

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Master of Science

Kathrin Lehmann

geborene Tegeler

aus: Herford

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Thema

Fluoreszenz-Einzelmolekül-Studien
zur
Dynamik von Mononukleosomen

Gutachter:

Prof. Dr. Jörg Langowski

Prof. Dr. Dirk-Peter Herten

*Experience is what you get
when you don't get what you want.*

Randy Pausch

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Nukleosom	1
1.2. Chromatin.....	3
1.3. Posttranslationale Modifikation	6
1.4. Öffnungsmechanismus des Nukleosoms.....	7
1.5. Relevanz der N-terminalen Enden der Histone	8
1.6. Molekulardynamik-Simulationen von Nukleosomen	9
1.7. Ziel der Arbeit.....	11
2. Theorie.....	14
2.1. Fluoreszenz.....	14
2.2. Förster-Resonanzenergietransfer - FRET.....	15
2.3. Anisotropie	16
2.4. Einzelmolekül-FRET	17
2.5. spFRET mit alternierender Zweifarbenanregung - ALEX	20
3. Material.....	23
3.1. DNA-Präparation und Klonierung.....	23
3.1.1. Verwendete Präparationskits.....	23
3.1.2. Verwendete Primer.....	23
3.1.3. Verwendeter Vektor	24
3.2. Verwendete Fluorophore	25
3.2.1. Fluoreszenzmarkierte DNA-Konstrukte.....	25
3.2.2. Fluoreszenzmarkierte Histon-Konstrukte.....	26
3.3. Proteinexpression	27
3.3.1. Ampicillin	27

3.3.2. LB-Amp-Platten.....	27
3.3.3. LB-Medium.....	27
3.3.4. IPTG.....	27
3.4. Gele	27
3.4.1. Agarosegelelektrophorese.....	27
3.4.2. Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Gelelektrophorese.....	28
3.4.3. Triton-Acetic-Acid-Urea- (TAU-) Gelelektrophorese.....	28
3.4.4. Native-Polyacrylamid-Gele (PAA)	29
3.5. Färbung der Gele	29
3.5.1. Coomassie.....	29
3.5.2. Silberfärbung.....	29
3.6. Puffer	30
3.6.1. Für Proteinaufreinigung verwendete Puffer.....	30
3.6.2. Puffer für Nukleosomen Rekonstitution.....	31
3.6.3. HPLC-Puffer	31
3.7. Geräte.....	32
3.7.1. Zentrifugen.....	32
3.7.2. Thermocycler	32
3.7.3. Gelelektrophorese.....	32
3.7.4. Gelstation	32
3.7.5. Inkubator	32
3.7.6. Ultraschallstab.....	33
3.7.7. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	33
3.7.8. Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie.....	33
3.7.9. Messkammer	33
3.7.10. Absorptionsspektrometer.....	33
3.7.11. Fluoreszenzspektrometer.....	34
3.7.12. Fluoreszenzscanner.....	34
3.8. Software	34
3.8.1. ImageQuant.....	34
3.8.2. IgorPro	34
3.8.3. FRETtchen	36
3.8.4. ALEXControl	38
3.8.5. ALEXEval.....	38
3.8.6. MatLab	40
3.9. spFRET- / ALEX-Setup.....	40

4. Methoden	42
4.1. Klonierung der Histonmutanten	42
4.1.1. Subklonierung der H3-Mutanten.....	42
4.1.2. Overlap-Extension-PCR für H2A-Mutanten	42
4.1.3. Restriktion	43
4.1.4. Ligation.....	43
4.1.5. Plasmidaufreinigung.....	44
4.2. Gelelektrophorese	44
4.2.1. Agarosegelelektrophorese	44
4.2.2. TAU-Gelelektrophorese	44
4.2.3. PAA-Gelelektrophorese	45
4.3. Proteinaufreinigung	45
4.3.1. Transformation in <i>E. coli</i> BL21	45
4.3.2. Proteinexpressionstest.....	45
4.3.3. Überexpression der Proteine	46
4.3.4. Aufreinigung mittels FPLC	46
4.4. Oktamer-Rekonstitution	47
4.5. Nukleosomen-Rekonstitution	48
4.6. Fluoreszenzmarkierung von Nukleosomen	48
4.6.1. DNA-Markierung	48
4.6.2. DNA-Aufreinigung mittels HPLC.....	49
4.7. Proteinmarkierung	49
4.8. Absorptionsspektroskopie	50
4.9. Messung der Fluoreszenzanisotropie	51
4.10. Restriktionsanalyse von Nukleosomen	52
4.11. FRET-Messungen	52
4.11.1. Vorbereitung der Messkammern.....	53
4.11.2. Typhoon Messungen.....	53
4.11.3. SpFRET-Messungen	54
4.11.4. ALEX-Messungen.....	54
4.11.5. Einzelmolekül-Multiparameter Fluoreszenz-Messungen	56
4.12. Grobkörnige (Coarse grained) Simulationen	56

5. Ergebnisse.....	57
5.1. Einfluss von Mutationen der H2A α3-Region auf die Nukleosomenarchitektur	57
5.1.1. Klonierung und Proteinaufreinigung der H2A-Mutanten	57
5.1.2. Oktamer- und Nukleosomenrekonstitution mit H2A-Mutanten	59
5.1.3. Restriktionsanalyse der Nukleosomen.....	62
5.1.4. Stabilitätsmessungen von Nukleosomen mit H2A-Mutation	64
5.1.5. Analyse des Einflusses der H2A-Mutationen auf den Öffnungsmechanismus des Nukleosoms	74
5.1.6. Zusammenfassung der Einflüsse von Mutationen der H2A α 3-Region ...	79
5.2. Dynamik des H3-Histonschwanzes	81
5.2.1. Klonierung und Proteinaufreinigung der H3-Mutanten	81
5.2.2. Oktamer- und Nukleosomenrekonstitution mit H3-Mutanten	82
5.2.3. Stabilitätsmessungen von H3-Mutanten.....	83
5.2.4. Bestimmung der Anisotropie der H3 markierten Oktamere.....	87
5.2.5. Simulationsergebnisse von Wildtyp- und mutierten Nukleosomen	87
5.2.6. Intranukleosomale Interaktion von H3K9C	93
5.2.7. Intranukleosomale Interaktion von H3K4C	95
5.2.8. Analyse des Einflusses der H2AR81AR88A-Mutation auf die intranukleosomalen Interaktionen des H3-Histonschwanzes (H3K9C) .	98
5.2.9. smMFD-Messungen der Dynamik des H3-Histonschwanzes	100
5.2.10. Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Interaktionen des H3-Histonschwanzes	103
6. Diskussion.....	104
7. Danksagung.....	114
8. Literaturverzeichnis.....	115
9. Anhang	121
9.1. Typhoon Eval	121
9.2. spFRETEval	131
9.3. ALEX-3D	132

Zusammenfassung

Eukaryontische Zellen weisen neben einer hochgradig organisierten Genregulation auch eine besonders ausgefeilte Kompaktierung der DNA auf, deren Basiseinheit Nukleosomen sind. Diese bestehen aus einem Histonkern mit je zwei Kopien der einzelnen Histonproteine – H2A, H2B, H3 und H4 – und einer 147 bp langen DNA, die in 1,7 Windungen um den Histonkern gewickelt ist. Im Chromatin sind die einzelnen Nukleosomen über DNA-Linker (10 – 90 bp) miteinander verbunden. Die Konformation dieses Komplexes kann durch posttranslationale Modifikation der Proteine und der DNA verändert werden. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die aus dem Histonkern herausragenden H3-Histonschwänze, deren Deletion zur Destabilisierung des Komplexes führt. Aus Simulationen lässt sich schließen, dass dies mit Veränderungen der elektrostatischen Umgebung im inneren des Histonkerns, der $\alpha 3$ -Region des H2A-Histonproteins, einhergeht. Da bis heute unklar ist, ob die elektrostatische Umgebung dieser Region einen direkten Einfluss auf die Stabilität hat, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Mutationen der Positionen R81 und R88 des H2A-Histonproteins auf die Nukleosomenarchitektur und –Stabilität analysiert.

