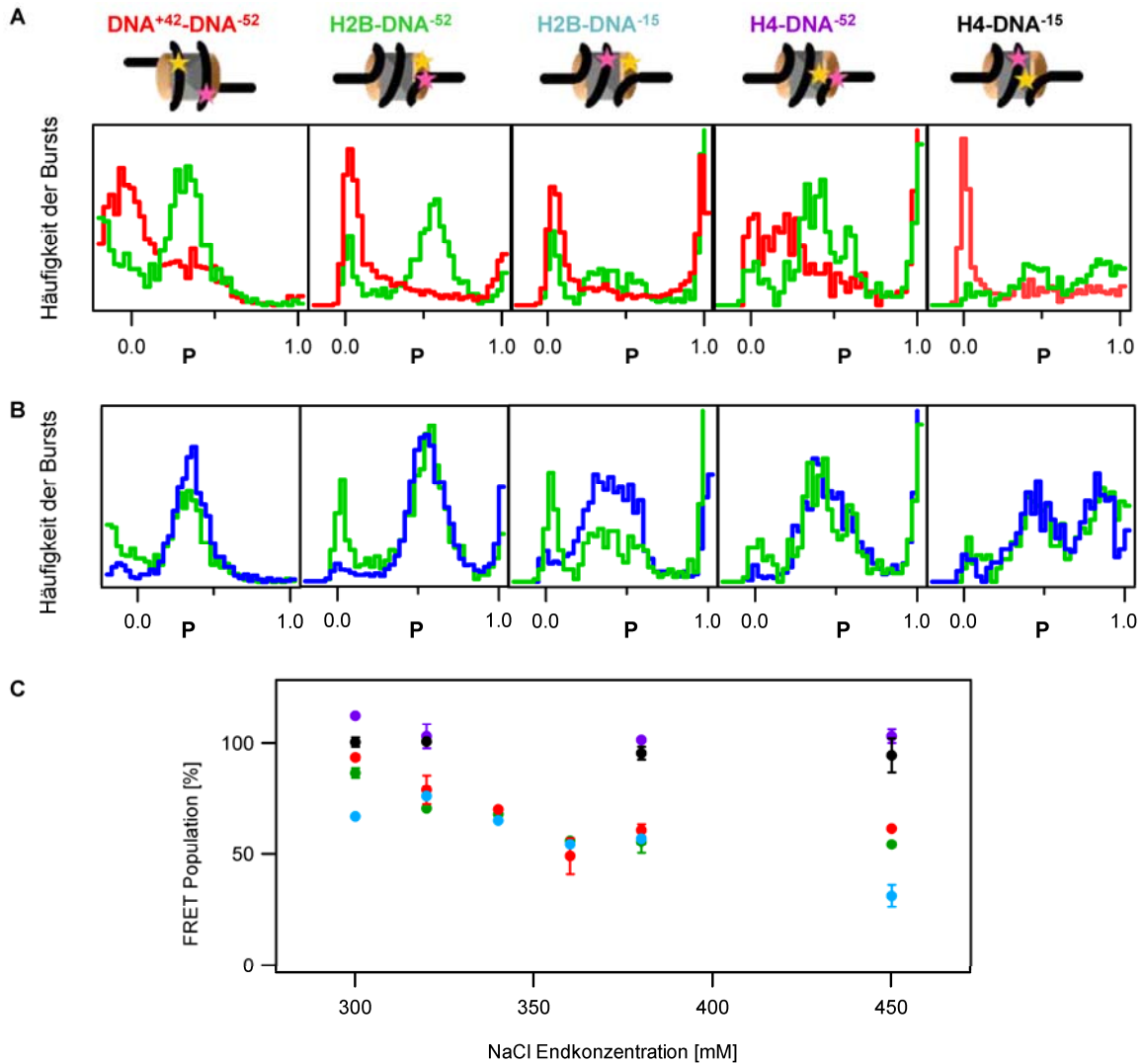


Abbildung 44: Anstieg der FRET-Population bei Verdünnung zu geringerer NaCl Konzentration

A) Vergleich von Histogrammen nach Inkubation der Nukleosomen bei 900 mM NaCl (in rot) und nach Verdünnung zu einer geringeren NaCl Konzentration (in grün). Für DNA⁺⁴²-DNA⁻⁵², H2B-DNA⁻⁵² und H2B-DNA⁻¹⁵ wurden exemplarisch Histogramme bei 300 mM NaCl dargestellt, für H4-DNA⁻⁵² und H4-DNA⁻¹⁵ bei 450 mM NaCl, da jeweils bei dieser Konzentration der Anteil der FRET-Population wieder demjenigen intakter Nukleosomen entsprach/maximal war. B) Vergleich von Histogrammen nach Verdünnung zu geringeren NaCl Konzentrationen (grün, analog zu A) und Histogrammen von intakten Nukleosomen (in blau). Die Form der FRET-Population nach der Verdünnung entspricht der Form der intakten Nukleosomen. C) Der Anteil der FRET-Population wurde nach der Verdünnung zu der angegebenen NaCl Konzentration für die verschiedenen Konstrukte quantifiziert (Farben wie in der schematischen Darstellung). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von bis zu fünf Messungen.

5.2.2 Austausch von H2A-H2B Dimeren zwischen Nukleosomen

Die zuvor beschriebene Methode, die Reassemblierung von Nukleosomen zu beobachten, wurde im Folgenden dazu verwendet, die reversible Dissoziation des H2A-H2B Dimers nachzuweisen. Wie in Kapitel 3.2.6.5 beschrieben, wurden Nukleosomen, die ausschließlich am H2A-H2B Dimer mit dem Donorfluorophor markiert sind, und Nukleosomen, die ausschließlich an der DNA (DNA⁻⁵²) mit Akzeptorfluorophor markiert sind, gemischt und bei 760 mM NaCl inkubiert. Diese NaCl Konzentration wurde gewählt, da unter diesen Bedingungen die (H3-H4)₂ Tetramere noch unverändert an die DNA binden, ein deutlicher Teil der H2A-H2B Dimere allerdings bereits dissoziiert vorliegt. Anschließend wurde die NaCl Konzentration zu 380 mM verdünnt. In Abbildung 45 sind die Histogramme der Probe bei 760 mM und 380 mM dargestellt.

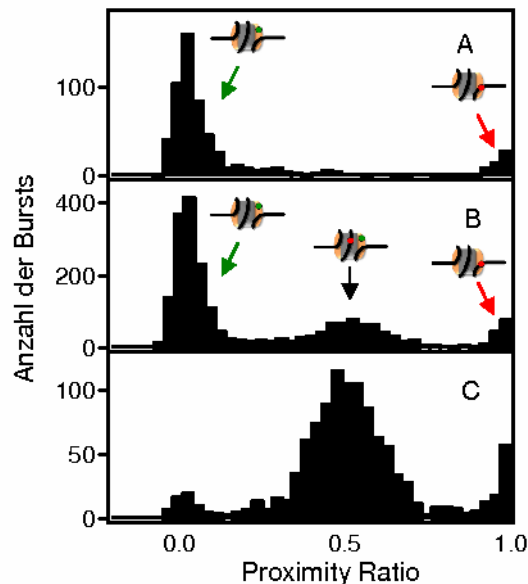


Abbildung 45: Austausch von H2A-H2B Dimeren zwischen Nukleosomen

Histogramme einer Mischung von zwei unterschiedlich markierten Nukleosomen: Nukleosomen, die an H2B mit Alexa 488 markiert sind, und Nukleosomen, die an der DNA⁻⁵² mit Alexa 594 markiert sind, A) bei 760 mM NaCl und 500 pM Nukleosomenkonzentration, B) nach Inkubation bei 760 mM und anschließender Verdünnung zu 380 mM NaCl und 250 pM Nukleosomenkonzentration, C) Histogramme von Nukleosomen, die an H2B und DNA⁻⁵² markiert sind, unter stabilen Bedingungen. Durch Vergleich von A und B kann gezeigt werden, dass H2A-H2B Dimere von Nukleosomen abdissoziieren und an andere DNA binden. Durch Vergleich von B mit C kann gezeigt werden, dass das H2A-H2B Dimer an der ursprünglichen Position auf der DNA gebunden hat, was darauf hindeutet, dass intakte Nukleosomen entstanden sind. Darstellung modifiziert aus (97).

Während bei 900 mM keine FRET Bursts detektiert wurden, ist nach Verdünnung zu 380 mM NaCl eine FRET-Population entstanden. Das Auftreten von Energietransfer zeigt, dass ein Teil der markierten H2A-H2B Dimere von der unmarkierten DNA dissoziiert sein und nach Reduktion der NaCl Konzentration auch an markierte DNA gebunden haben muss. Ein

Vergleich mit einem Histogramm intakter Nukleosomen, die an H2A-H2B Dimer und DNA⁻⁵² markiert sind (s. Abbildung 45 c), zeigt, dass der FRET-Peak an der selben Stelle liegt, also die H2A-H2B Dimere sehr wahrscheinlich an der ursprünglichen Position auf der DNA gebunden haben.

5.2.3 Assemblierung des Nukleosoms untersucht durch FCS

Die Untersuchung der Reassemblierung hat gezeigt, dass die Konformationsänderungen bei der NaCl induzierten Dissoziation zumindest teilweise reversibel sind. Um die Reversibilität weiter zu analysieren, wurde die Assemblierung von Nukleosomen aus Oktameren und DNA während der Rekonstitution untersucht. Für die Rekonstitution wurden Oktamere und DNA wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben bei 2 M NaCl gemischt und die NaCl Konzentration in 7 Schritten durch Dialysieren auf 300 mM NaCl reduziert. Der Diffusionskoeffizient wurde bei den verschiedenen NaCl Konzentrationen relativ zu dem Standard, Alexa 488, mittels FCS bestimmt (Abbildung 46). Hierfür wurde ein kleiner Teil des Rekonstitutionsansatzes in Puffer mit der entsprechenden NaCl Konzentration verdünnt (20 nM Nukleosomenkonzentration). In Kapitel 5.1.1.2 wurde gezeigt, dass die Proben durch die Verdünnung destabilisiert werden. Um den Zustand während der Rekonstitution bestmöglich zu untersuchen, wurden die Proben ohne Inkubation, also nicht unter Gleichgewichtsbedingungen, eingesetzt.

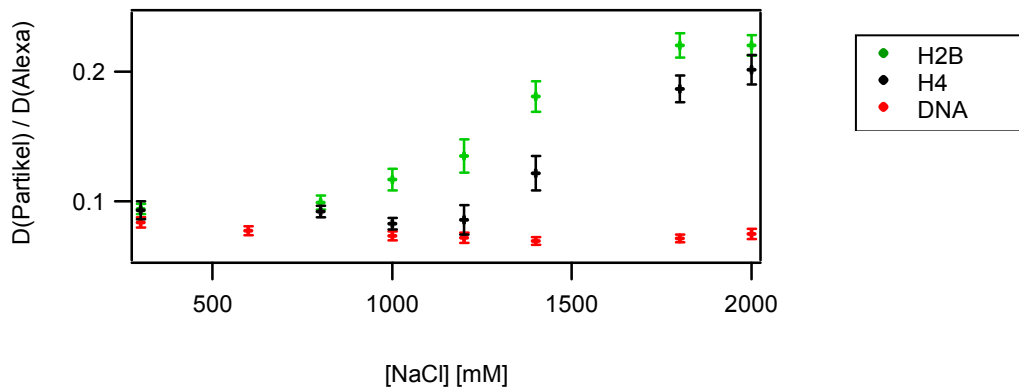


Abbildung 46: Diffusionskoeffizienten der Untereinheiten während der Assemblierung

Während der Rekonstitution von Oktamer und DNA (210 bp) zu Nukleosomen wurde der relative Diffusionskoeffizient der markierten Untereinheit (H2B (grün), H4 (schwarz), bzw. die DNA (rot)) bei verschiedenen NaCl Konzentrationen gemessen. Aus der Reihenfolge der Änderungen kann man darauf schließen, dass zunächst das (H3-H4)₂ Tetramer und dann das H2A-H2B Dimer an die DNA bindet. Für die Rekonstitution wurde ein DNA-Fragment mit 210 bp Länge verwendet. Der Unterschied im Diffusionskoeffizient zwischen linearer DNA und im Nukleosom gebundener DNA konnte so vergrößert werden.

Direkt nach dem Mischen von Oktamer und DNA bei 2 M NaCl wiesen H2B- und H4-markierte Partikel innerhalb der Fehlergrenzen den gleichen Diffusionskoeffizienten auf. Der

Diffusionskoeffizient von H4-markierten Partikeln nahm allerdings bereits bei 1,8 M NaCl ab und war zwischen 1,8 M und 1 M NaCl deutlich geringer als der von H2B-markierten Partikeln. Der Diffusionskoeffizient von DNA markierten Partikeln war bei hohen NaCl Konzentrationen deutlich geringer und stieg ab 1,2 M NaCl leicht an. Bei 300 mM NaCl überlappten die Diffusionskoeffizienten der drei Proben. Die NaCl Konzentration wurde nicht weiter reduziert. Die Proben wurden mittels nativer PAGE analysiert und es konnte gezeigt werden, dass Nukleosomen entstanden waren.

Die Tatsache, dass der Diffusionskoeffizient von H2B- und H4-markierten Partikeln zwischen 1,8 und 1 M NaCl voneinander abweicht, zeigt, dass, obwohl Oktamere für die Rekonstitution eingesetzt werden, zunächst nur das $(H3-H4)_2$ Tetramer an die DNA bindet. H2A-H2B Dimere binden erst in einem zweiten Schritt. Der Anstieg des Diffusionskoeffizienten von DNA-markierten Partikeln deutet darauf hin, dass sich die DNA um die Histone bindet und eine kompaktere Form annimmt. Die identischen Diffusionskoeffizienten bei 300 mM NaCl bestätigen die Bildung von Nukleosomen.

5.2.4 Assemblierung des Nukleosoms untersucht durch spFRET

Mit FCS konnte gezeigt werden, dass zunächst das $(H3-H4)_2$ Tetramer und danach die H2A-H2B Dimere an die DNA binden. Dies entspricht der Umkehrung der Schritte, die für die Dissoziation gefunden wurden. Für eine detaillierte Betrachtung wurde Energietransfer zwischen H2A-H2B Dimer bzw. $(H3-H4)_2$ Tetramer und DNA im Verlauf der Rekonstitution bei verschiedenen NaCl Konzentrationen gemessen (markierte Positionen siehe Abbildung 31). Wie zuvor in den FCS Experimenten wurde hierfür ein kleiner Teil des Rekonstitutionsansatzes in Puffer mit der entsprechenden NaCl Konzentration verdünnt (250 pM Nukleosomenkonzentration) und ohne weitere Inkubation mittels spFRET analysiert. Bei 2 M NaCl konnte für kein Konstrukt Energietransfer gezeigt werden. Durch Reduktion der NaCl Konzentration in der Dialyse entstand in allen Konstrukten eine FRET-Population (s. Abbildung 47). Bereits bei 1 M NaCl konnte ein deutlicher Anstieg der FRET-Population nachgewiesen werden.

Der Anteil der FRET-Population nahm in der umgekehrten Reihenfolge zu, wie sie für die Abnahme der FRET-Population bei der Dissoziation gefunden wurde: zunächst zwischen $(H3-H4)_2$ Tetramer und DNA, dann zwischen den Positionen +42 und -52 auf der DNA, gefolgt von H2B und DNA⁻⁵² und zuletzt zwischen H2B und DNA⁻¹⁵. Die Form der FRET-Populationen bei niedrigen NaCl Konzentrationen deutet darauf hin, dass intakte Nukleosomen entstanden sind.

Aus der Reihenfolge, mit der das Auftreten der FRET-Populationen zu beobachten war, kann man schließen, dass zuerst das $(H3-H4)_2$ Tetramer und in einem zweiten Schritt das H2A-H2B Dimer die DNA bindet. Die Tatsache, dass zunächst Energietransfer zwischen dem H2A-H2B Dimer und der DNA⁻⁵² und danach erst zwischen H2A-H2B Dimer und DNA⁻¹⁵ auftritt, zeigt, dass das H2A-H2B Dimer erst an die DNA bindet und in dem folgenden Schritt die Bindungen zwischen H2A-H2B Dimer und $(H3-H4)_2$ Tetramer gebildet werden. Die offene Konformation, die bereits beim Öffnen des Nukleosoms beobachtet wurde, tritt demnach auch als Zwischenprodukt bei der Assemblierung auf.

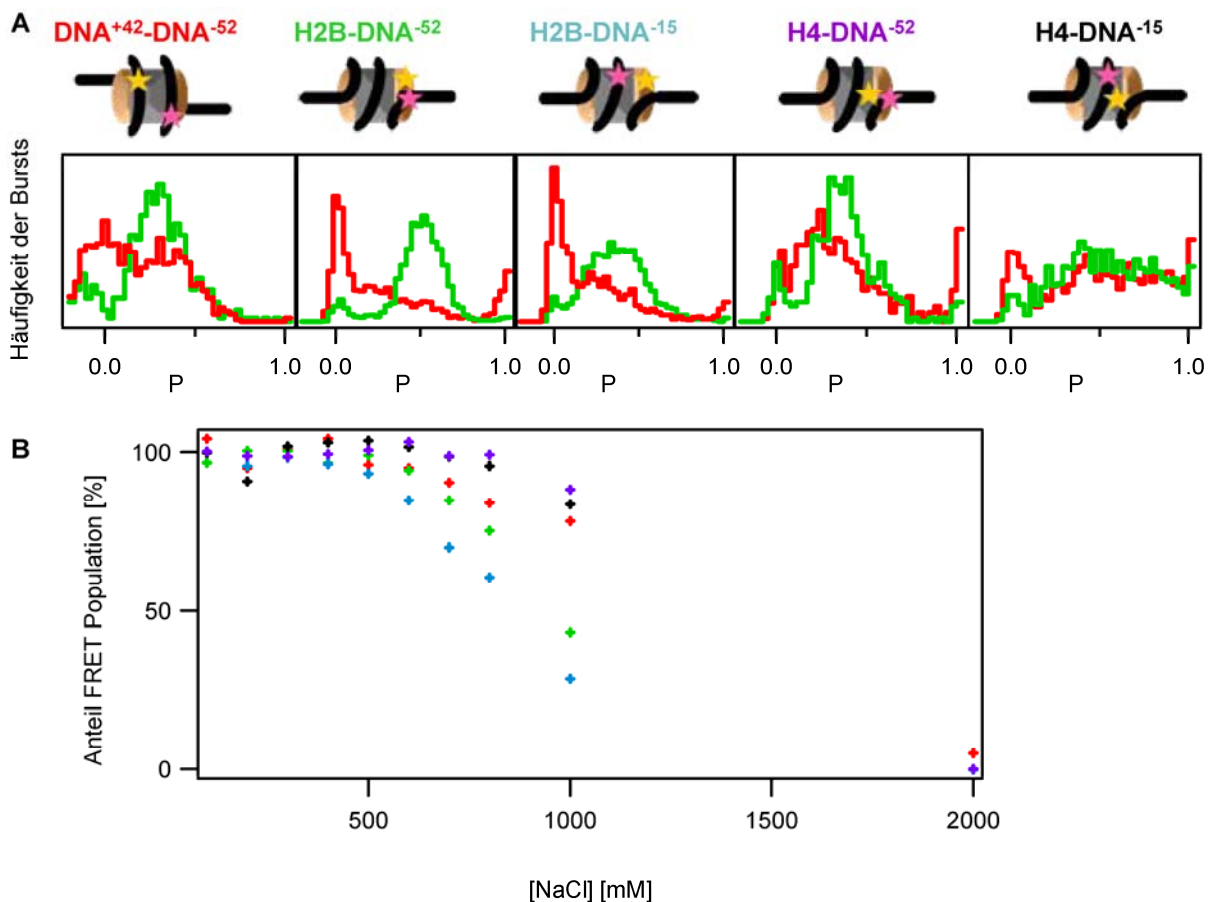


Abbildung 47: Anstieg der FRET-Population während der Rekonstitution

A) Vergleich der Histogramme während der Rekonstitution bei 1000 mM und 200 mM NaCl B) Anteil der FRET-Population während der Rekonstitution in Abhängigkeit der NaCl Konzentration für die verschiedenen Konstrukte (Farben wie in der schematischen Darstellung).

5.2.5 Vergleich von Experimenten zum Öffnen und zur Assemblierung

Bei der Dissoziation und der Assemblierung von Nukleosomen wurden die gleichen Konformationsänderungen beobachtet. Allerdings wurden die einzelnen Konformationsänderungen bei unterschiedlichen NaCl Konzentrationen gemessen. So wurde bei der Analyse der Dissoziation bei 1000 mM der Anteil der FRET-Population für alle

Konstrukte auf 30 – 0 % bestimmt, d.h. die Nukleosomen waren annähernd vollständig zerfallen. Bei der Analyse der Assemblierung lag der Anteil der FRET-Populationen bei 1000 mM zwischen 90 und 30 %, was zeigt, dass der Anteil der intakten Nukleosomen signifikant größer war.

Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Beobachtung lässt sich mit Unterschieden in dem experimentellen Ansatz erklären. Bei den Experimenten zu Dissoziation wurde der Gleichgewichtszustand bei der jeweiligen Nukleosomenkonzentration untersucht, d.h. die Probe wurde nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten analysiert. Bei der Analyse der Assemblierung wurde versucht, den Zustand der Probe in dem Rekonstitutionsansatz (bei 300 nM Nukleosomenkonzentration) zu bestimmen. Die Probe wurde dazu direkt nach der Verdünnung für das jeweilige Experiment ohne weitere Inkubation analysiert.

Es wurde bereits gezeigt, dass der Anteil der FRET-Population nach der Verdünnung zu Messbedingungen (250 pM Nukleosomenkonzentration) exponentiell mit der Zeit abnimmt (s. Kapitel 5.1.1.2). Der Unterschied in der NaCl Konzentration der beobachteten Konformationsänderungen ist auf den Unterschied in der Inkubationszeit zurückzuführen.

5.2.6 Diskussion

Die Reversibilität der Dissoziation von Nukleosomen wurde auf zwei unterschiedliche Arten untersucht. Bei der ersten Art wurde durch Inkubation der Nukleosomen bei hoher NaCl Konzentration die Dissoziation induziert und die Reassemblierung durch den Anstieg der FRET-Population bei Verdünnung zu niedrigeren NaCl Konzentrationen beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass das $(H3-H4)_2$ Tetramer wieder vollständig an die DNA bindet und dass das Öffnen der DNA sowie die Dissoziation des H2A-H2B Dimers zumindest teilweise reversibel sind. Ein Nachteil dieser Messungsart ist, dass der Ausgangszustand der Nukleosomen vor der Reassemblierung zwischen zwei Messungen variieren kann. Die reversible Dissoziation des H2A-H2B Dimers vom Nukleosom konnte mit diesem experimentellen Ansatz allerdings eindeutig nachgewiesen werden. Hierfür wurden Nukleosomen eingesetzt, die nur am H2A-H2B Dimer mit dem Donorfluorophor markiert waren, und Nukleosomen, die nur an der DNA mit dem Akzeptor markiert waren. Die bei Reassemblierung auftretende FRET-Population konnte nur dadurch entstehen, dass das H2A-H2B Dimer zunächst von der nicht markierten DNA dissoziiert ist und danach wieder an die ursprüngliche Position auf einer markierten DNA gebunden hat.

Bei der zweiten Art, die Reversibilität der Dissoziation zu untersuchen, wurde Assemblierung von Oktameren und DNA zu Nukleosomen analysiert. FCS Experimente zeigten, dass trotz Verwendung von Oktameren für die Rekonstitution zunächst das $(H3-H4)_2$ Tetramer und dann das H2A-H2B Dimer an die DNA bindet. In spFRET Messungen wurde beobachtet, dass nach dem Binden des $(H3-H4)_2$ Tetramers und des H2A-H2B Dimers an die DNA der Abstand zwischen H2A-H2B Dimer und der Dyadenachse zunächst noch größer ist als in intakten Nukleosomen. Der größere Abstand zwischen H2A-H2B Dimer und der Dyadenachse deutet darauf hin, dass die Grenzfläche zwischen H2A-H2B Dimer und $(H3-H4)_2$ Tetramer geöffnet ist. Das Öffnen der Grenzfläche entspricht dem ersten Schritt bei der Dissoziation der Nukleosomen. Demnach treten bei der Assemblierung von Nukleosomen die gleichen Zwischenschritte wie bei der Dissoziation in exakt umgekehrter Reihenfolge auf. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Dissoziation vollständig reversibel ist.

5.3 Einfluss des Einbaus der Histonvariante H2A.Z

Es ist bekannt, dass der Einbau von Histonvarianten die Stabilität von Nukleosomen beeinflusst. Ausgehend davon wurde die zuvor entwickelte Untersuchungsmethode für das Öffnen von Nukleosomen im Folgenden dafür verwendet, den Einfluss der Histonvariante H2A.Z auf die Stabilität des Nukleosoms zu analysieren. Das von Frau Prof. Luger zur Verfügung gestellte Histon H2A.Z stammt aus dem Organismus *S. cerevisiae*. Daher wurde zunächst überprüft, ob sich die Nukleosomen aus den Haupthistonen von *S. cerevisiae* von den zuvor verwendeten Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* unterscheiden. Hierfür wurden die Nukleosomen mittels spFRET charakterisiert (5.3.1 Vergleich von Nukleosomen aus *S. cerevisiae* und *X. laevis* mittels spFRET). Anschließend wurde der Mechanismus des Öffnens untersucht (5.3.2 Öffnen des Nukleosoms aus *S. cerevisiae* untersucht durch spFRET) und aus den Ergebnissen die Anzahl der Ionenbindungen zwischen den Untereinheiten bestimmt (5.3.3. Thermodynamische Analyse des Nukleosoms aus *S. cerevisiae*). Zuletzt wurde der Mechanismus des Öffnens für Nukleosomen, die die Histonvariante H2A.Z enthielten, analysiert (5.3.4 Öffnen des Nukleosoms mit H2A.Z untersucht durch spFRET).

5.3.1 Vergleich von Nukleosomen aus *S. cerevisiae* und *X. laevis* mittels spFRET

Der Einbau der Histonvariante H2A.Z kann die Wechselwirkung zwischen H2A-H2B Dimer und DNA und die Wechselwirkung von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer beeinflussen. Um diese beiden Effekte zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Nukleosomenproben präpariert. Für die Untersuchung der Bindung zwischen H2B-H2B Dimer und DNA wurden die Nukleosomen an H2B und der Position -52 auf der DNA markiert, für die Untersuchung der Grenzfläche zwischen H2B-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer wurden die Nukleosomen an H2B und an der DNA an der Dyadenachse markiert. Darüber hinaus kann der Einbau der Histonvariante H2A.Z auch die Wechselwirkungen beider H2A-H2B Dimere miteinander beeinflussen. Dieser Effekt kann mit den hier gewählten Positionen der Fluorophore nicht direkt untersucht werden.

Der Fluorophor wurde wie auch in H2B aus *X. laevis* an die C α Helix gebunden (T118C in *S. cerevisiae* versus T112C *X. laevis*). Aus der Kristallstruktur der Nukleosomen aus *S. cerevisiae* (102) wurden die Interfluorophorabstände bestimmt. Sie stimmen mit den Interfluorophorabständen überein, die aus der Kristallstruktur von *X. laevis* Nukleosomen bestimmt wurden (s. Tabelle 11). Für Nukleosomen aus *S. cerevisiae*, die H2A.Z enthalten,

wurde bislang keine Kristallstruktur gelöst. Die Interfluorophorabstände konnten daher nicht theoretisch ermittelt werden. In der einzig bislang bekannten Kristallstruktur von Nukleosomen, die H2A.Z enthalten, stammt H2A.Z aus *M. musculus*. Die übrigen Histone des Oktamers stammen aus *X. laevis*. Die Struktur zeigt, dass die zahlreichen Sequenzunterschiede von H2A und H2A.Z mit überraschend geringen Strukturunterschieden einhergehen (20).

Um im Folgenden zwischen den Proben aus *S. cerevisiae* und *X. laevis* zu unterscheiden, werden die Nukleosomen aus Histonen von *S. cerevisiae* mit H2B^s-DNA⁻⁵² und H2B^s-DNA⁻¹⁵ bzw. H2B^{H2A.Z}-DNA⁻⁵² und H2B^{H2A.Z}-DNA⁻¹⁵ und die aus Histonen von *X. laevis* nach wie vor mit H2B-DNA⁻¹⁵ und H2B-DNA⁻⁵² benannt.