Hierfür wurde ein Aminosäureaustausch zu Alanin bzw. zu Glutaminsäure durchgeführt und dessen Einfluss mit Hilfe von Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) charakterisiert. FRET bezeichnet einen distanzabhängigen, strahlungsfreien Energie-Transfer zwischen zwei Fluorophoren und kann als Maß für Distanzveränderungen im Bereich von 2 – 10 nm verwendet werden. Durch den Vergleich von mutierten und Wildtyp-Nukleosomen unter Verwendung verschiedener Markierungsstrategien konnte eine durch die Mutationen hervorgerufene Destabilisierung detektiert werden. Deren jeweiliges Ausmaß lässt Rückschlüsse auf die Relevanz der Position ($S_{Wt} > S_{R88} > S_{R81} > S_{R81R88}$), sowie der Ladung ($S_{RA} > S_{RE}$) der eingebrachten Mutation für die Stabilität der Nukleosomen zu. Eine Einzelmolekülanalyse der salzinduzierten Öffnung der Nukleosomen weist auf eine Schwächung der Dimer:Tetramer-Interaktion als Grund für die Destabilisierung hin.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Dynamik und die intranukleosomalen Wechselwirkungen des H3-Histonschwanzes näher betrachtet. Hierfür wurde unter Verwendung von zwei mutierten H3-Histonproteinen (H3K4C und H3K9C) eine neue Markierungsstrategie etabliert. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass Interaktionen im Bereich der Dyadenachse auftreten und diese einen dynamischen Prozess darstellen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die intranukleosomalen Interaktionen des H3-Histonschwanzes das Nukleosoms stabilisieren.

Abstract

Chromatin compaction is one of the most sophisticated features of eukaryotic cells. The basic packing unit of chromatin are nucleosomes. The protein octamer of nucleosomes is build up by two copies of each histone protein (H2A, H2B, H3, H4), around which 147 bp of DNA are wrapped. In the chromatin Single nucleosomes are connected through linker DNAs of approximately 10 – 90bp. The conformation of this complex can be modified by posttranslational modifications on the DNA and/or histoneproteins. Of particular importance for the conformation and stability of the nucleosome are the N-terminal tails, which protrude from the nucleosome core. It is known that a deletion of the H3 tail leads to a destabilisation of the entire complex. A comparison of molecular dynamics simulations of wildtype and H3 tailless nucleosomes show a changed electrostatic environment in the $\alpha 3$ region of H2A within the octamer core. Whether the changed electrostatic environment fosters the destabilisation or not is not yet known. To address this question site-specific mutations in H2A at position R81 and R88 to Alanine or Glutamic acid were introduced. The influence of this amino acid exchange was analysed using Förster resonance energy transfer (FRET). FRET - a distance dependent, nonradiative energy transfer between two fluorophores - can be used to measure distances between 2 – 10 nm. With the help of different labelling strategies and direct comparison between wildtype and mutated nucleosomes I was able to detect the proposed destabilisation upon the changed electrostatic environment. The variation in stability elucidates the relevance of both position ($S_{Wt} > S_{R88} > S_{R81} > S_{R81R88}$) and charge ($S_{RA} > S_{RE}$) of the amino acids. Single molecule FRET studies further revealed that the destabilisation might be caused by a weakened dimer:tetramer interface.

The second part focuses on the dynamics and intranucleosomal interactions of the N-terminal tail of H3. Mutated versions of H3 - H3K4C and H3K9C - were used to establish a new labelling strategy. The results suggest a dynamic interaction of the H3 tail and the DNA in the vicinity of the dyad axis. Those intranucleosomal interactions of the N-terminal tail of H3 are presumably stabilising the entire nucleosome.

1. Einleitung

1.1. Das Nukleosom

Um die gesamte DNA einer Zelle in einem Zellkern unterbringen zu können, wird ein hochgradig organisiertes Kompaktierungssystem benötigt. Das Nukleosom bildet die Basiseinheit dieser Chromatinorganisation und ermöglicht eine ungefähr 7-fache Kompaktierung der genomischen DNA [1]. Ein Nukleosom (Abbildung 1) mit einer Tiefe von 5,5 nm und einem Durchmesser von ungefähr 11 nm besteht aus einem Histonoktamer, um das 146 - 147 DNA-Basenpaare in 1,7 Windungen gewickelt sind [2]; die zentrale Position der DNA im Nukleosom wird als Dyadenachse bezeichnet.

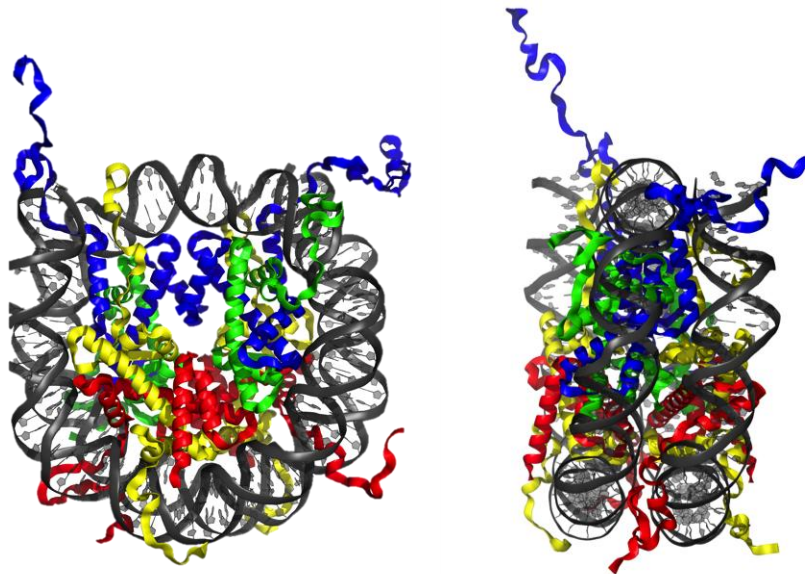


Abbildung 1: Kristallstruktur eines Mononukleosoms mit einer Auflösung von 1,9 Å. H2A (gelb), H2B (rot), H3 (blau), H4 (grün) und DNA (grau). Links: Frontalansicht, Rechts: seitliche Ansicht; Abbildung (PDB: 1KX5) übernommen aus [30].

Die Existenz von Nukleosomen galt lange als erstaunlich, da die Länge der um das Histonoktamer gewickelten DNA der Persistenzlänge von DNA (~50 nm) entspricht [3]. Die elastische Energie, die aufgebracht werden muss um DNA in diese gewundene Form zu bringen, errechnet sich zu 75 kcal/mol und würde somit einen energetisch ungünstigen Zustand darstellen. Allerdings lassen sich im Nukleosom Interaktionen nachweisen, die über Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem DNA-Rückgrat und den Histonproteinen ausgebildet werden [4]. Diese treten sequenzunabhängig mit einer Periodizität von fünf Basenpaaren auf und kompensieren den hohen Energieaufwand [5]. Die stärksten Interaktionen treten im Bereich der Dyadenachsen und

im Abstand von ~40 bp von der Dyadenachse auf. An den Austrittsstellen der DNA ist die Wechselwirkung am schwächsten [5].

Das Histonoktamer besteht aus jeweils zwei Kopien der verschiedenen Kernhistonproteine H2A, H2B, H3 und H4. Jedes dieser Histonproteine besteht aus drei-Domänen [6]:

- 1) Die ungefähr 70 Aminosäuren lange Histonfaltungsdomäne.
- 2) Die erweiterten Histonfaltungsdomänen, welche für Protein-Protein-Interaktionen im Inneren des Oktamers und Protein-DNA-Interaktionen verantwortlich sind und dadurch die Oberflächenstruktur des Nukleosoms bestimmen.
- 3) Die flexiblen, unstrukturierten Histonschwänze, welche aus dem Oktamer herausragen.

Die Histonfaltungsdomäne besteht in jedem der vier Histone aus drei α -Helices, welche über kurze Schleifen (*Loops* - L) miteinander verbunden sind. Die beiden äußeren Helices $\alpha1$ und $\alpha3$ sind aus 10 – 14 und die innenliegende $\alpha2$ -Helix aus 28 Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 3).

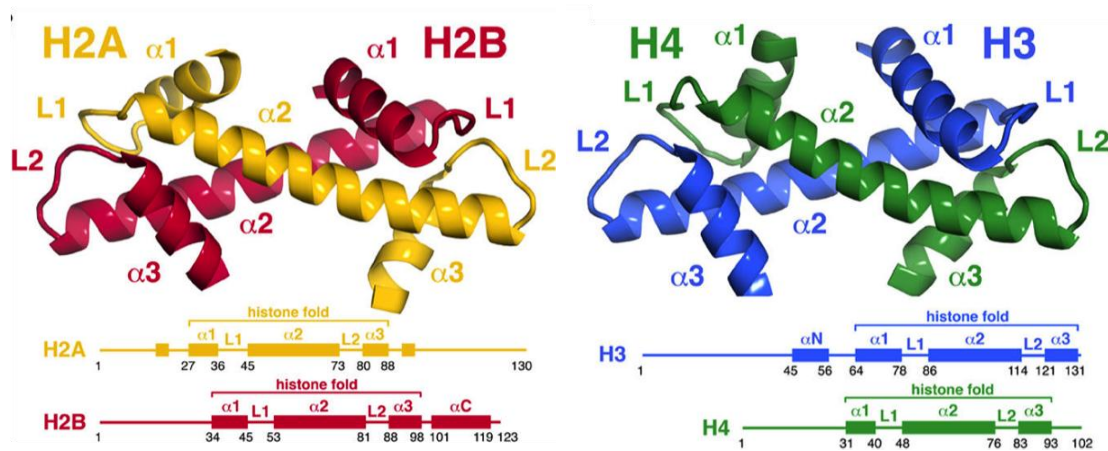


Abbildung 2: Schematische Darstellung der vier Histonproteine H2A (gelb), H2B (rot), H3 (blau) und H4 (grün). Links: Interaktion der gefalteten Histonproteine H2A und H2B und Darstellung der Domänen; die drei α -Helices sind als Boxen und die Schleifen zwischen den drei α -Helices als durchgezogene Linie dargestellt. Rechts: Interaktion der gefalteten Histonproteine H3 und H4. Abbildung übernommen aus [79].

Die Histonproteine H2A und H2B formen zwei (H2A-H2B)-Dimere, während aus den Histonproteinen H3 und H4 ein (H3-H4)₂-Tetramer aufgebaut wird [7]. Die $\alpha2$ -Dömanen sind jeweils antiparallel zueinander ausgerichtet, wodurch die L1- und L2-Schleifen der beiden Bindungspartner direkt nebeneinander liegen [6]. Sowohl das (H3-H4)₂-Tetramer, als auch die beiden (H2A-H2B)-Dimere sind in Lösung stabil. Das Oktamer hingegen ist unter physiologischen Bedingungen nicht stabil. Die Interaktion zwischen dem Dimer und dem

Tetramer ist hierbei schwächer als die Protein-Protein-Interaktionen im Inneren der Dimere und des Tetramers [1].

1.2. Chromatin

Nukleosomen stellen lediglich die erste von mehreren Kompaktierungsstufen dar. Im Chromatin bilden Nukleosomen über DNA-Linker von 10 bis 90 Basenpaaren eine Art Perlenkette mit einem Durchmesser von 11 nm. Mit Hilfe der beiden Linkerhistone H1 und H5, welche in der Nähe der DNA-Austrittsstellen der Nukleosomen binden, wird diese Perlenkette weiter, zu einer Struktur mit einem Durchmesser von 30 nm, kompaktiert [8]. Da der genaue Aufbau dieser zweiten Stufe der Kompaktierung derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt ist, werden im Folgenden zwei Modelle zum Aufbau der 30-nm-Struktur vorgestellt (Abbildung 3). Beide Modelle basieren auf *in vitro* Daten [9].

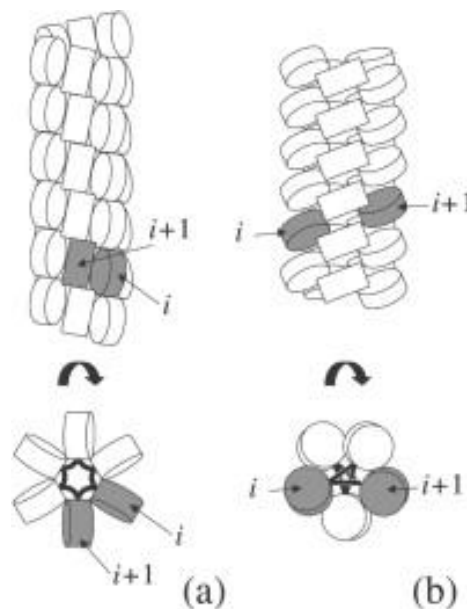


Abbildung 3: Schematische Darstellung der beiden Modelle für die 30-nm-Struktur der Chromatinkompaktierung . a) Solenoid-Modell b) Zick-Zack Modell. Abbildung übernommen aus [9].

Im Solenoid-Modell, bilden die Nukleosomen eine helixartige Struktur, in der die Achsen der Nukleosomen ungefähr im rechten Winkel zu der Achse der Helix stehen. Die Austrittsstellen der DNA zeigen in diesem Modell nach Innen und die Linker-DNA muss gebogen werden, um die Interaktion mit den benachbarten Nukleosomen sicherstellen zu können. Das Zickzack-Modell geht hingegen von gestreckten DNA-Linkern aus die Nukleosomen auf gegenüberliegenden Seiten der Struktur miteinander verbinden. Es entstehen Interaktionen zwischen den übernächsten Nukleosomen und die Nukleosomenachse ist lediglich ein wenig gegen die Helixachse verschoben [9]. Neuere Arbeiten lassen jedoch vermuten, dass die beschriebene 30-nm-Struktur *in vivo* womöglich nicht existiert [10].