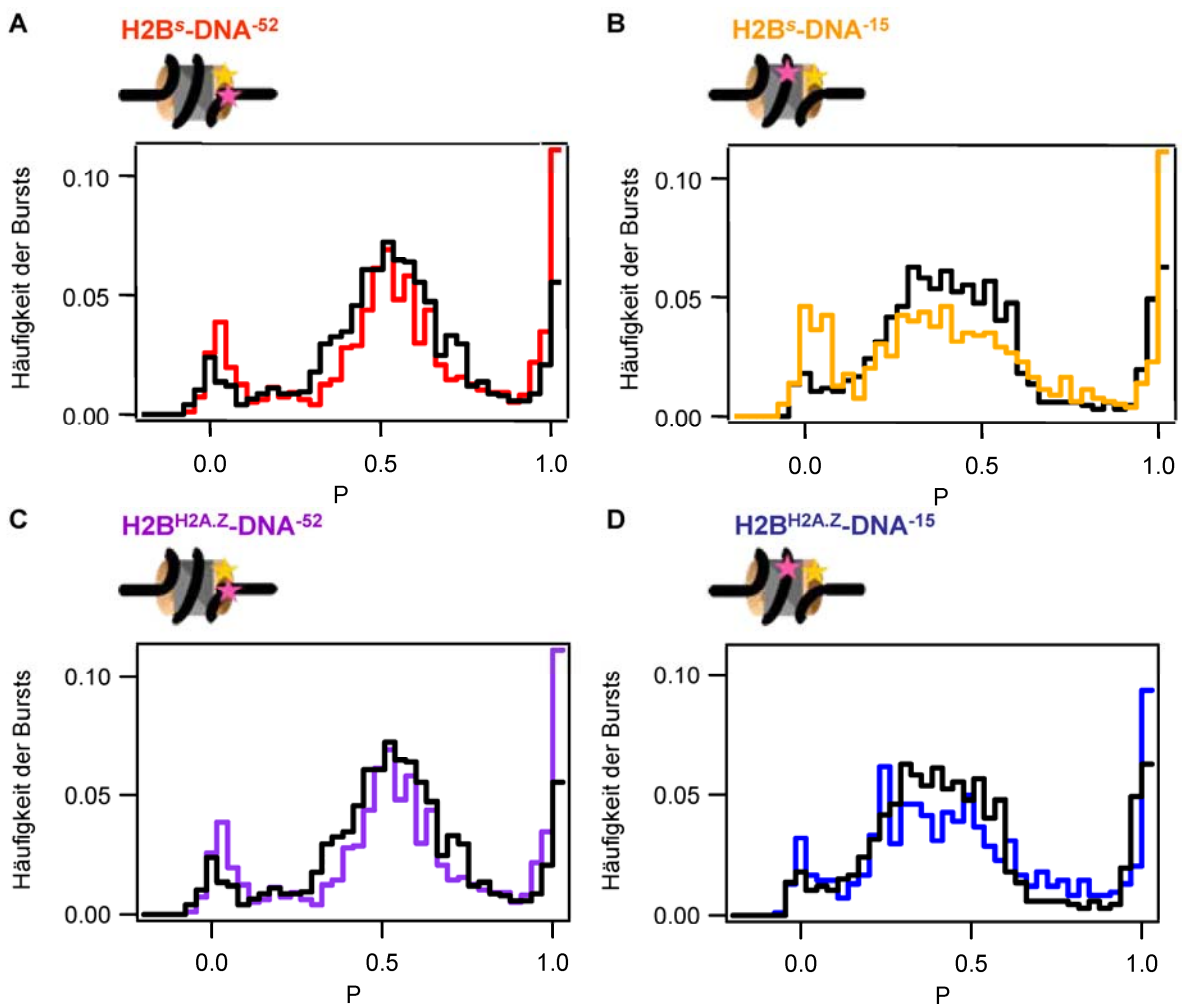


Abbildung 48: spFRET Vergleich von Nukleosomen aus *X. laevis* und *S. cerevisiae*

A und B) Histogramme von Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* (dargestellt in schwarz) und *S. cerevisiae* mit den Fluorophoren an H2B und der DNA⁻⁵²; bzw. mit den Fluorophoren an H2B und der DNA⁻¹⁵. C und D) Histogramme von Nukleosomen aus Histonen von *X. laevis* (dargestellt in schwarz) und von Nukleosomen aus Histonen *S. cerevisiae*, die H2A.Z enthalten, mit den Fluorophoren an H2B und der DNA⁻⁵²; bzw. mit den Fluorophoren an H2B und der DNA⁻¹⁵. Die Formen der FRET-Population stimmen überein. Dies deutet darauf hin, dass sich die Strukturen der Nukleosomen aus verschiedenen Histonen nicht wesentlich unterscheiden. Die Positionen der Fluorophore sind in den schematischen Darstellungen der Nukleosomen durch Sterne markiert.

Die Nukleosomproben $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-52}$, $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-15}$, $\text{H2B}^{\text{H2A.Z}}\text{-DNA}^{-52}$ und $\text{H2B}^{\text{H2A.Z}}\text{-DNA}^{-15}$ wurden in spFRET Messungen unter stabilen Bedingungen (150 mM NaCl) mit H2B-DNA^{-15} und H2B-DNA^{-52} verglichen (s. Abbildung 48).

Bei der Durchführung von spFRET Experimenten ist zu beachten, dass der Markierungsgrad der Oktamerpräparation geringer war (5 % im Vergleich zu 15-20 %). Um die gleiche Anzahl an Bursts in einer Messung zu erhalten, wurde die Konzentration der Nukleosomen in der Messung von 250 pM auf 750 pM erhöht. Die Form der FRET-Population H2B-DNA^{-15} , $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-15}$ und $\text{H2B}^{\text{H2A.Z}}\text{-DNA}^{-15}$ bzw. von H2B-DNA^{-52} , $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-52}$ und $\text{H2B}^{\text{H2A.Z}}\text{-DNA}^{-52}$ stimmte überein. Damit bestätigte sich die Annahme, dass der Interfluorophorabstand in allen Proben identisch ist. Darüber hinaus deutet es darauf hin, dass sich unter stabilen Bedingungen die allgemeine Struktur der intakten Nukleosomen nicht unterscheidet.

5.3.2 Öffnen des Nukleosoms aus *S. cerevisiae* untersucht durch spFRET

Der Mechanismus des Öffnens der Nukleosomen wurde wie zuvor analysiert, indem die Nukleosomen bei NaCl Konzentrationen zwischen 50 mM und 1200 mM inkubiert, mittels spFRET analysiert und bei jeder NaCl Konzentration der Anteil der FRET-Population bestimmt wurden. Die NoFRET-Population nahm mit steigender NaCl Konzentration auf Kosten der FRET-Population zu. Die Abnahme der FRET-Population begann für $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-15}$ bei 400 mM NaCl, für $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-52}$ bei 500 mM. Der Anteil der FRET-Population lag für $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-52}$ bis 1000 mM NaCl über dem von $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-15}$. Bei 1000 mM NaCl war keine FRET-Population mehr detektierbar (s. Abbildung 49). Die Abnahme der FRET-Population folgt einem sigmoidalen Verlauf. Die NaCl Konzentration, bei der die FRET-Population auf 50 % gefallen war, wurde bestimmt (s. Tabelle 15).

Die Tatsache, dass der Energietransfer zwischen H2A-H2B Dimer und DNA vor dem Energietransfer zwischen H2A-H2B Dimer und der benachbarten DNA abnimmt, deutet wie bei *X. laevis* darauf hin, dass sich zunächst die Grenzfläche zwischen H2A-H2B Dimer und $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer öffnet, während das H2A-H2B Dimer noch an der DNA gebunden vorliegt. Die Dissoziation des H2A-H2B Dimers von der DNA erfolgt erst in einem zweiten Schritt.

Neben der Abnahme der FRET-Population wurde die Form der Histogramme bei den verschiedenen NaCl Konzentrationen untersucht. Änderungen in der Form der FRET-Population weisen auf kleinere Änderungen des Interfluorophorabstands hin, die nicht mit dem Verlust von Energietransfer einhergehen. Sowohl für $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-52}$ als auch für $\text{H2B}^{\text{s}}\text{-DNA}^{-15}$ wurde beobachtet, dass ab 500 mM NaCl Bursts mit niedrigeren Proximity Ratio-Werten auftreten, die außerhalb der gaussförmigen FRET-Population liegen. Das

Auftreten dieser Bursts deutet darauf hin, dass sich die Struktur der Nukleosomen bei höheren NaCl Konzentrationen öffnet.

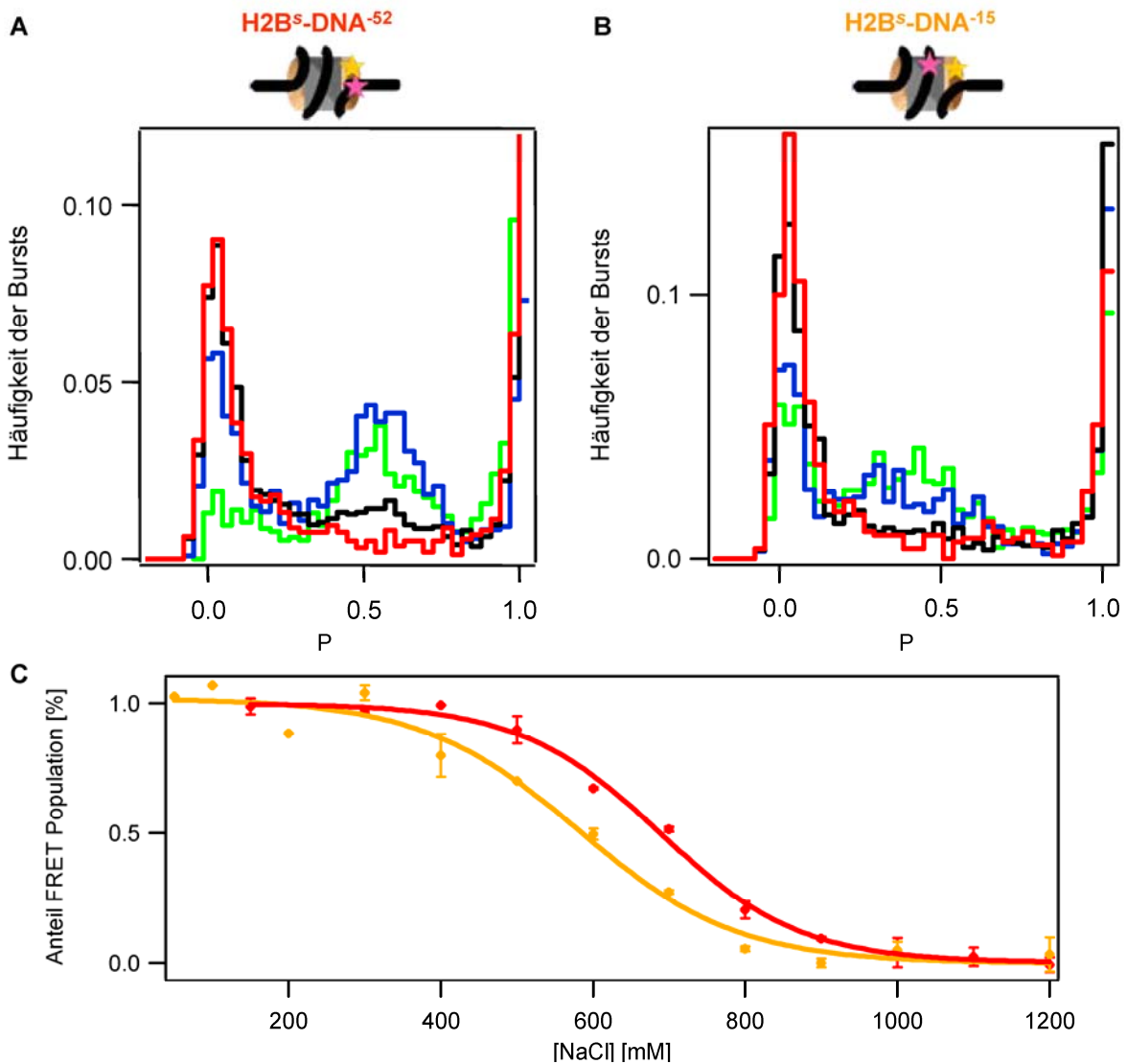


Abbildung 49: Abnahme der FRET-Population mit der NaCl Konzentration

A und B) Darstellung von Histogrammen bei erhöhter NaCl Konzentration. Als Beispiele sind Histogramme bei 400 mM (grün), 600 mM (blau), 800 mM (schwarz) und 1200 mM NaCl (rot) dargestellt. Der Anteil der NoFRET-Population steigt auf Kosten der FRET-Population. Zudem können Veränderungen in der Form der FRET-Population beobachtet werden. C) Der Anteil der FRET-Population wurde für jede NaCl quantifiziert (Farben der einzelnen Konstrukte wie unter A und B angegeben, die Positionen der Fluorophore sind in den schematischen Darstellungen der Nukleosomen durch Sterne markiert.). Die Abnahme folgt einem sigmoidalen Verlauf.

Tabelle 15: NaCl Konzentrationen, bei denen die FRET-Population auf 50 % gefallen sind

Konstrukt	$c_{1/2}$ in mM
H2B ^s -DNA ⁻¹⁵	590 ± 20
H2B ^s -DNA ⁻⁵²	690 ± 10

5.3.3 Thermodynamische Analyse des Nukleosoms aus *S. cerevisiae*

Die Ionenstärkeabhängigkeit der Dimer-Dissoziation wurde wie zuvor dafür verwendet, die Anzahl an Ionenbindungen, die zwischen H2A-H2B Dimer und der DNA auftreten, zu ermitteln (s. Kapitel 5.1.5). Hierfür wurde aus den Ergebnissen der FRET Messungen von H2B^s-DNA⁻⁵² nach Gleichung (5.4) die Gleichgewichtskonstante K_{obs} bestimmt und der Logarithmus von K_{obs} nach Gleichung (5.6) gegen den Logarithmus der NaCl Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung einer linearen Regressionsgeraden wurde die Anzahl der Ionenbindungen zu 15 ± 1 bestimmt (s. Abbildung 50).

Die Anzahl der Ionenbindungen, die zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer auftreten, kann aus den FRET Messungen für H2B^s-DNA⁻⁵² und H2B^s-DNA⁻¹⁵ nach Gleichung (5.14) ermittelt werden (s. Kapitel 5.1.5). Hierfür wurde die linke Seite von Gleichung (5.14) nach dem Logarithmus der NaCl Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden wurde die Anzahl der Ionenbindungen zu 3 ± 1 bestimmt. Durch Extrapolation wurde der Anteil von Nukleosomen, in denen die Grenzfläche von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer geöffnet ist, aber alle Histone noch an der DNA gebunden vorliegen (N_{open}), unter physiologischen Bedingungen (150 -300 mM NaCl) zu 0.6 - 6.1 % bestimmt. Die Energie, die zum Öffnen der H2A-H2B/(H3-H4)₂ Grenzfläche nötig ist, wurde nach Gleichung (5.15) zu 3.0 - 1.7 kcal/mol berechnet.