Die weitere Kompaktierung des Chromatins hängt vom Stadium des Zellzyklus ab. Während der Metaphase liegen die Chromosomen in der kompaktesten Packung vor, um während der anschließenden Zellteilung auf die Zellen verteilt werden zu können. In dieser Phase des Zellzyklus formt die 30-nm-Struktur enge Schleifen mit einer geschätzten Länge von 300 nm. Die weitere Kompaktierung erfolgt über Auffaltung dieser Struktur und führt letztendlich zum kompaktierten Chromosom mit einem Durchmesser von ungefähr 1400 nm [11] (Abbildung 4).

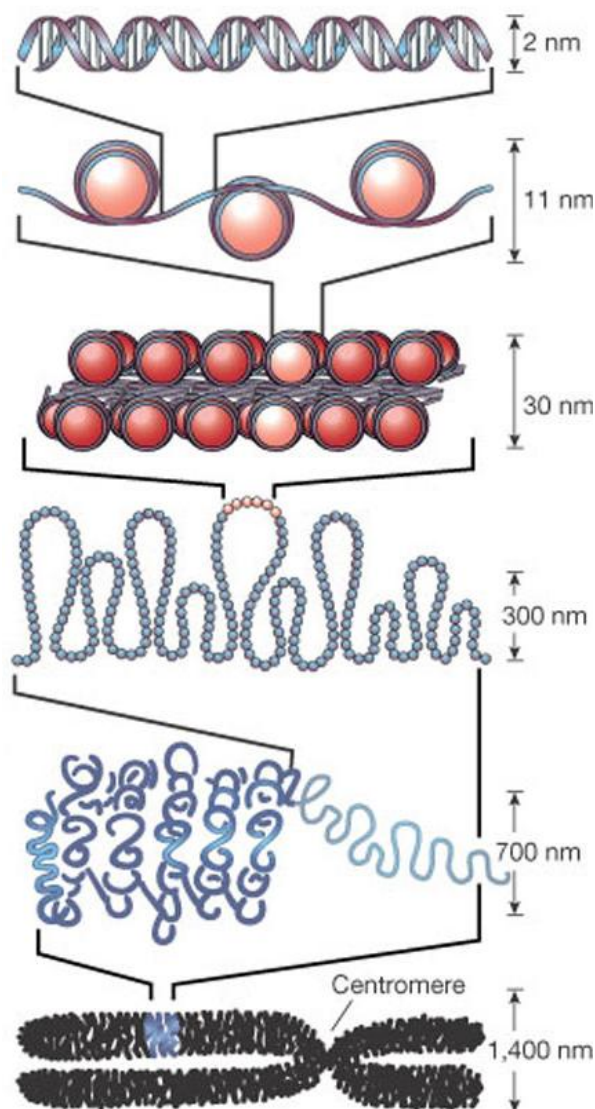


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Metaphase Chromosoms. Einzelne Kompaktierungsschritte von oben nach unten: Freie DNA, erste Kompaktierung durch Nukleosomen bis zum komplett kondensierten Chromosom. Abbildung übernommen aus [11].

Wesentlich interessanter ist jedoch die Kompaktierung der Chromosomen in der Interphase, in welcher bestimmte Bereiche für die Transkription zur Verfügung gestellt werden müssen. Auch hier gibt es verschiedene Modelle, die nebeneinander koexistieren. Für jedes dieser

Modelle (Abbildung 5) gibt es experimentelle Indizien, die mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden.

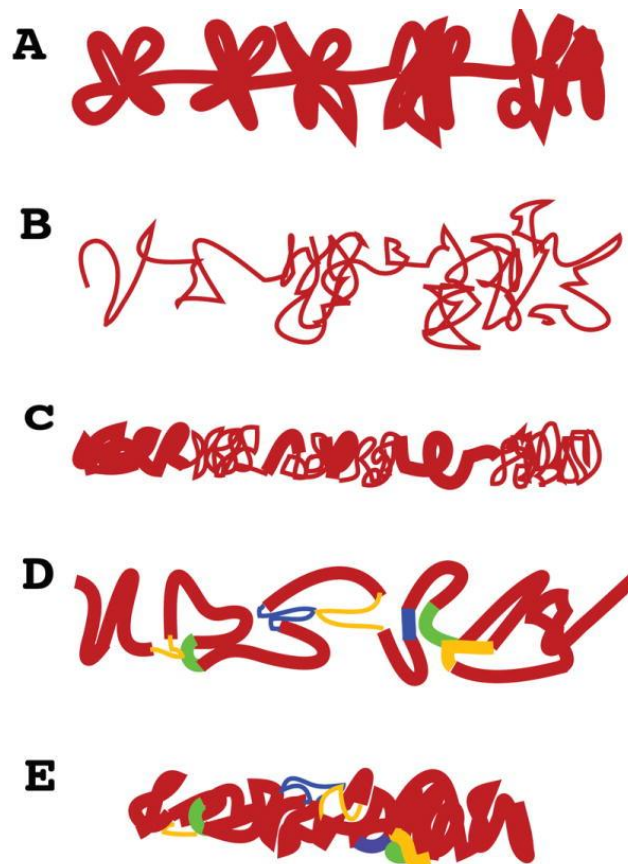


Abbildung 5: Schematische Darstellung der möglichen Modelle für die Organisation von Interphase-Chromosomen. A) Theoretisches Modell: basierend auf Extrapolation des radialen Schleifenmodells für mitotische Chromosomen; B) Modell basierend auf cryo-EM Aufnahmen; C) Chromonema Modell basierend auf kombinierter Licht- und Elektronenmikroskopie; D) Knotenpunktmodell, beruht auf 3C-Experimenten, bei denen nah beieinander liegende DNA-Fragmente durch Formaldehyd quervernetzt werden; E) Hybrid aus Modell C und D. Abbildung übernommen aus [12].

Das konventionelle Modell (A), in dem die 30-nm-Struktur Schleifen bildet und somit eine höhere Ordnung erzielt, geht auf Extrapolation des Zustandes der Metaphase-Chromosomen zurück und nicht auf direkte Visualisierung von Interphase-Chromosomen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen legen hingegen nahe, dass der Großteil der DNA in der Perlenketten-Struktur vorliegt und dass es lediglich unterschiedlich kompakte Regionen in dieser Struktur gibt (B). Das Chromonema Modell (C) beruht auf einer Kombination von licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen und beschreibt die partielle Spiralisierung der Chromosomen. In diesem Modell gibt es eine Struktur mit einem Durchmesser von 100 nm, in der verschiedene Unterstrukturen mit Durchmessern von 10 – 30 nm vorkommen. Ein weiteres Modell geht wiederum von einer Kombination der 10 nm und der 30-nm-Struktur aus; die Bildung der Schleifen kommt in diesem Modell durch verschiedenste regulatorische Elemente auf der DNA zustande (D). Außerdem wäre eine

Kombination aus Modell C und D denkbar, bei dem Interaktionen durch topologische Besonderheiten entstehen, die DNA jedoch trotzdem in unterschiedlich kondensierten Zuständen vorliegt (E) [12].

Alle vorgestellten Modelle haben jedoch gemeinsam, dass sich DNA-Regionen, die aktiv transkribiert (Euchromatin) werden, von stillgelegten Regionen (Heterochromatin) durch kovalente Modifikationen unterscheiden. Hierbei sind vor allem die Methylierung der DNA, sowie die posttranslationale Modifikation der Histonproteine von besonderer Bedeutung [13].

1.3. Posttranslationale Modifikation

Es sind mehr als 30 Positionen im Nukleosom bekannt, an denen posttranslationale Modifikationen (PTMs) auftreten können. Das Spektrum der PTMs umfasst Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung [13]. Es handelt sich hierbei um reversible Modifikationen, die entweder einen direkten Einfluss auf die Kompaktierung der DNA haben oder als Bindestelle für andere regulatorische Faktoren dienen. Diese Faktoren können wiederum auf unterschiedlichste Weise einen Einfluss auf die Transkription ausüben [14]. Die Theorie des Histoncodes besagt, dass man auf Grundlage der PTMs den transkriptionalen Zustand der verschiedenen DNA-Regionen vorhersagen kann [15]. Hierfür ist es wichtig zu verstehen wie PTMs zustande kommen, wie und warum sie verändert werden können und vor allem welchen Einfluss sie auf die Transkription sowie den Zustand der DNA haben. Die verschiedenen PTMs können hierbei je nach Kombination synergistische oder antagonistische Effekte hervorrufen, wodurch eine pauschale Kategorisierung in „aktivierend“ und „hemmend“ erschwert wird [16].

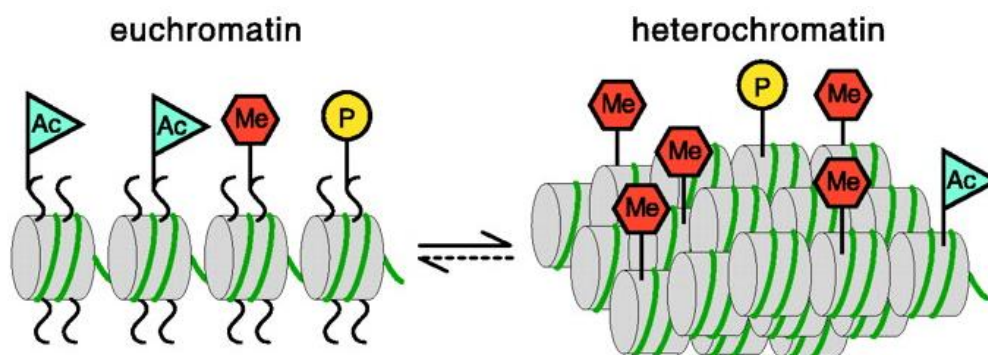


Abbildung 6: Beispielhafte, schematische Darstellung von möglichen PTM-Kombinationen im Euchromatin(links) und im Heterochromatin (rechts). Abbildung übernommen aus [16].

Um das hochgradig komplexe System der Regulation der Transkription zu verstehen, muss zuerst der generelle Öffnungsmechanismus der Nucleosomen im Detail analysiert und

verstanden werden. Mit geeigneten Systemen kann anschließend der Einfluss einzelner Modifikationen, Mutationen und anderer Faktoren auf diesen zentralen Mechanismus überprüft werden.

1.4. Öffnungsmechanismus des Nukleosoms

Da der Zustand der Nukleosomen *in vivo* von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, bieten sich zur Analyse des zentralen Öffnungsmechanismus *in vitro* Experimente an rekonstituierten Mononukleosomen an. Die hierfür verwendeten rekombinanten Histonproteine weisen keine posttranslationalen Modifikationen auf und stellen somit den simpelsten Zustand dar. Außerdem stellen *in vitro* rekonstituierte Nukleosomen unter subphysiologischen NaCl-Bedingungen einen eingefrorenen Gleichgewichtszustand dar, in dem die Nukleosomen stabil vorliegen [3]. Die Öffnung des Nukleosoms kann dann durch Erhöhung der Salzkonzentration von 5 mM auf über 1,2 M NaCl erreicht werden [17]. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleosomen, welche an bestimmten Stellen in unterschiedlichen Kombinationen markiert wurden (Abbildung 7), kann der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren über FRET (siehe 2.2) nachverfolgt werden [18].

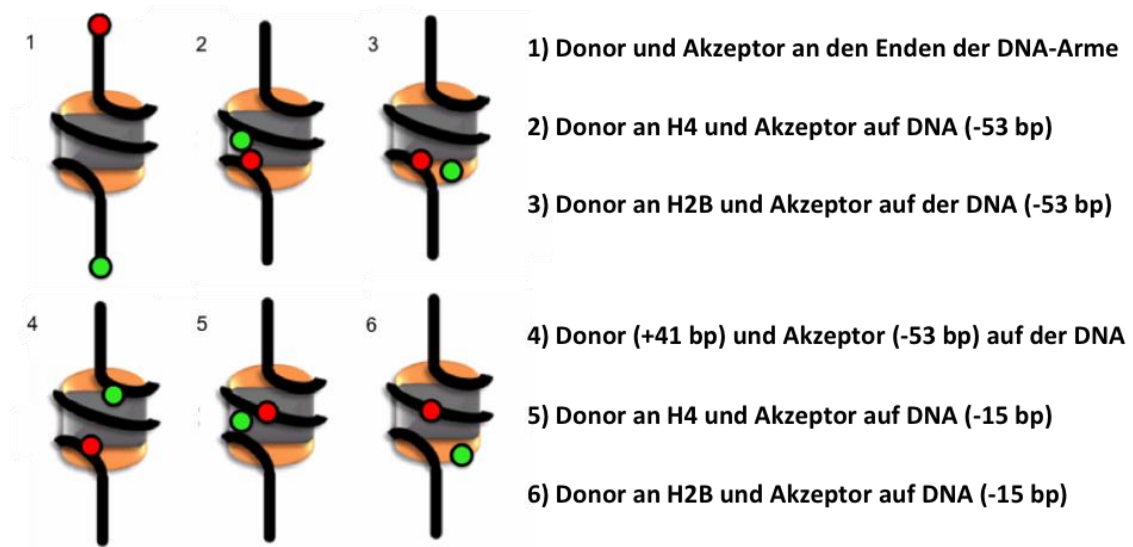


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen, fluoreszenzmarkierten Nukleosomenkonstrukte zur Bestimmung des Öffnungsmechanismus; Gelb: (H2A-H2B)-Dimer, Grau: (H3-H4)₂-Tetramer, Grün: Donor (Alexa488), Rot: Akzeptor (Alexa594), Schwarz: DNA. Abbildung angelehnt an [18].