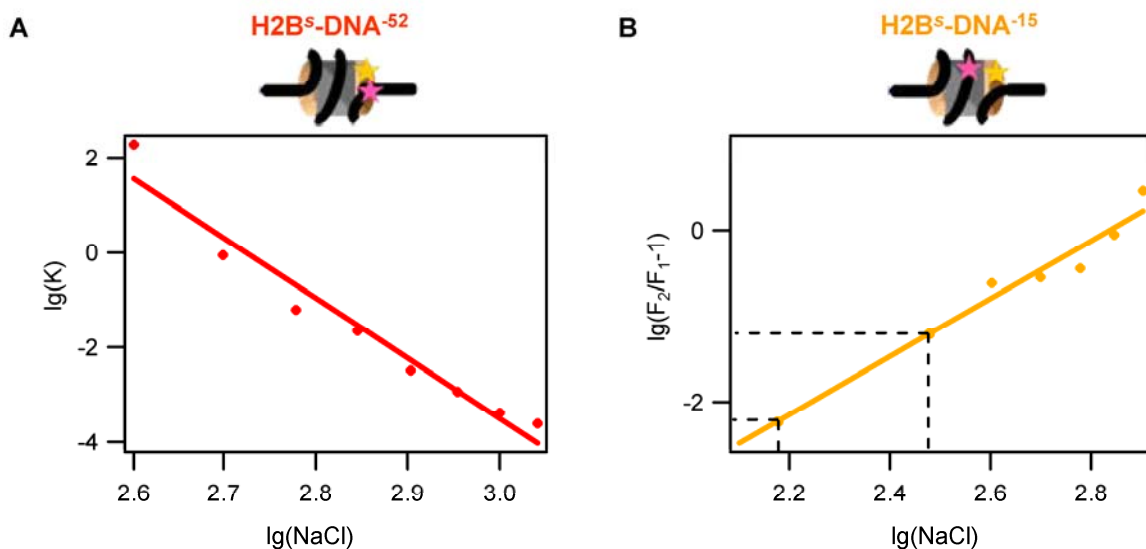


Abbildung 50: Anzahl der Ionenbindungen zwischen Dimer und DNA/Tetramer in Nukleosomen aus *S. cerevisiae* Histonen

A) Aus der Ionenstärkeabhängigkeit der Dissoziation konnte die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und DNA zu 15 ± 1 bestimmt werden. B) Aus der Ionenstärkeabhängigkeit des Verhältnisses von Nukleosomen in der offenen Konformation zu intakten Nukleosomen wurde die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer zu 3 ± 1 ermittelt. Der Anteil an offenen Nukleosomen unter physiologischen Bedingungen (durch gestrichelte Linien gekennzeichnet) konnte durch Extrapolation bestimmt werden.

Ein Vergleich der Nukleosomen aus *S. cerevisiae* mit den zuvor ermittelten Daten aus *X. laevis* zeigt, dass die Bindungen zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer in beiden Organismen die gleiche Anzahl an Ionenbindungen enthalten, zwischen H2A-H2B Dimer und DNA allerdings in *S. cerevisiae* mehr Ionenbindungen bestehen als in *X. laevis*. (s. Tabelle 16). Ein direkter Vergleich der Stabilität der Bindungen ist nicht möglich, da die Messungen unter verschiedenen Nukleosomenkonzentrationen durchgeführt wurden und die Nukleosomen durch die höhere Nukleosomenkonzentration in den Messungen von *S. cerevisiae* stabilisiert werden. Die Tatsache, dass der Anteil der FRET-Population in *S. cerevisiae* ab 400 mM NaCl trotz der höheren Nukleosomenkonzentration unter dem in *X. laevis* liegt (s. Abbildung 51), zeigt jedoch, dass Nukleosomen aus *S. cerevisiae* bei hohen Ionenstärken gegenüber Nukleosomen aus *X. laevis* destabilisiert sind. Um die Nukleosomen unter physiologischen Bedingungen näherungsweise zu vergleichen, werden im Folgenden die Bindungsenergien betrachtet.

Die Bindungsenergie von Dimer und Tetramer wurde zuvor bereits bestimmt (s. Kapitel 5.1.5). Die Bindungsenergie von H2A-H2B Dimer und DNA kann analog berechnet werden. Dazu wird die Gleichgewichtskonstante nach Gleichung (5.6) auf physiologische Bedingungen extrapoliert und nach Gleichung (5.15) die Bindungsenergie ermittelt (s. Abbildung 39 und Abbildung 50). Die resultierenden Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein (s. Tabelle 16). Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Bindungen von H2A-H2B Dimer zu der DNA bzw. zum (H3-H4)₂ Tetramer in Nukleosomen aus *S. cerevisiae* stabiler sind als die in Nukleosomen aus *X. laevis*. Die höhere Anzahl an Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und DNA in *S. cerevisiae*, die auf eine stabilere Bindung hindeutet, könnte durch eine geringere Anzahl an hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ausgeglichen werden.

Tabelle 16: Vergleich der Stabilität von Nukleosomen aus *X. laevis* und *S. cerevisiae*

Die aufgeführten Werte wurden unter 250 pM Nukleosomenkonzentration für *X. laevis* und 750 pM Nukleosomenkonzentration für *S. cerevisiae* ermittelt.

Konstrukt	$c_{1/2}$ in mM	Anzahl an Ionenbindungen	ΔG^{150mM} in kcal/mol
H2B-DNA ⁻¹⁵	620 ± 20	4 ± 1	- 3,5 ± 1
H2B-DNA ⁻⁵²	760 ± 30	11 ± 1	- 10,2 ± 1
H2B ^s -DNA ⁻¹⁵	590 ± 20	3 ± 1	- 3,0 ± 1
H2B ^s -DNA ⁻⁵²	690 ± 10	15 ± 1	- 9,3 ± 1

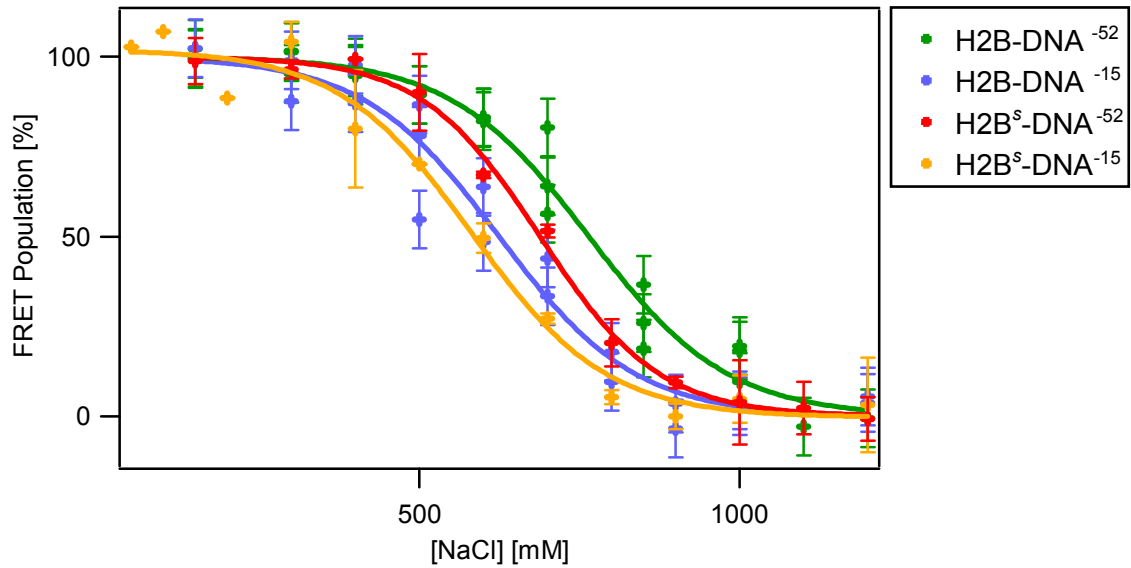


Abbildung 51: Abnahme der FRET-Population für Nukleosomen aus *X. laevis* und *S. cerevisiae*
 Die Abnahme der FRET-Population mit der NaCl Konzentration beginnt für Nukleosomen aus *X. laevis* und *S. cerevisiae* bei der gleichen NaCl Konzentration. Ab 500 mM NaCl liegt der Anteil der FRET-Population von H2B^s-DNA⁻⁵² und H2B^s-DNA⁻¹⁵ unter dem von H2B-DNA⁻⁵² und H2B-DNA⁻¹⁵.

5.3.4 Öffnen des Nukleosoms mit H2A.Z untersucht durch spFRET

Der Mechanismus des Öffnens der Nukleosomen, die H2A.Z enthalten, wurde mit Hilfe der zuvor entwickelten Untersuchungsmethode analysiert. Dabei wurden die Nukleosomen bei NaCl Konzentrationen zwischen 50 mM und 1500 mM inkubiert und mittels spFRET untersucht; bei jeder NaCl Konzentration wurde der Anteil der FRET-Population bestimmt. Die NoFRET-Population nahm mit steigender NaCl Konzentration auf Kosten der FRET-Population zu (s. Abbildung 52). Der Anteil der FRET-Population von H2B^{H2A.Z}-DNA⁻¹⁵ und von H2B^{H2A.Z}-DNA⁻⁵² stimmte dabei im untersuchten NaCl Konzentrationsbereich innerhalb der Fehlergrenzen überein.

Die Messergebnisse streuen stark, so dass der Anteil der FRET-Population nur mit einem großen Fehler bestimmt werden konnte. Dass Wiederholungen der gleichen Messung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, wird häufig bei Proben beobachtet, die stark an Oberflächen adsorbieren. Die im Vergleich zu bisherigen Messungen geringere Qualität der Messergebnisse könnte daher darauf zurückzuführen sein, dass H2A.Z stärker als das Haupthiston H2A an Oberflächen bindet.

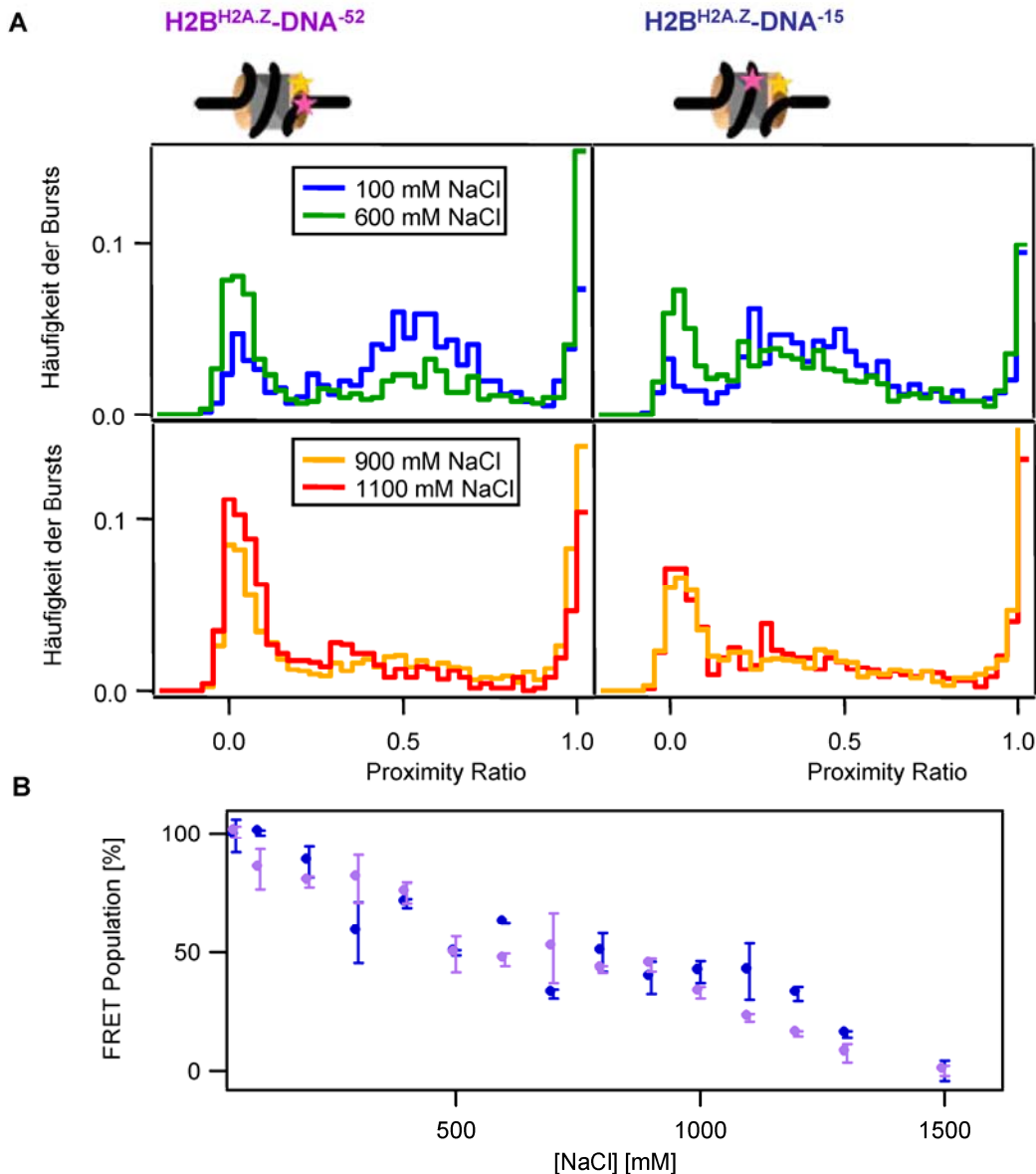


Abbildung 52: Abnahme der FRET-Population für Nukleosomen mit H2A.Z

A Darstellung von Histogrammen bei erhöhter NaCl Konzentration. Als Beispiele sind Histogramme bei 100 mM (blau), 500 mM (grün), 800 mM (orange) und 1200 mM NaCl (rot) dargestellt (linke Seite H2B^{H2A.Z}-DNA⁻⁵², rechte Seite H2B^{H2A.Z}-DNA⁻¹⁵). Der Anteil der NoFRET-Population steigt auf Kosten der FRET-Population. Zudem können Veränderungen in der Form der FRET-Population beobachtet werden. B) Der Anteil der FRET-Population wurde für jede NaCl quantifiziert (Farben der einzelnen Konstrukte wie unter A angegeben, die Positionen der Fluorophore sind in den schematischen Darstellungen der Nukleosomen durch Sterne markiert.).

Die FRET-Populationen beider Proben nahm von 200 mM – 500 mM NaCl auf ungefähr 50 % ab. Bei weiterer Erhöhung der NaCl Konzentration blieben die Anteile der FRET-Populationen bis 1000 mM NaCl konstant und nahmen bei höheren NaCl Konzentrationen weiter ab. Erst bei 1500 mM NaCl konnte keine FRET-Population mehr detektiert werden.