Mit Hilfe dieser Nukleosomenkonstrukte konnte gezeigt werden, dass während der Öffnung des Nukleosoms ein zuvor unbekannter Zwischenzustand auftritt (Vgl. Abbildung 8, [19]). Die hierfür durchgeführten Messungen zeigten deutlich, dass sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor während des salzinduzierten Öffnens zuerst in Konstrukt Nummer 6 verändert. Bei diesem Konstrukt ist das (H2A-H2B)-Dimer mit dem Donor und die DNA an

der Dyadenachse mit dem Akzeptor markiert. Die Vergrößerung dieses Abstands legt nahe, dass sich die Grenzfläche von (H2A-H2B)-Dimer und (H3-H4)₂-Tetramer öffnet und das Nukleosom in einem Zustand vorliegt, bei dem die (H2A-H2B)-Dimere weiterhin mit der DNA interagieren [19]. Es wurde postuliert, dass unter physiologischen Bedingungen 0,2 – 3,0 % der Nukleosomen in diesem „Butterfly“-Zustand vorliegen könnten. Durch weitere Erhöhung der Salzkonzentration ändert sich anschließend der Abstand der Fluorophore im Nukleosomenkonstrukt Nummer 3. Dies spricht dafür, dass die Dimere im Anschluss an die Öffnung der Grenzfläche von (H2A-H2B)-Dimer und (H3-H4)₂-Tetramer von der DNA dissoziieren, die DNA jedoch weiterhin mit dem (H3-H4)₂-Tetramer interagiert. Der Abstand von Konstrukt Nummer 5 (Donor am (H3-H4)₂-Tetramer und Akzeptor an der Dyadenachse) verändert sich erst bei noch höheren Salzkonzentrationen, weshalb die Dissoziation der DNA vom Tetramer den letzten Schritt der Nukleosomenöffnung darstellt [19].

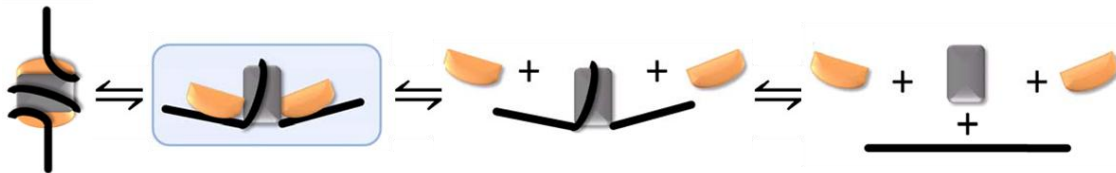


Abbildung 8: Modell für den Öffnungsmechanismus von Mononukleosomen Dissoziation der Histonproteine über zuvor unbekanntem „Butterfly“-Zwischenschritt (blau unterlegt). Alle Histone interagieren mit der DNA, lediglich die Bindung zwischen (H2A-H2B)-Dimer und (H3-H4)₂-Tetramer ist bereits geschwächt. Dimere dissoziieren im nächsten Schritt, während das-Tetramer weiterhin mit der DNA interagiert. Abbildung angelehnt an [19].

Höchstwahrscheinlich erfolgt die Nukleosomenöffnung jedoch nicht symmetrisch, wie in Abbildung 8 dargestellt. Neueste Studien haben gezeigt, dass es eine Asymmetrie im Abwickeln der hier betrachteten Mononukleosomen gibt, die auf die Asymmetrie der zugrundeliegenden DNA zurückzuführen ist [20]. Dies führt zu unterschiedlichen Stabilitäten der beiden (H2A-H2B)-Dimere und bedingt daher ein stufenweises Abdissoziieren (Gansen et al., voraussichtlich 2016).

1.5. Relevanz der N-terminalen Enden der Histone

Die flexiblen, unstrukturierten Enden der Histone umfassen ungefähr 28 % der Histonsequenzen und ragen aus dem Histonoktamer hervor [21][22]. Sie enthalten viele basischen Aminosäuren, wie Arginin und Lysin, und sind dadurch von besonderer Bedeutung für posttranslationale Modifikationen [23]. Die H3-Histonschwänze werden außerdem *in vivo* unter bestimmten Bedingungen auch gezielt über diverse Enzyme abgeschnitten [24][25][26].

Um die Relevanz der Histonschwänze zu analysieren, wurden Studien mit Histonproteinen durchgeführt, bei denen auf unterschiedliche Weise die Histonschwänze entfernt wurden. So wurde in Hefe-Zellen gezeigt, dass das Entfernen einzelner bzw. verschiedener Kombinationen der Histonschwänze einen dramatischen Einfluss auf die Kompaktierung des Chromatins bis hin zum Zelltod hat [27]. Aus *in vitro* Studien geht wiederum hervor, dass das Entfernen des Histonschwanzes (Aminosäure 1 – 27) zur Destabilisierung des gesamten Nukleosoms führt [28]. In einem Dimer-Austauschexperiment, bei dem akzeptormarkierte Dimere zu donormarkierten Nukleosomen gegeben werden, konnte in Nukleosomen ohne H3-Histonschwanz ein Anstieg der Austauschrate von 6 % auf 19 % ermittelt werden [29]. Dies bedeutet, dass durch die Entfernung des H3-Histonschwanzes die Interaktion zwischen den (H2A-H2B)-Dimeren und dem (H3-H4)₂-Tetramer an deren Grenzfläche geschwächt wird und somit die (H2A-H2B)-Dimere leichter dissoziieren.

1.6. Molekulardynamik-Simulationen von Nukleosomen

Um zu verstehen, was auf molekularer Ebene durch die Entfernung des H3-Histonschwanzes im Nukleosom geschieht, wurden Molekulardynamik-Simulationen von Wildtyp-Nukleosomen und Nukleosomen mit entferntem H3-Histonschwanz miteinander verglichen. Als Anfangsstruktur wurde die Kristallstruktur (PDB: 1KX5) mit einer Auflösung von 1,9 Å (Abbildung 1, [30]) verwendet. Für die Simulationen wurden die ersten 26 Aminosäuren von H3 entfernt und anschließend die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square deviation* – RMSD) der Positionen der einzelnen Atome mit denen der Wildtyp-Simulationen verglichen [31].

$$\chi = \frac{\text{RMSD (Entfernter Histonschwanz)}}{\text{RMSD (Wildtyp Nukleosom)}}$$

Eine Destabilisierung einer Histondomäne wird durch $\chi > 1$ angezeigt. Die Analyse der einzelnen-Domänen des Nukleosoms ergeben, dass in Simulationen mit entfernten H3-Histonschwänzen eine der Kopien von H2A eine größere Abweichung / Destabilisierung aufweist ($\chi > 1$). Besonders interessant ist hierbei das Verhalten der $\alpha 3$ -Domäne bzw. der darin vorkommenden Arginine des betroffenen H2A. Durch das Abschneiden des H3-Histonschwanzes werden basische Aminosäure entfernt, die im Wildtyp-Nukleosom mit der DNA interagieren. Die Folge ist eine veränderte elektrostatische Umgebung (Abbildung 9) in der die negativ geladene DNA für die Interaktion mit den positiv geladenen Argininen der $\alpha 3$ -Domäne von H2A zugänglich wird [31].

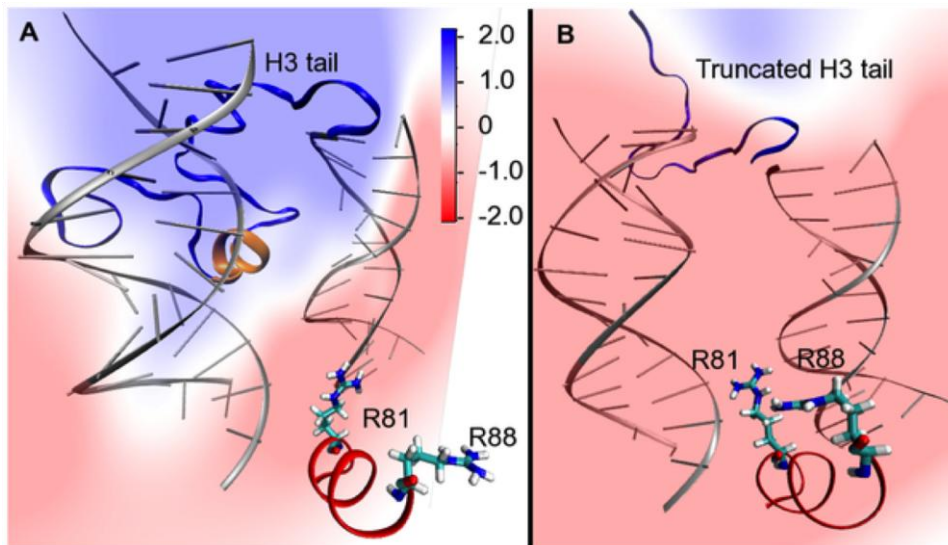


Abbildung 9: Schematische Darstellung der elektrostatischen Umgebung im Inneren des Wildtyp-Nukleosoms (A) und in Nukleosomen mit entferntem H3-Histonschwanz (B); Farbskala in Volt; Wildtyp-Nukleosom: Aminosäuren Arg81 und Arg88 zum Inneren des Nukleosoms hin ausgerichtet; Nukleosomen mit entferntem H3-Histonschwanz: Arg81 und Arg88 zeigen in Richtung der DNA. Abbildung übernommen aus [31].

Vor allem die Arginine an Position 81 und 88 von H2A scheinen durch die veränderte elektrostatische Umgebung beeinflusst zu werden. Im intakten Wildtyp-Nukleosom weisen diese beiden Aminosäuren ins Innere des Nukleosoms und interagieren dort mit anderen Aminosäuren. Durch das Abschneiden der H3-Histonschwänze ändert sich sowohl die Ausrichtung dieser Aminosäuren als auch deren Interaktionspartner [31]. Zum einen wird dadurch die Interaktion von Arg81 mit H3 zerstört. Zum anderen wird durch die neu entstehende Wechselwirkung von Arg88 mit den Aminosäuren Glu105 und Gln112 die zuvor bestehende Interaktion mit Ile51 und Gln55 aufgelöst [31]. Da beide Veränderungen in den Simulationen zu einer Destabilisierung der Grenzfläche von (H2A-H2B)-Dimer und (H3-H4)₂-Tetramer führen, könnte dies eine mögliche Erklärung für den beobachteten Anstieg der Dimeraustauschrate in Nukleosomen mit entferntem H3-Histonschwanz darstellen [29].

1.7. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Aspekten der Dynamik von Nukleosomen und deren Untersuchung mit Hilfe von Einzelmolekülmessungen. Zum einen soll der Einfluss der elektrostatischen Umgebung im Bereich der $\alpha 3$ -Domäne des Histonproteins H2A auf die Stabilität der Nukleosomen untersucht werden. Hierfür wurden zwei Paare von je drei unterschiedlichen H2A Mutanten hergestellt. Das erste Paar besitzt einen Aminosäureaustausch von Arginin (Arg, R) zu Alanin (Ala, A), was eine Ladungsänderung von positiv zu neutral mit sich bringt. Der Austausch erfolgte sowohl an Position 81 als auch an Position 88 in der Proteinsequenz (Vergleich Abbildung 10). Im zweiten Schritt wurde an diesen Positionen Arginin (Arg, R) gegen Glutaminsäure (Glu, E), und somit die positive Ladung gegen eine negative Ladung ausgetauscht. Tabelle 1 stellt eine Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten H2A-Mutanten dar.

Tabelle 1: Bezeichnung der hergestellten H2A-Mutanten.

	Arg81	Arg88	Arg81 + Arg88
RA-Mutanten	R81A	R88A	R81AR88A
RE-Mutanten	R81E	R88E	R81ER88E

Damit keine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins im Bereich des Aminosäureaustausches stattfindet, muss berücksichtigt werden, dass laut Kristallstruktur des nativen Nukleosoms [30] beide Arginine Teil einer α -Helix sind (Vergleich Abbildung 10, b). Aus diesem Grund muss für den Aminosäureaustausch nicht nur die Ladung der Aminosäuren berücksichtigt werden sondern auch deren Helixpotential P_{α} . Aminosäuren mit $P_{\alpha} > 1$ werden als Helixbildner, Aminosäuren mit $P_{\alpha} < 1$ als Helixbrecher bezeichnet [32]. Die Helixpotentiale der für diese Arbeit relevanten Aminosäuren ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Helixpotentiale der relevanten Aminosäuren

Aminosäure	Helixpotential
Arg	1,21
Ala	1,41
Gln	1,27

Da es sich bei allen Aminosäuren um Helixbildner handelt, sollte die Sekundärstruktur des Proteins durch den eingeführten Aminosäureaustausch nicht beeinflusst worden sein. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Lage und das Umfeld der mutierten Positionen.

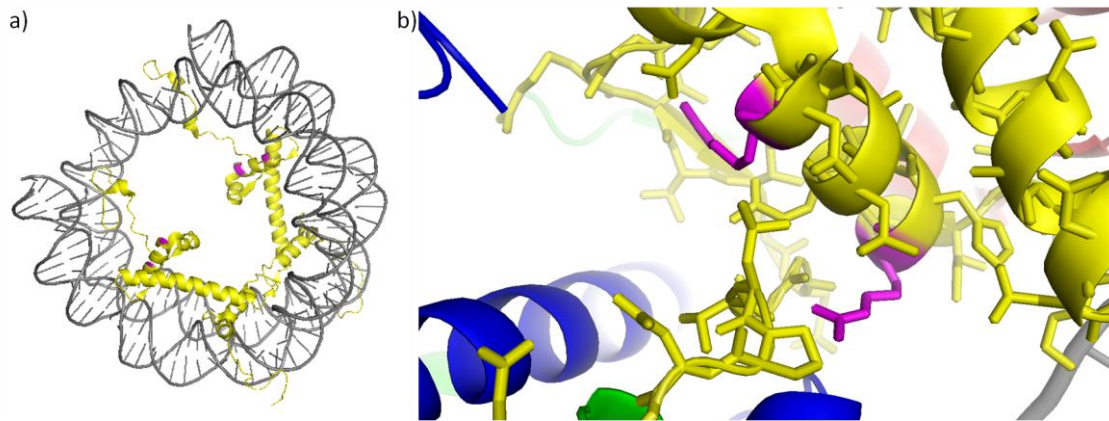


Abbildung 10: Position der H2A-Mutationen im Bezug zur DNA (a) und bezüglich des H2A-Proteins.
 Grau: DNA; Gelb: H2A; Magenta: Mutierte Position in H2A; Blau: H3. Abbildung basiert auf PDB 1KX5 [80].