Die Form der FRET-Population von H2B^{H2A.Z}-DNA⁻⁵² blieb bis einschließlich 600 mM unverändert (s. Abbildung 52). Bei höheren NaCl Konzentrationen war die typische Gauss-Form der FRET-Population von intakten Nukleosomen nicht mehr erkennbar. Die Verteilung

der Bursts verschob sich von 700 mM bis 1200 mM NaCl zunehmend zu niedrigeren Proximity Ratio Werten. Für H2B^{H2A.Z}-DNA⁻¹⁵ Nukleosomen wurde bereits bei 500 mM NaCl eine Verschiebung der Bursts zu niedrigeren Proximity Ratio Werten beobachtet. Zwischen 800 mM und 1200 mM NaCl konnte keine weitere Veränderung in der Form der FRET-Population festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für das Stagnieren der FRET-Population bei einem Wert, der 50 % beider FRET-Populationen entspricht, ist, dass zunächst das eine H2A-H2B Dimer von dem Nukleosom abdissoziiert und dann erst durch eine drastische Erhöhung der NaCl Konzentration die Dissoziation des zweiten H2A-H2B Dimers induziert werden kann. Dafür ist nötig, dass ein H2A-H2B Dimer stärker gebunden ist. Dies ist der Fall, wenn die Bindung die DNA nach der Dissoziation des ersten H2B-H2B Dimers die Position auf den übrigen Histonen verändert und dabei zusätzliche Bindungen zum noch gebundenen H2B-H2B Dimer eingeht, und/oder die Grenzfläche zwischen H2B-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer nach der Dissoziation des ersten H2B-H2B Dimer stabiler wird. Unter dieser Annahme kann das Auftreten von Energietransfer zwischen H2B und DNA⁻⁵² sowie zwischen H2B und DNA⁻¹⁵ und die Verschiebungen beider FRET Populationen folgendermaßen interpretiert werden: In der Konformation, die nach der Dissoziation des ersten H2A-H2B Dimer vorliegt, weist das gebundene H2A-H2B Dimer zu beiden Positionen auf der DNA einen Abstand auf, der FRET erlaubt. Die ursprünglich Bindung des H2A-H2B Dimers zu der DNA und dem (H3-H4)₂ Tetramer löst sich leicht, wird jedoch nicht vollständig geöffnet.

Die hier beobachtete Abnahme der FRET-Populationen würde allerdings auch eintreten, wenn sich in der Hälfte der Nukleosomen die (H2B-H2B) Dimer/(H3-H4)₂ Tetramer Grenzfläche öffnet (Verlust von FRET in H2B^{H2A.Z}-DNA⁻¹⁵), und in der anderen Hälfte der Nukleosomen die DNA-Arme von dem intakten Histonoktamer abrollen (Verlust von FRET in H2B^{H2A.Z}-DNA⁻⁵²). Das Messen von zwei Abständen innerhalb des Nukleosoms reicht bei weitem nicht aus, um das Auftreten des einen oder des anderen Mechanismus zu bestätigen und die Struktur des auftretenden Zwischenprodukts zu untersuchen. Es ist nötig, Energietransfer zwischen weiteren Positionen innerhalb des Dimers und entlang der DNA zu messen, um die Strukturveränderungen beim Öffnen des Nukleosoms aufzuklären.

5.3.5 Diskussion

Nukleosomen aus *S. cerevisiae*, die die Histonvariante H2A.Z enthalten, wurden mittels spFRET untersucht und mit Nukleosomen aus Haupthistonen von *X. laevis* und *S. cerevisiae* verglichen. Die FRET-Populationen aller Proben stimmen unter stabilen Bedingungen (niedrige NaCl Konzentration) überein, was darauf hindeutet, dass sich die Struktur der Nukleosomen unter stabilen Bedingungen nicht unterscheidet.

Nukleosomen aus den Haupthistonen von *S. cerevisiae* zeigen bei der NaCl-induzierten Dissoziation das gleiche Verhalten wie Nukleosomen aus den Haupthistonen von *X. laevis*. Zunächst öffnet sich die Grenzfläche zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer, in einem zweiten Schritt dissoziiert das H2A-H2B Dimer von der DNA.

Die Aminosäuresequenz der Histone ist zwischen verschiedenen Organismen stark konserviert. Dabei zeigt die Sequenz der Histone aus *S. cerevisiae* die größte Abweichung von Histonen anderer Organismen (zwischen den Histonen aus *S. cerevisiae* und *X. laevis* besteht 72 % Sequenzidentität für H2A, 67% für H2B, 84 % für H3 und 92 % für H4). Dass trotz dieser Sequenzunterschiede der gleiche Mechanismus für das Öffnen gefunden wurde, weist darauf hin, dass es sich um einen konservierten Prozess handelt.

Aus der Ionenstärkeabhängigkeit des Energietransfers in Nukleosomen aus *S. cerevisiae* ließ sich die Anzahl der Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und DNA zu 15 ± 1 und die zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer zu 3 ± 1 bestimmen. Durch Extrapolation der Gleichgewichtskonstanten zu physiologischen Bedingungen wurden die Bindungsenergien ermittelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Stabilität der Bindungen zwischen *S. cerevisiae* und *X. laevis* festgestellt werden. Die höhere Anzahl an Ionenbindungen zwischen H2A-H2B Dimer und DNA in *S. cerevisiae*, die auf eine stabilere Bindung hindeutet, wird vermutlich durch eine geringere Anzahl an hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ausgeglichen.

Die dynamischen Eigenschaften der Nukleosomen werden durch Einbau der Histonvariante H2A.Z stärker beeinflusst als durch den Einbau von Haupthistonen aus einem anderen Organismus. Der Mechanismus des Öffnens ändert sich grundlegend. Die Ergebnisse der spFRET Messungen können so interpretiert werden, dass zunächst nur ein H2A-H2B Dimer von dem Nukleosom abdissoziiert und die Dissoziation des zweiten H2A-H2B Dimer erst bei einer höheren NaCl Konzentration erfolgt. Es ist auch möglich, dass zwei unterschiedliche Prozesse parallel ablaufen und sich in einem Teil der Nukleosomen die Grenzfläche zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer öffnet und in den anderen Nukleosomen die DNA-Arme abrollen (s. Abbildung 53).

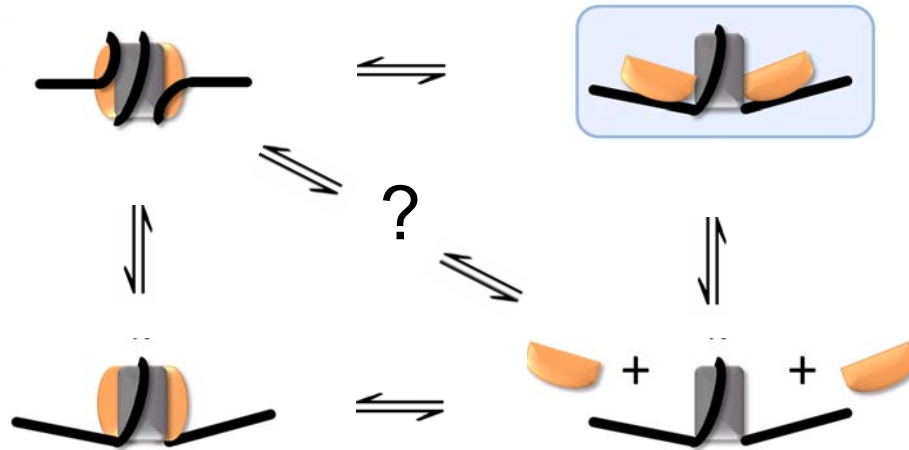


Abbildung 53: Alternative Modellvorschläge für das Öffnen von Nucleosomen mit H2A.Z

Die Ergebnisse der spFRET Messungen können so gedeutet werden, dass beide dargestellte Mechanismen parallel ablaufen oder ein noch unbekanntes Zwischenprodukt auftritt, in dem ein H2A-H2B Dimer dissoziiert ist und das andere H2A-H2B Dimer durch zusätzliche Bindungen zur DNA oder zum (H3-H4)₂ Tetramer stabilisiert wird.

Weitere spFRET Messungen müssen durchgeführt werden, um zwischen dem einem und dem anderen Mechanismus zu unterscheiden und die Struktur von auftretenden Zwischenprodukten zu analysieren.

6 Abschließende Diskussion und Ausblick

6.1 Abschließende Diskussion

Aus der Kristallstruktur des Nukleosoms lässt sich erkennen, dass die gesamten 145-147 bp der DNA direkt an das Histonoktamer gebunden sind (103). Es ist jedoch für die biologische Funktion von Chromatin notwendig, dass Nukleosomen dynamisch sind und sich teilweise oder vollständig öffnen, so dass die gebundene DNA für Prozesse wie Transkription, Replikation und Reparatur zugänglich wird (104). Bis heute ist über die Details dieser Strukturveränderungen innerhalb des Nukleosoms wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde an einzelnen Nukleosomen bei verschiedenen Ionenstärken Förster-Resonanzenergietransfer gemessen und die dynamischen Eigenschaften untersucht. Auf diese Art konnte hergeleitet werden, welche Strukturveränderungen bei der salzinduzierten Dissoziation von Nukleosomen auftreten und in welcher Reihenfolge sie ablaufen. Dabei wurde eine Konformation des Nukleosoms entdeckt, die zuvor nicht in der Literatur beschrieben wurde. In dieser Konformation sind alle Histone noch an der DNA gebunden, während der Abstand zwischen dem H2A-H2B Dimer und der DNA an der Dyadenachse, also der Region, an die das $(H3-H4)_2$ Tetramer im Nukleosom bindet, erhöht ist. Dies deutet darauf hin, dass sich die Grenzfläche von H2A-H2B Dimer und $(H3-H4)_2$ Tetramer öffnet. Aus diesen Ergebnissen lässt sich herleiten, dass unter physiologischen Bedingungen 0,2 bis 6 % aller Nukleosomen in dieser Konformation vorliegen. Erhöht man die Ionenstärke weiter, dissoziiert das H2A-H2B Dimer von der DNA, während die DNA noch um die übrigen Histone gewunden bleibt. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke führt dazu, dass sich die Bindung von $(H3-H4)_2$ Tetramer und DNA löst. Mit den gleichen physikalischen Messmethoden wurde die Assemblierung von Nukleosomen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese über die gleichen Zwischenprodukte verläuft. Diese treten bei der Assemblierung in der umgekehrten Reihenfolge auf.

Die Dissoziation wurde für Nukleosomen aus Histonen zweier unterschiedlicher Organismen, *X. laevis* und *S. cerevisiae*, untersucht und es wurde gezeigt, dass die gleichen Zwischenprodukte in der gleichen Reihenfolge auftreten. Der Mechanismus der salzinduzierten Dissoziation wurde in dieser Arbeit auch für Nukleosomen untersucht, in denen das Haupthiston H2A durch die Histonvariante H2A.Z ersetzt wurde. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich der Mechanismus des Öffnens von H2A.Z enthaltenen Nukleosomen grundsätzlich von dem zuvor beschriebenen unterscheidet und andere Zwischenprodukte auftreten.

Strukturänderungen von Nukleosomen in Abhängigkeit der NaCl Konzentration wurden seit den späten 70er Jahren untersucht. Es konnte durch Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass das Nukleosom bei hoher Ionenstärke eine gestreckte Form einnimmt (105). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Aminosäure, die im Zentrum des Oktamers eingeschlossen liegt, bei hohen Ionenstärken zugänglich für Lösungsmittel wird (19). Diese Beobachtung zeigt, dass die Struktur des Nukleosoms sich in Abhängigkeit der Ionenstärke ändert, Details über die Natur dieser Veränderungen konnten daraus aber nicht hergeleitet werden.

Auch die Dissoziation von Nukleosomen, induziert durch eine Erhöhung der NaCl Konzentration, ist untersucht worden. In analytischer Ultrazentrifugation konnte man drei Spezies nachweisen, die sich in ihren dynamischen Eigenschaften unterscheiden (11). Diese Spezies wurden als Nukleosom und dessen zwei Zerfallsprodukte, DNA und Histonoktamer interpretiert und es wurde daraus geschlossen, dass das Oktamer als eine Einheit von der DNA abdissoziiert. In einer anderen Studie wurden Komponenten einer Nukleosomenproben bei erhöhter Ionenstärke durch Gelpermeationschromatographie getrennt und durch Gelelektrophorese untersucht (9). Es konnte gezeigt werden, dass sich das H2A-H2B Dimer vor dem (H3-H4)₂ Tetramer von der DNA löst. Bis heute wird über die Richtigkeit des einen oder anderen Mechanismus diskutiert (12-14,106).

Die zuvor beschriebenen Studien haben gemeinsam, dass ausschließlich die Zerfallsprodukte untersucht wurden. Die Bindungen der verschiedenen Untereinheiten des Nukleosoms können mit diesen Methoden nicht beobachtet werden. Indirekt können spektroskopische Untersuchungen an Nukleosomen dazu Informationen liefern. So ist der Circular dichroismus der DNA abhängig von der Krümmung der DNA Doppelhelix, und freie DNA und in Nukleosomen gebundene DNA können dadurch spektroskopisch unterschieden werden. Die Fluoreszenzemission der Tyrosine innerhalb der Histone wird durch Ausbildung von Bindungen gelöscht, das Öffnen von Bindungen kann daher durch eine Erhöhung der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese spektroskopischen Eigenschaften wurden dazu genutzt, die Strukturveränderungen innerhalb des Nukleosoms zu untersuchen (10,107). Allerdings können die Änderungen dieser Eigenschaften nicht einer bestimmten Bindung zugeordnet werden, so dass ein direkter Beweis für die Richtigkeit des einen oder anderen Mechanismus ausbleibt.

Durch Messen von FRET innerhalb des Nukleosoms wurde es möglich, die Bindungen zwischen zwei Untereinheiten im Nukleosom direkt zu beobachten. Park (90) und Hoch (108) zeigten, dass Energietransfer zwischen fluoreszenzmarkiertem Dimer und Tetramer durch Erhöhung der Ionenstärke verschwindet und interpretierten dies als Dissoziation des Dimers vom übrigen Komplex. Die Möglichkeit, dass der Verlust von FRET auf eine Konformationsänderung über den maximalen Abstand für Energietransfer hinaus

zurückzuführen ist, wurde dabei nicht berücksichtigt. Auch wurden die Messungen an einem Ensemble von Nukleosomen durchgeführt. Informationen über Zwischenprodukte, die sich in ihrer Transfereffizienz von Ausgangs- und Endprodukten unterscheiden, werden durch das Mitteln über viele Nukleosomen verloren.

Diese Schwierigkeiten konnte Gansen (32) umgehen, indem er FRET an einzelnen DNA-markierten Nukleosomen maß und zusätzlich die dynamischen Eigenschaften der Nukleosomen durch FCS untersuchte. Dies ermöglicht, eindeutig zwischen Konformationsänderungen und Dissoziation zu unterscheiden. Er konnte damit ein Zwischenprodukt nachweisen, in dem ein Teil der Histone, vermutlich das H2A-H2B Dimer, bereits dissoziiert und die DNA teilweise geöffnet ist. Durch den ähnlichen experimentellen Ansatz, die Kombination von spFRET und FCS Experimenten und zusätzlich die Fluoreszenzmarkierung der Histonuntereinheiten, kann in dieser Arbeit direkt gezeigt werden, dass zunächst das H2A-H2B Dimer vom Nukleosom dissoziiert. Durch die Kombination von fünf verschiedenen FRET Paaren kann darüber hinaus die Konformationsänderung identifiziert werden, die dem Zerfall des Nukleosoms voraus geht.

FRET Untersuchungen an Nukleosomen wurden auch dazu verwendet, eine andere Art der Zugänglichkeit von DNA, das ‚breathing‘ zu untersuchen (23-26,30). Unter ‚breathing‘ versteht man das vorübergehende Ablösen eines Abschnitts der DNA-Enden von der Oktameroberfläche, während das Oktamer selbst unverändert bleibt (84,109). Dabei ist es am wahrscheinlichsten, dass dieses Ablösen der DNA schrittweise geschieht. Bei einem Schritt wird jeweils ein Kontakt zwischen Oktamer und DNA Rückgrat gebrochen. Aus der Kristallstruktur ist ersichtlich, dass diese Bindungen alle 10 bp, also im Abstand von je einer Doppelhelixwindung, ausgebildet werden (2).

Erste Hinweise auf das Vorliegen von ‚breathing‘ ergaben sich durch Tests, in denen die Zugänglichkeit von nukleosomaler DNA für Restriktionsenzyme untersucht wurde (109,110). An das Oktamer gebundene DNA ist sterisch vor dem Binden von Restriktionsenzymen geschützt. Dass diese DNA gleichwohl geschnitten wird, zeigt, dass die DNA sich vom Oktamer ablöst.

Wie lang der Abschnitt der DNA ist, der sich vorübergehend vom Oktamer ablösen kann, ist nicht bekannt. Es gibt Hinweise, dass das Öffnen der DNA-Enden weit in das Nukleosom hineinreicht. So konnte gezeigt werden, dass selbst eine Position an der Dyadenachse noch für Restriktionsenzyme zugänglich ist (84,109). spFRET Messungen wurden so gedeutet, dass sich über 70 bp DNA vom Oktamer lösen (25,26). Die Gleichgewichtskonstante für das ‚breathing‘ wird jedoch deutlich kleiner, je mehr DNA-Oktamer Bindungen gelöst werden müssen (30,109). Um zwischen der Bewegung eines kurzen Fragments am Ende der

nukleosomalen DNA und der Bewegung von deutlich längeren Fragmenten zu unterscheiden, wurde für letzteres der Ausdruck ‚opening‘ der DNA geprägt (25).

In den hier beschriebenen Experimenten wurden die Positionen der Fluorophore so gewählt, dass die Bewegung der ersten 20 bp der DNA keinen Effekt auf den Energietransfer hat. Bei den Messungen von FRET zwischen DNA⁻⁵², 23 bp vom Ende der nukleosomalen DNA entfernt, und dem H2A-H2B Dimer finden wir keinen Hinweis darauf, dass FRET zwischen H2A-H2B Dimer und DNA durch ‚breathing‘ abnimmt. Dies kann auf zwei Ursachen zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass die Zeit, in der die DNA vom Oktamer abgelöst vorliegt, viel kürzer ist als die Zeit, in der sich das Nukleosom im Fokus befindet. Da der Energietransfer über die gesamte Diffusionszeit gemittelt wird, könnte dies nicht detektiert werden. Außerdem könnte der Anteil an Nukleosomen, in denen die DNA vom Oktamer abgelöst ist, so gering sein, dass er nicht messbar ist.

Damit sich die Grenzfläche von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer öffnen kann, ist es nötig, dass auch die DNA ihre Position auf den Histonen verändert. Es ist davon auszugehen, dass im offenen Zustand die 15 bp am Ende der DNA, die in intakten Nukleosomen von Histon H3 gehalten werden, nicht mehr an das Oktamer gebunden vorliegen. Dies würde bedeuten, dass die DNA in der offenen Konformation ebenfalls für Restriktionsenzyme zugänglicher ist. Das beobachtete ‚breathing‘ könnte daher auch mit dem Öffnen der H2A-H2B Dimer (H3-H4)₂ Tetramer Grenzfläche einhergehen. Möglicherweise ist das ‚breathing‘ auch eine notwendige Vorstufe des Öffnens oder das Öffnen wird zumindest durch ‚breathing‘ begünstigt.

Von Histonvarianten ist bekannt, dass sie DNA-abhängige Prozesse, insbesondere die Transkription, beeinflussen (67). Vor diesem Hintergrund ist es überraschend, dass sich die Kristallstrukturen von Nukleosomen, die Histonvarianten enthalten, den Kristallstrukturen von Nukleosomen aus Haupthistonen bemerkenswert ähnlich sind (103). Die Frage, wie die Histonvarianten ihre Funktion ausüben, kann daher nicht alleine mit Hilfe der Kristallstruktur beantwortet werden.

Interessanterweise zeigt die Aminosäuresequenz viele Histonvarianten in den Regionen, die die Grenzfläche von H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer bilden, Unterschiede zu der der Haupthistone. Es ist daher möglich, dass Histonvarianten das Gleichgewicht zwischen geschlossenen Nukleosomen und der in dieser Arbeit beschriebenen offenen Konformation der Nukleosomen verschieben und dadurch die Zugänglichkeit des Nukleosoms und der DNA beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss, den die Histonvariante H2A.Z auf Nukleosomen ausübt, untersucht. Die Kristallstruktur von Nukleosomen aus einer Mischung von Histonen H2B, H3

und H4 aus *X. laevis* und H2A.Z *M. musculus* ist bekannt (20). Diese Struktur zeigt, dass die Bindung zwischen H2A-H2B Dimer und (H3-H4)₂ Tetramer gegenüber Nukleosomen aus ausschließlich Haupthistonen stabilisiert ist, während sich die Bindung zwischen H2A-H2B Dimer und DNA nicht signifikant unterscheidet. Allerdings ist es möglich, dass diese Stabilitätsunterschiede in Nukleosomen, die ausschließlich aus Histonen desselben Organismus rekonstituiert sind, nicht auftreten.

Durch *in vivo* Experimente konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Dimer-Tetramer-Bindedomäne in H2A.Z durch die von H2A für Embryonen aus *Tetrahymena* und *Drosophila* letal ist (111,112). Dies deutet auf eine bedeutende Rolle dieser Grenzfläche für die Funktion von H2A.Z hin. In *in vitro* Untersuchungen von Nukleosomen wurden sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte von H2A.Z nachgewiesen (90,113-115). Hierbei wurde allerdings die Stabilität des Nukleosoms allgemein untersucht, der Einfluss der (H2A-H2B)Dimer/(H3-H4)₂Tetramer Grenzfläche konnte nicht separiert beobachtet werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der geringe Sequenzunterschied zwischen H2A und H2A.Z die dynamischen Eigenschaften der Nukleosomen signifikant verändert, und bestätigen einen thermodynamischen Effekt auf die Stabilität der Nukleosomen. H2A.Z dient daher nicht nur als ein Signal für externe Faktoren, die daraufhin an das Nukleosom binden und modifizieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Konformationen, die diese Nukleosomen beim Öffnen einnehmen, sich von denen der Nukleosomen aus Haupthistonen unterscheiden. Eine offene Konformation, wie sie für Nukleosomen aus Haupthistonen auftritt, konnte nicht nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass H2A.Z einen Einfluss auf die Stabilität der (H2A-H2B)Dimer/(H3-H4)₂Tetramer Grenzfläche ausübt. Allerdings tritt nicht, wie ursprünglich angenommen, lediglich eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen offenen und intakten Nukleosomen gegenüber Nukleosomen aus Haupthistonen auf.

Das hier vorgestellte Modell, dass das Nukleosom zunächst eine offene Konformation einnimmt, bevor Histonuntereinheiten von der DNA dissoziieren, stellt eine alternative Interpretation für Experimente dar, die zur Analyse der Zugänglichkeit der DNA innerhalb des Nukleosoms gemacht wurde. In einem experimentellen Ansatz wurden die Strukturänderungen von Nukleosomen untersucht, wenn an den zwei Enden der DNA eine einander entgegengesetzte Kraft angelegt wurde. Es wurde berichtet, dass der Übergang vom Nukleosom zur linearen DNA in zwei Schritten verläuft (116,117). Der erste Schritt ist hierbei reversibel, der zweite hingegen irreversibel. Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass die DNA vom Histonoktamer in zwei Schritten abgelöst wird. Im Hinblick auf das hier vorgestellte Modell kann der erste Schritt auch das reversible Öffnen der Bindung innerhalb des

Oktamers sein, während alle Histonuntereinheiten nach wie vor an die DNA gebunden vorliegen. Im zweiten irreversiblen Schritt würde das $(H3-H4)_2$ Tetramer von der DNA abdissoziieren.

Das Modell kann auch herangezogen werden, um zu erklären, was passiert, wenn der Transkriptionskomplex auf ein Nukleosom trifft. Bisher konnte gezeigt werden, dass die RNA-Polymerase während der Transkription der nukleosomalen DNA an zwei Stellen pausiert, einmal 15 bp und einmal 45 bp von dem Ende der nukleosomalen DNA entfernt (118-121). Liegt das Nukleosom in dem hier vorgeschlagenen offenen Zustand vor, sind die 15 terminalen Basenpaare nach unserem Modell frei zugänglich und die RNA-Polymerase kann die DNA ungehindert binden. Nach 15 bp trifft die RNA-Polymerase auf das H2A-H2B Dimer, das ein weiteres Fortschreiten verhindert, bis es abdissoziiert. Die nächste Blockade stellt das $(H3-H4)_2$ Tetramer da, das 45 bp innerhalb des Nukleosoms bindet. Diese Interpretation der Ergebnisse wird dadurch weitere experimentelle Befunde gestärkt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Ausüben von Torsionsspannung auf eine Chromatinfiber die Nukleosomen eine offene Konformation einnehmen, in der jedoch noch keine Dissoziation stattgefunden hat (6). Es ist bekannt, dass die RNA-Polymerase während der Transkription eine positive Torsionsspannung in dem noch zu transkribierenden Teil der DNA aufbaut (122). Es ist möglich, dass diese Spannung die Bildung der offenen Konformation begünstigt.

Zuvor wurde bereits diskutiert, dass die terminalen 15 bp im Nukleosom in der offenen Konformation zugänglicher sind. Jedoch ist nicht nur die Zugänglichkeit der DNA in der offenen Konformation erhöht. Bedeutender noch ist der Unterschied in der Zugänglichkeit der Histone, die in intakten Nukleosomen weitgehend abgeschirmt im Oktamer vorliegen. Die zugängliche Oberfläche der Histone ist in der offenen Konformation deutlich größer und Histone könnten von Chaperonen und Chromatin modifizierenden Enzymen erreicht werden. Zum Beispiel könnte der offene Zustand der Angriffspunkt für das Chaperon Asf1 sein, das mit dem Tetramer über den C-Terminus von H4 interagiert. Im geschlossenen Nukleosom formt dieser C-Terminus ein β -Faltblatt mit H2A (123). Es ist auch möglich, dass Remodellierungsfaktoren spezifisch den offenen Zustand binden und diesen stabilisieren und somit letztendlich die Dissoziation des H2A-H2B Dimers erleichtern. Für das Nukleosom-Remodellierungsenzym FACT wurde gefunden, dass es eine Konformationsänderung verursacht und die Zugänglichkeit der DNA erhöht, ohne dass das H2A-H2B Dimer notwendigerweise dissoziiert (124).

Die Kristallstruktur des Nukleosoms und die Modelle für die Struktur von Chromatin im Zellkern haben dazu geführt, dass Nukleosomen häufig als unveränderliche DNA-Protein-Komplexe dargestellt werden, deren alleinige Funktion die Komprimierung der DNA ist. Die hier präsentierten Ergebnisse machen deutlich, dass in Lösung und unter physiologischen Bedingungen das Nukleosom dynamisch ist und verschiedene Konformationen einnehmen kann. Auch unterstöchiometrische Histon-DNA Komplexe können vorliegen. Diese Konformationen sind von Bedeutung und müssen berücksichtigt werden, wenn DNA-abhängige Prozesse, wie die zuvor beschriebene Transkription, untersucht werden.

6.2 Ausblick

Für das Öffnen von Nukleosomen, die ausschließlich die Haupthistone enthalten, konnte aus den Ergebnissen der spFRET und der FCS Experimente ein detailliertes Modell entwickelt werden. Die experimentellen Daten, die für Nukleosomen mit der Histonvariante H2A.Z erhalten wurden, lassen sich nicht mit diesem Modell in Einklang bringen. Es wurde daraus geschlossen, dass sich der Mechanismus des Öffnens dieser Nukleosomen grundsätzlich von dem der Nukleosomen aus Haupthistonen unterscheidet. Es wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen, die mit den experimentellen Befunden übereinstimmen. Möglicherweise dissoziiert in einem Teil der Nukleosomen die DNA vom vollständigen Oktamer und parallel dazu dissoziiert in einem anderen Teil das an die DNA gebundene H2A-H2B Dimer vom $(H3-H4)_2$ Tetramer. Es ist allerdings auch möglich, dass ein noch unbekanntes Zwischenprodukt auftritt, in dem eines der beiden H2A-H2B Dimere dissoziiert ist und das andere durch zusätzliche Bindungen zur DNA oder zum $(H3-H4)_2$ Tetramer stabilisiert wird. Im Folgenden wird beschrieben, wie die hier entwickelte Untersuchungsmethode erweitert werden soll, um zwischen den vorgeschlagenen Modellen zu unterscheiden.

6.2.1 Alternatives Markierungsschema für Nukleosomen

Zwischen den zwei vorgeschlagenen Mechanismen kann unterschieden werden, indem man FRET zwischen den beiden H2A-H2B Dimeren misst. Das Auftreten von Energietransfer weist dabei eindeutig nach, dass beide H2A-H2B Dimere noch an das Nukleosom gebunden vorliegen. Tritt Energietransfer noch auf, nachdem die FRET-Population auf unter 50 % gefallen ist, kann ausgeschlossen werden, dass zunächst das eine und erst bei signifikant höheren NaCl Konzentrationen das andere H2A-H2B Dimer abdissoziiert. Dies würde auf das parallele Auftreten des Öffnens der DNA und der H2A-H2B Dimer/ $(H3-H4)_2$ Tetramer Grenzfläche hindeuten.

Es ist unmöglich, ausschließlich Nucleosomen herzustellen, in denen ein H2A-H2B Dimer mit einem Donor und das andere H2A-H2B Dimer mit einem Akzeptor markiert ist. Der in dieser Arbeit entwickelte Ansatz für die Fluoreszenzmarkierung von Nucleosomen ist geeignet, um Proben für spFRET Messungen zwischen H2A-H2B Dimeren herzustellen. Vor der Faltung der Oktamere wird jedes H2A-H2B Dimer fluoreszenzmarkiert, 90 % mit dem Akzeptor- und nur 10 % mit dem Donorfluorophor. Die Zusammensetzung der resultierenden Nucleosomen ist in Abbildung 54 dargestellt. Nur Nucleosomen mit einem Donorfluorophor werden für die Auswertung verwendet. 95 % davon sind mit einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor markiert. Nur 5 % tragen zwei Donorfluorophore.

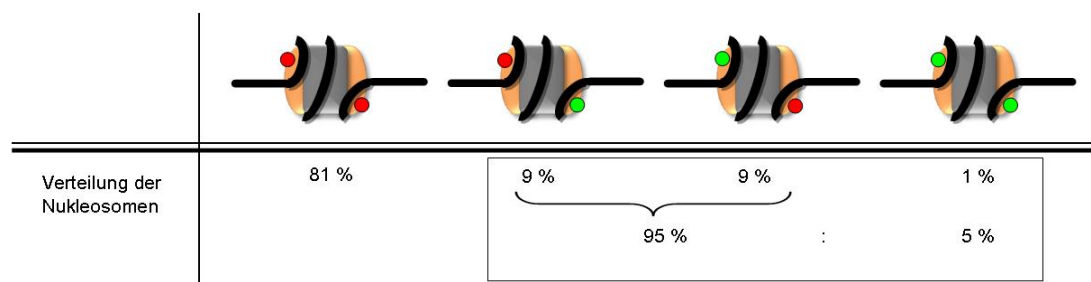


Abbildung 54: Nucleosomen für spFRET Messungen zwischen den H2A-H2B Dimeren

Bei der Verwendung der in dieser Arbeit entwickelten Markierungsstrategie entstehen nach der Rekonstitution 18 % FRET markierte Nucleosomen. Nucleosomen, die keinen Donorfluorophor tragen, können bei der Auswertung ausgeschlossen werden. Lediglich 5 % der übrigen Nucleosomen sind mit zwei Donorfluorophoren markiert.

6.2.2 Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse und alternierende Laseranregung

Die entwickelte Untersuchungsmethode beruht darauf, dass beim Öffnen des Nucleosoms weit reichende Strukturveränderungen auftreten, durch die der Energietransfer zwischen den markierten Positionen verloren geht. Dieser Verlust von Energietransfer wurde quantifiziert. Konformationsänderungen, die nur zu einer Verschiebung der FRET-Verteilung führen, aber nicht zum Verlust von FRET, wurden qualitativ betrachtet. Es wurde beurteilt, ob diese Veränderungen der FRET-Verteilung mit dem vorgeschlagenen Mechanismus im Einklang stehen. Eine quantitative Analyse dieser Verschiebungen war nicht möglich, da insbesondere bei hohen Ionenstärken die FRET-Populationen stark verbreitert und daher nicht durch Gaussfunktionen beschreibbar waren. Es existieren jedoch Methoden, um aus

diesen experimentellen Daten weitere Informationen zu erhalten. Diese werden im Folgenden beschrieben.

Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse

Die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA, engl. ‚probability distribution analysis‘) ist eine Methode, um die FRET-Verteilung einer Spezies theoretisch zu bestimmen. Einen detaillierten Überblick über PDA bieten die Referenzen (82,125,126), die Anwendung für die Analyse verschiedener Nukleosomkonformationen ist in (32) beschrieben. In dem folgenden Abschnitt werden die Grundlagen der Methode kurz dargestellt.

Bei der Analyse von FRET-Verteilungen mittels PDA werden Faktoren wie das Übersprechen des Donors in den Akzeptordetektionskanal, das Hintergrundsignal, die unterschiedlichen Detektionseffizienzen für Donor und Akzeptorfluorophor und das Ausbleichen des Akzeptors berücksichtigt. Ist die experimentell erhaltene Verteilung breiter als die theoretisch bestimmte, kann davon ausgegangen werden, dass die Spezies dynamisch ist und der Interfluorophorabstand variiert oder dass die Spezies in mehreren Konformationen vorliegt. PDA kann daher verwendet werden, um Histogramme, an denen viele Konformationen beteiligt waren, zu analysieren und die Abstände, die in diesen Konformationen vorliegen, zu ermitteln. Für die Berechnung des theoretischen Histogramms einer Probe wird lediglich die Verteilung der Burstgrößen benötigt, die in jedem Experiment ermittelt wird. Die vorliegenden Histogramme können auf diese Art noch detaillierter analysiert werden.

Alternierende Laseranregung

Auch durch Anwendung von alternierender Laseranregung (ALEX, engl. ‚alternating laser excitation‘) können die Konstrukte detaillierter als bislang untersucht werden. Hierfür ist es nötig, die Messungen zu wiederholen, wobei nicht wie bisher konstant der Donorfluorophor, sondern Donor- und Akzeptorfluorophore abwechselnd angeregt werden. Während der Anregung des Donors wird wie zuvor Energietransfer ermittelt, während durch die Anregung des Akzeptorfluorophors überprüft werden kann, ob dieser vorhanden ist und auch fluoresziert. Auf diese Art kann zwischen Teilchen, denen der Akzeptorfluorophor fehlt, und Teilchen, in denen Donor- und Akzeptorfluorophor anwesend sind, aber für Energietransfer zu weit auseinander liegen, unterschieden werden. So kann die Dissoziation von donor- und akzeptormarkierten Untereinheiten und Konformationsänderungen, die zu dem Verlust von FRET führen, getrennt werden. Diese Methode geht auf Shimon Weiss und Don Lamb zurück (127,128).

Zum einen könnte durch Anwenden von ALEX die Dissoziation direkt in spFRET Messungen nachgewiesen werden. Zum anderen eliminiert ALEX den störenden Effekt des Akzeptorbleichens, welches ein Faktor für die Verbreiterung von Histogrammen ist, und das Anpassen von Gaussfunktionen an die FRET-Verteilungen würde so erleichtert.

Die Anwendung der Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse und der alternierenden Laseranregung liefert zusätzliche Informationen zu der Anzahl an vorliegenden Konformationen und den auftretenden Interfluorophorabständen. Dies ermöglicht es, die Konformationen zu analysieren, die beim Öffnen der Nukleosomen auftreten. Dadurch können die Zwischenprodukte, die für Nukleosomen mit der Histonvarianten H2A.Z existieren, charakterisiert werden und es kann eventuell auf den Mechanismus für das Öffnen geschlossen werden. Darüber hinaus kann das Modell für die Zwischenprodukte der Nukleosomen aus den Haupthistonen verfeinert werden.

6.2.3 Biologische Anwendung von spFRET

Aus den Kristallstrukturen von Nukleosomen verschiedener Organismen mit verschiedenen posttranskriptionalen Modifikationen und Histonvarianten ist bekannt, dass die Struktur des Nukleosoms trotz weit reichender Änderungen der einzelnen Bestandteile unverändert bleibt (103). Die signifikanten funktionellen Unterschiede entstehen durch subtile Veränderungen ganz spezifischer Positionen innerhalb des Nukleosoms. Wie diese subtilen Veränderungen das dynamische Verhalten der Nukleosomen so deutlich verändern können, ist bislang weitgehend unbekannt.

Die in dieser Arbeit entwickelte Untersuchungsmethode eignet sich, das dynamische Verhalten von Nukleosomen in Lösung zu untersuchen und bislang unbekannte Konformationen zu identifizieren. Die Methode ist grundsätzlich für alle Histonvarianten und alle posttranskriptionalen Modifikationen anwendbar. Vergleichsweise geringer präparativer Aufwand und sehr geringe Mengen an Probe sind nötig, um die Experimente durchzuführen. Untersuchungen weiterer Varianten und Modifikationen können dazu beitragen, den Mechanismus zu verstehen, durch den die Zugänglichkeit des Nukleosoms und letztendlich auch der nukleosomalen DNA durch die Modifikationen und Varianten kontrolliert wird.

Danksagung

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski für die Möglichkeit, diese interessante Themenstellung zu bearbeiten, für die unkonventionelle wissenschaftliche Betreuung und Förderung und die kritische Durchsicht der Arbeit. Die erfahrene Unterstützung und das mir durchgängig entgegengebrachte Vertrauen waren stets motivierend.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum danke ich herzlichst für die Annahme und Vertretung der Dissertation in der Chemischen Fakultät der Ruprechts-Karls-Universität Heidelberg, sowie die ausführlichen Diskussionen und wertvollen Ratschläge zum Verfassen und Präsentieren der Arbeit.

Den Betreuern der Arbeit im Rahmen der Graduiertenschule des Deutschen Krebsforschungszentrums sowie der Graduiertenschule HBIGS, Herr Prof. Dr. Jörg Langowski, Herr Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon und Herr Dr. Dirk-Peter Herten, danke ich für ihre hilfreichen Anregungen, das Interesse am Fortgang der Arbeit und die stete Gesprächsbereitschaft.

Sehr großer Dank gilt Frau Dr. Katalin Tóth, die mich in die Welt der fluoreszierenden Nukleosomen eingeführt hat und mir mit zahlreiche Diskussionen und kritischen Anregungen immer hilfreich zur Seite gestanden hat.

Alexander Gansen danke ich für den Aufbau des Einzelmolekülmikroskops, seine Unterstützung sowie seine wertvollen Ratschläge beim Einarbeiten in die Welt der einzelnen Nukleosomen und den umfassenden – teils leidvoll gesammelten - Erfahrungsschatz, von dem ich profitieren durfte.

Prof. Dr. Karolin Luger von der University of Colorado danke ich für ihre Ratschläge und Anregungen aus der Ferne, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Die Zusammenarbeit mit ihr und ihren Kollegen Dr. Andrew Andrews und Dr. Aaron Hieb war eine Freude, und für die Unterstützung bei dem Verfassen der Veröffentlichung ebenso wie

für zwei weiterführende und zugleich schöne Aufenthalte in den USA bin ich ihnen ausgesprochen dankbar.

Für die große Hilfe bei der Korrektur der Arbeit danke ich Tomasz Wocjan, Jan Krieger, Christian Fritsch und Stefan Winheim. Ein riesiges Dankeschön gilt auch meiner Mutter, die mit großer Geduld jeden kleinen Fehler gesucht hat.

Christian Fritsch danke ich darüber hinaus besonders für seine Programmierarbeit, mit der er Matlab dazu gebracht hat, FRET-Histogramme anzupassen. Ca. 1000 auszuwertende Histogramme sprechen für sich.

Ein großes Dankeschön gilt Jan Krieger für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und außergewöhnlich kompetente Unterstützung bei allen Widrigkeiten, die das Zählen einzelner Photonen mit sich bringt. Allerdings müssen wir beide anerkennen, dass Jörg Langowski uns beim Einkoppeln der Glasfaser immer überlegen bleiben wird.

Maria Mildenerger danke ich für die sorgfältige Präparation unzähliger fluoreszierender DNA-Fragmente, die ich um die Oktamere wickeln durfte.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Biophysik der Makromoleküle“ (auch den inzwischen ehemaligen, ganz besonders Aaron Hieb und Annika Wedemeier) danke ich für die ausgesprochen gute Atmosphäre, viele bereichernde Gespräche, gemeinsame Unternehmungen, das Mitfreuen (und Mitleiden) und die schönen drei Jahre.

7 Literaturverzeichnis

1. Van Holde, K.E. (1988) *Chromatin*. Springer Verlag, New York.
2. Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
3. Olins, D.E. and Olins, A.L. (1972) Physical studies of isolated eucaryotic nuclei. *J Cell Biol*, **53**, 715-736.
4. Akey, C.W. and Luger, K. (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 6-14.
5. Zlatanova, J. and Victor, J.-M. (2009) How are nucleosomes disrupted during transcription elongation? *HFSP J*, **3**, 373-378.
6. Bancaud, A., Wagner, G., Conde E Silva, N., Lavelle, C., Wong, H., Mozziconacci, J., Barbi, M., Sivolob, A., Le Cam, E., Mouawad, L. *et al.* (2007) Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Mol. Cell*, **27**, 135-147.
7. Lusser, A. and Kadonaga, J.T. (2004) Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat. Methods*, **1**, 19-26.
8. Wilhelm, F.X., Wilhelm, M.L., Erard, M. and Duane, M.P. (1978) Reconstitution of chromatin: assembly of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 505-521.
9. Burton, D.R., Butler, M.J., Hyde, J.E., Phillips, D., Skidmore, C.J. and Walker, I.O. (1978) The interaction of core histones with DNA: equilibrium binding studies. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3643-3663.
10. Oohara, I. and Wada, A. (1987) Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. II. Three transitions in nucleosomes resolved by salt-titration. *J. Mol. Biol.*, **196**, 399-411.
11. Ausio, J., Borochoy, N., Seger, D. and Eisenberg, H. (1984) Interaction of chromatin with NaCl and MgCl₂. Solubility and binding studies, transition to and characterization of the higher-order structure. *J Mol Biol*, **177**, 373-398.
12. Brower-Toland, B.D., Smith, C.L., Yeh, R.C., Lis, J.T., Peterson, C.L. and Wang, M.D. (2002) Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1960-1965.

13. Hagerman, T.A., Fu, Q., Molinié, B., Denvir, J., Lindsay, S. and Georgel, P.T. (2009) Chromatin stability at low concentration depends on histone octamer saturation levels. *Biophys J*, **96**, 1944-1951.
14. Kulaeva, O.I., Gaykalova, D.A. and Studitsky, V.M. (2007) Transcription through chromatin by RNA polymerase II: histone displacement and exchange. *Mutat Res*, **618**, 116-129.
15. Santis, P.D., Morosetti, S. and Scipioni, A. (2010) Prediction of nucleosome positioning in genomes: limits and perspectives of physical and bioinformatic approaches. *J Biomol Struct Dyn*, **27**, 747-764.
16. Teif, V.B. and Rippe, K. (2009) Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities. *Nucleic Acids Res*, **37**, 5641-5655.
17. Förster, T. (1947) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, **437**, 55-75.
18. Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*, **47**, 819-846.
19. Dieterich, A.E., Axel, R. and Cantor, C.R. (1979) Salt-induced structural changes of nucleosome core particles. *J. Mol. Biol.*, **129**, 587-602.
20. Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. and Luger, K. (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol*, **7**, 1121-1124.
21. Toth, K., Brun, N. and Langowski, J. (2001) Trajectory of nucleosomal linker DNA studied by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, **40**, 6921-6928.
22. Toth, K., Brun, N. and Langowski, J. (2006) Chromatin compaction at the mononucleosome level. *Biochemistry*, **45**, 1591-1598.
23. Li, G. and Widom, J. (2004) Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 763-769.
24. Koopmans, W.J., Brehm, A., Logie, C., Schmidt, T. and van Noort, J. (2007) Single-Pair FRET Microscopy Reveals Mononucleosome Dynamics. *J Fluoresc*, **17**, 785-795.
25. Tomschik, M., van Holde, K. and Zlatanova, J. (2009) Nucleosome dynamics as studied by single-pair fluorescence resonance energy transfer: a reevaluation. *J Fluoresc*, **19**, 53-62.
26. Tomschik, M., Zheng, H., van Holde, K., Zlatanova, J. and Leuba, S.H. (2005) Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-

- pair fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3278-3283.
27. Gansen, A., Toth, K., Schwarz, N. and Langowski, J. (2008) Structural Variability of Nucleosomes Detected by Single-Pair Förster Resonance Energy Transfer: Histone Acetylation, Sequence Variation, and Salt Effects. *J Phys Chem B*, 2604-2613.
 28. Kelbauskas, L., Chan, N., Bash, R., DeBartolo, P., Sun, J., Woodbury, N. and Lohr, D. (2008) Sequence-dependent variations associated with H2A/H2B depletion of nucleosomes. *Biophys J*, **94**, 147-158.
 29. Kelbauskas, L., Chan, N., Bash, R., Yodh, J., Woodbury, N. and Lohr, D. (2007) Sequence-dependent nucleosome structure and stability variations detected by Förster resonance energy transfer. *Biochemistry*, **46**, 2239-2248.
 30. Koopmans, W.J., Buning, R., Schmidt, T. and van Noort, J. (2009) spFRET using alternating excitation and FCS reveals progressive DNA unwrapping in nucleosomes. *Biophys. J.*, **97**, 195-204.
 31. Li, G., Levitus, M., Bustamante, C. and Widom, J. (2005) Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 46-53.
 32. Gansen, A., Valeri, A., Hauger, F., Felekyan, S., Kalinin, S., Tóth, K., Langowski, J. and Seidel, C.A.M. (2009) Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 15308-15313.
 33. Blosser, T.R., Yang, J.G., Stone, M.D., Narlikar, G.J. and Zhuang, X. (2009) Dynamics of nucleosome remodelling by individual ACF complexes. *Nature*, **462**, 1022-1027.
 34. Crick, F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*, **227**, 561-563.
 35. Isenberg, I. (1979) Histones. *Annu Rev Biochem*, **48**, 159-191.
 36. Alberts, B. (1983) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc.
 37. Roark, D.E., Geoghegan, T.E., Keller, G.H., Matter, K.V. and Engle, R.L. (1976) Histone interactions in solution and susceptibility to denaturation. *Biochemistry*, **15**, 3019-3025.
 38. Clapier, C.R., Chakravarthy, S., Petosa, C., Fernandez-Tornero, C., Luger, K. and Muller, C.W. (2008) Structure of the Drosophila nucleosome core particle highlights evolutionary constraints on the H2A-H2B histone dimer. *Proteins*, **71**, 1-7.
 39. Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E. and Bunick, G.J. (2000) Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 1513-1534.

40. White, C.L., Suto, R.K. and Luger, K. (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J*, **20**, 5207-5218.
41. Bednar, J., Horowitz, R.A., Dubochet, J. and Woodcock, C.L. (1995) Chromatin conformation and salt-induced compaction: three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy. *J Cell Biol*, **131**, 1365-1376.
42. Olins, D.E. and Olins, A.L. (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 809-814.
43. Depken, M. and Schiessel, H. (2009) Nucleosome shape dictates chromatin fiber structure. *Biophys J*, **96**, 777-784.
44. Finch, J.T. and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1897-1901.
45. Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A. and Whitaker, N. (1993) A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9021-9025.
46. Leuba, S.H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K., Zlatanova, J. and Bustamante, C. (1994) Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11621-11625.
47. Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, **436**, 138-141.
48. Zlatanova, J., Leuba, S.H. and van Holde, K. (1998) Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J*, **74**, 2554-2566.
49. Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.T. and Thomas, J.O. (1980) A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Nature*, **287**, 509-516.
50. Marsden, M.P. and Laemmli, U.K. (1979) Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, **17**, 849-858.
51. Phillips, D.M. (1963) The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J*, **87**, 258-263.
52. Pogo, B.G., Pogo, A.O., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. (1968) Changing patterns of histone acetylation and RNA synthesis in regeneration of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **59**, 1337-1344.
53. Turner, B.M., Franchi, L. and Wallace, H. (1990) Islands of acetylated histone H4 in polytene chromosomes and their relationship to chromatin packaging and transcriptional activity. *J Cell Sci*, **96 (Pt 2)**, 335-346.

54. Whitfield, W.G., Fellows, G. and Turner, B.M. (1986) Characterization of monoclonal antibodies to histone 2B. Localization of epitopes and analysis of binding to chromatin. *Eur J Biochem*, **157**, 513-521.
55. Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.
56. Kouzarides, T. (2007) SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*, **131**, 822.
57. Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
58. Murr, R. (2010) Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet*, **70**, 101-141.
59. Manohar, M., Mooney, A.M., North, J.A., Nakkula, R.J., Picking, J.W., Edon, A., Fishel, R., Poirier, M.G. and Ottesen, J.J. (2009) Acetylation of histone H3 at the nucleosome dyad alters DNA-histone binding. *J Biol Chem*, **284**, 23312-23321.
60. Anderson, J.D., Lowary, P.T. and Widom, J. (2001) Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol*, **307**, 977-985.
61. Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R. and Peterson, C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, **311**, 844-847.
62. Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G. and Wolffe, A.P. (1997) Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J*, **16**, 2096-2107.
63. Widlund, H.R., Vitolo, J.M., Thiriet, C. and Hayes, J.J. (2000) DNA sequence-dependent contributions of core histone tails to nucleosome stability: differential effects of acetylation and proteolytic tail removal. *Biochemistry*, **39**, 3835-3841.
64. Franklin, S.G. and Zweidler, A. (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature*, **266**, 273-275.
65. Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16477-16484.
66. Ray-Gallet, D. and Almouzni, G. (2010) Nucleosome dynamics and histone variants. *Essays Biochem*, **48**, 75-87.
67. Brown, D.T. (2001) Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol*, **2**, REVIEWS0006.

68. Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.M., Jackson, V. and van Holde, K. (2009) The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure*, **17**, 160-171.
69. Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E. and Fitzgerald-Hayes, M. (1995) A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev*, **9**, 573-586.
70. Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C. and Tremethick, D.J. (2002) The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol*, **9**, 172-176.
71. Zlatanova, J. and Thakar, A. (2008) H2A.Z: view from the top. *Structure*, **16**, 166-179.
72. Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
73. Park, Y.J., Claus, R., Weichenhan, D. and Plass, C. (2011) Genome-wide epigenetic modifications in cancer. *Prog Drug Res*, **67**, 25-49.
74. Minucci, S. and Pelicci, P.G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 38-51.
75. Kurdistani, S.K. (2011) Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog Drug Res*, **67**, 91-106.
76. Mai, A. and Altucci, L. (2009) Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 199-213.
77. Biancotto, C., Frige, G. and Minucci, S. (2010) Histone modification therapy of cancer. *Adv Genet*, **70**, 341-386.
78. Brdicka, R. (1973) *Grundlagen der physikalischen Chemie*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
79. Langowski, J., Wachsmuth, M., Rippe, K., and Tewes, M. (2000) *Biomolecular shape and interactions determined by fluorescence correlation spectroscopy*. Publications CNRS, Paris.
80. Kaudse, T. (2009), Erweiterung eines Einzelmolekül-FRET-Spektrometers um alternierende Laseranregung und Charakterisierung des Systems, Diplomarbeit, Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
81. Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy, Third Edition*. Springer, New York.

82. Nir, E., Michalet, X., Hamadani, K.M., Laurence, T.A., Neuhauser, D., Kovchegov, Y. and Weiss, S. (2006) Shot-noise limited single-molecule FRET histograms: comparison between theory and experiments. *J Phys Chem B*, **110**, 22103-22124.
83. Haustein, E. and Schwille, P. (2007) Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **36**, 151-169.
84. Anderson, J.D. and Widom, J. (2000) Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol*, **296**, 979-987.
85. Thastrom, A., Lowary, P.T., Widlund, H.R., Cao, H., Kubista, M. and Widom, J. (1999) Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J Mol Biol*, **288**, 213-229.
86. Tewes, M. (1998) Aufbau eines Experimentes zur Fluoreszenzkreuzkorrelations-spektroskopie, Erweiterung der theoretischen Grundlagen und biologische Anwendungen, Dissertation, Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
87. Weidemann, T., Wachsmuth, M., Tewes, M., Rippe, K. and Langowski, J. (2002) Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Single Molecules*, **3**, 49-61.
88. Gansen, A. (2008), Chromatin at the Nanolevel - Development of a single molecule FRET experiment and analysis of the structure and stability of individual nucleosomes, Dissertation, Fakultät für Physik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
89. Dyer, P.N., Edayathumangalam, R.S., White, C.L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U.M. and Luger, K. (2004) Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Meth. Enzymol.*, **375**, 23-44.
90. Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J. and Luger, K. (2004) A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem*, **279**, 24274-24282.
91. Allis, C.D., Glover, C.V., Bowen, J.K. and Gorovsky, M.A. (1980) Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell*, **20**, 609-617.
92. Claudet, C., Angelov, D., Bouvet, P., Dimitrov, S. and Bednar, J. (2005) Histone octamer instability under single molecule experiment conditions. *J Biol Chem*, **280**, 19958-19965.
93. Gansen, A., Hauger, F., Toth, K. and Langowski, J. (2007) Single-pair fluorescence resonance energy transfer of nucleosomes in free diffusion: optimizing stability and resolution of subpopulations. *Anal Biochem*, **368**, 193-204.

-
94. Centonze, V.E., Sun, M., Masuda, A., Gerritsen, H. and Herman, B. (2003) Fluorescence resonance energy transfer imaging microscopy. *Methods Enzymol*, **360**, 542-560.
 95. Luger, K., Rechsteiner, T.J. and Richmond, T.J. (1999) Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods in Enzymology*, **304**, 3-19.
 96. Hauger, F. (2007), Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen nukleosomaler Struktur und Dynamik, Dissertation, Fakultät für Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
 97. Böhm, V., Hieb, A.R., Andrews, A.J., Gansen, A., Rocker, A., Toth, K., Luger, K. and Langowski, J. (2010) Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkq1279, [Epub ahead of print].
 98. Hubner, G., Renn, Renge and Wild. (2001) Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen. *The Journal of Chemical Physics*, **115**, 9619-9622.
 99. Pope, L.H., Bennink, M.L., van Leijenhorst-Groener, K.A., Nikova, D., Greve, J. and Marko, J.F. (2005) Single chromatin fiber stretching reveals physically distinct populations of disassembly events. *Biophys J*, **88**, 3572-3583.
 100. Record, M.T., Lohman, M.L. and Haseth, P.D. (1976) Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J Mol Biol*, **107**, 145-158.
 101. Thastrom, A., Lowary, P.T. and Widom, J. (2004) Measurement of histone-DNA interaction free energy in nucleosomes. *Methods*, **33**, 33-44.
 102. Muthurajan, U.M., Bao, Y., Forsberg, L.J., Edayathumangalam, R.S., Dyer, P.N., White, C.L. and Luger, K. (2004) Crystal structures of histone Sin mutant nucleosomes reveal altered protein-DNA interactions. *EMBO J*, **23**, 260-271.
 103. Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W. and Richmond, T.J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **319**, 1097-1113.
 104. Bucci, A., Kapitzka, K. and Thoma, F. (2006) Rapid accessibility of nucleosomal DNA in yeast on a second time scale. *EMBO J*, **25**, 3123-3132.
 105. Wilhelm, M.L. and Wilhelm, F.X. (1980) Conformation of nucleosome core particles and chromatin in high salt concentration. *Biochemistry*, **19**, 4327-4331.
 106. Yager, T.D., McMurray, C.T. and van Holde, K.E. (1989) Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles. *Biochemistry*, **28**, 2271-2281.
 107. Khrapunov, S.N., Dragan, A.I., Sivolob, A.V. and Zagariya, A.M. (1997) Mechanisms of stabilizing nucleosome structure. Study of dissociation of histone octamer from DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1351**, 213-222.

108. Hoch, D.A., Stratton, J.J. and Gloss, L.M. (2007) Protein-Protein Förster Resonance Energy Transfer Analysis of Nucleosome Core Particles Containing H2A and H2A.Z. *J Mol Biol*, **371**, 971-988.
109. Polach, K.J. and Widom, J. (1995) Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation. *J Mol Biol*, **254**, 130-149.
110. Polach, K.J. and Widom, J. (1996) A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites. *J Mol Biol*, **258**, 800-812.
111. Liu, X., Bowen, J. and Gorovsky, M.A. (1996) Either of the major H2A genes but not an evolutionarily conserved H2A.F/Z variant of *Tetrahymena thermophila* can function as the sole H2A gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 2878-2887.
112. van Daal, A. and Elgin, S.C. (1992) A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*, **3**, 593-602.
113. Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M. and Ausio, J. (2001) Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem*, **276**, 41945-41949.
114. Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G.P., Hendzel, M.J. and Davie, J.R. (1993) Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J*, **296 (Pt 3)**, 737-744.
115. Zhang, H., Roberts, D.N. and Cairns, B.R. (2005) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, **123**, 219-231.
116. Kruithof, M. and van Noort, J. (2009) Hidden Markov analysis of nucleosome unwrapping under force. *Biophys J*, **96**, 3708-3715.
117. Mihardja, S., Spakowitz, A.J., Zhang, Y. and Bustamante, C. (2006) Effect of force on mononucleosomal dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15871-15876.
118. Bondarenko, V.A., Steele, L.M., Ujvári, A., Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Polikanov, Y.S., Luse, D.S. and Studitsky, V.M. (2006) Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, **24**, 469-479.
119. Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M. and Bustamante, C. (2009) Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science*, **325**, 626-628.
120. Jin, J., Bai, L., Johnson, D.S., Fulbright, R.M., Kireeva, M.L., Kashlev, M. and Wang, M.D. (2010) Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 745-752.

121. Kulaeva, O.I., Gaykalova, D.A., Pestov, N.A., Golovastov, V.V., Vassilyev, D.G., Artsimovitch, I. and Studitsky, V.M. (2009) Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 1272-1278.
122. Bécavin, C., Barbi, M., Victor, J.-M. and Lesne, A. (2010) Transcription within condensed chromatin: Steric hindrance facilitates elongation. *Biophys J*, **98**, 824-833.
123. English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E.A. and Tyler, J.K. (2006) Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell*, **127**, 495-508.
124. Xin, H., Takahata, S., Blanksma, M., McCullough, L., Stillman, D.J. and Formosa, T. (2009) yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement. *Mol. Cell*, **35**, 365-376.
125. Antonik, M., Felekyan, S., Gaiduk, A. and Seidel, C.A. (2006) Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. *J Phys Chem B*, **110**, 6970-6978.
126. Kalinin, S., Felekyan, S., Antonik, M. and Seidel, C.A. (2007) Probability distribution analysis of single-molecule fluorescence anisotropy and resonance energy transfer. *J Phys Chem B*, **111**, 10253-10262.
127. Kapanidis, A.N., Lee, N.K., Laurence, T.A., Doose, S., Margeat, E. and Weiss, S. (2004) Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8936-8941.
128. Muller, B.K., Zaychikov, E., Brauchle, C. and Lamb, D.C. (2005) Pulsed interleaved excitation. *Biophys J*, **89**, 3508-3522.