Für alle vorgestellten Mutanten wurde der Einfluss der Mutation auf die Stabilität und auf den Öffnungsmechanismus analysiert. Hierfür wurden Messungen im Molekülensemble und Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Für die Stabilitätsmessungen wurden fluoreszenzmarkierte Nucleosomen verwendet, bei denen beide Fluorophore im internen Bereich der DNA positioniert waren (Konstrukt 4, Abbildung 7). Dieses Nucleosomenkonstrukt eignet sich besonders gut zur Bestimmung der Stabilität, da hierdurch das Öffnungsverhalten der DNA nachverfolgt werden kann. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Mutationen auf die einzelnen Schritte des Öffnungsmechanismus untersucht. Hierbei wurde sowohl die Distanz zwischen dem (H2A-H2B)-Dimer und der Dyadenachse (Konstrukt 6), als auch zwischen (H2A-H2B)-Dimer und dem internen Bereich, in der Nähe des Dimer-Bindungsregion, der DNA (Konstrukt 3) gemessen. Es sollte hierdurch überprüft werden, ob durch Veränderungen der elektrostatischen Umgebung im Inneren des Nucleosoms ähnliche, destabilisierende Effekte verursacht werden können, wie durch die Entfernung des H3-Histonschwanzes. Das Auftreten solcher Effekte würde die auf Basis von Molekulardynamik-Simulationen aufgestellte Theorie untermauern, dass durch die Entfernung des H3-Histonschwanzes Ladungsänderungen im Inneren des Nucleosoms entstehen, die die Dimer:Tetramer-Interaktion schwächen und dadurch zur Destabilisierung des gesamten Nucleosoms beitragen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Dynamik der H3-Histonschwänze im Wildtyp-Nucleosom. Hierfür wurden H3-Mutanten verwendet, die Mutationen im H3-Histonschwanz aufweisen (Prof. Jennifer Nyvorg, Colorado State University), welche eine direkte Markierung durch ein Alexa488-Maleimid ermöglichen. Bei den mutierten Aminosäuren handelt es sich um Lysine (Lys, K) an Position 4 und an Position 9, welche durch Cysteine (Cys, C) ersetzt wurden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete H3-Mutanten

	Lys4	Lys9
Lys -> Cys	K4C	K9C

Für die Analyse der Histonschwanz-Dynamik wurden unterschiedliche Stellen auf der DNA mit dem Akzeptorfluorophor Alexa594 markiert. Die Auswahl der Position erfolgte auf Grundlage von zuvor durchgeführten Molekulardynamik-Simulationen. Es wurde eine Position am Ende und zwei sich gegenüberliegende Positionen der inneren Windung der DNA markiert. Mit Hilfe dieser Konstrukte sollen essentielle Fragen bezüglich der Dynamik der H3-Histonschwänze beantwortet werden. Zum einen können die Konstrukte verwendet werden, um eine Art Karte der Histonschwanz-Interaktionen zu erstellen. Durch die Markierung verschiedener Stellen kann die Distanz zwischen diesen Stellen und dem Histonschwanz gemessen werden. Durch die Markierung von zwei verschiedenen Stellen (K4 und K9) können außerdem Dynamiken innerhalb des Histonschwanzes analysiert werden. Zum anderen kann die Stabilität dieser Wechselwirkungen mit Hilfe der salzinduzierten Öffnung des Nukleosoms untersucht werden. Bisher gibt es keine Informationen darüber, wie sich der H3-Histonschwanz während der Öffnung des Nukleosoms verhält und ob sich während dieses Prozesses vorhandene Interaktionen verändern. Durch die Auswahl geeigneter fluoreszenzmarkierter Nukleosomenkonstrukte soll in dieser Arbeit die Dynamik des H3-Histonschwanzes des Wildtyp-Nukleosoms charakterisiert werden. Nach erfolgreicher Pilotstudie können diese Konstrukte dann verwendet werden, um zum Beispiel den Einfluss verschiedener Modifikationen, Mutationen oder Histonvarianten auf die Dynamik des H3-Histonschwanzes zu charakterisieren.

2. Theorie

2.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz beschreibt einen Prozess, bei dem ein Molekül durch die Absorption eines Photons auf ein energetisch höheres Niveau gebracht wird und anschließend unter Abgabe eines Photons wieder in seinen Grundzustand relaxiert. Die hierfür relevanten Zustände werden als Singulettzustände bezeichnet und in S_0 , S_1 , S_2 , etc. unterteilt (Abbildung 11).

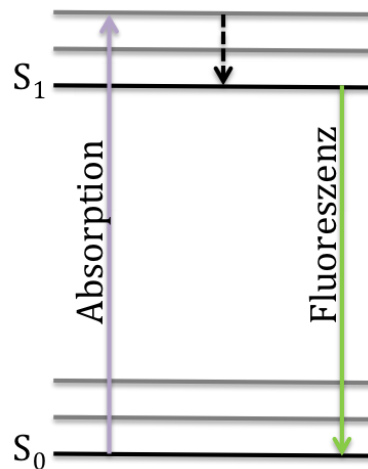


Abbildung 11: Jablonski Diagramm; mögliche Zustände, die ein Elektron nach der Absorption eines Photons einnehmen kann, sowie die möglichen Übergänge zwischen den Zuständen; blau: Absorption; lila: Absorption; grün: Fluoreszenz; Dicke, schwarze Linien: elektronische Zustände; Graue Linien: Schwingungszustände. Abbildung angelehnt an [33].

Nach Absorption eines Photons gelangt das Molekül in einen der Schwingungszustände eines energetisch höheren Niveaus, aus dem es durch thermische Schwingungsrelaxation/innere Umwandlung in den Schwingungsgrundzustand S_1 relaxiert. Unter Abgabe eines Photons kann ein Molekül anschließend aus dem S_1 -Zustand wieder in den S_0 -Zustand gelangen. Der Rückfall erfolgt innerhalb von 10^{-9} s bis 10^{-5} s und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Da es bei der Schwingungsrelaxation durch Wärmestrahlung zu Energieverlust kommt, weist das emittierte Photon eine geringere Energie als das zuvor absorbierte Photon auf. Die daraus resultierende Verschiebung des Emissionsspektrums zu längeren Wellenlängen wird als [33]. Um Fluorophore für biologische Anwendungen nutzen zu können, müssen neben den Anregungs- und Emissionsspektren auch die Lebensdauer und die Quantenausbeute der Fluorophore bestimmt werden. Bei der Lebensdauer eines Fluorophors handelt es sich um die mittlere Zeit, die vergeht bis das Molekül nach Absorption in den Grundzustand zurückfällt. Die Quantenausbeute ϕ beschreibt den Wirkungsgrad der Fluoreszenz über das Verhältnis von absorbierten N_{abs} zu emittierten Photonen N_{em} (Formel 1) [33].

$$\phi_F = \frac{N_{em}}{N_{abs}}$$

Formel 1

2.2. Förster-Resonanzenergietransfer - FRET

Der Förster-Resonanzenergietransfer beschreibt den strahlungsfreien Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden [33]. Der Energieübertrag zwischen den beiden als Donor und als Akzeptor bezeichneten Fluorophoren erfolgt direkt durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, unter der Voraussetzung, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt [33]. Die Effizienz E_{FRET} dieses Prozesses (Formel 2) hängt direkt mit der Distanz r zwischen den beiden Fluorophoren sowie mit deren Försterradius R_0 zusammen, wodurch die präzise Bestimmung von Distanzen zwischen 2 nm und 10 nm ermöglicht wird [34].

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Formel 2

Dabei bezeichnet R_0 einen für das jeweilige FRET-Paar spezifischen Abstand, bei dem die FRET-Effizienz exakt 50 % entspricht (Abbildung 12). Trägt man die FRET-Effizienz gegen den Abstand zwischen den beiden Fluorophoren auf entspricht der Wendepunkt der resultierenden Kurve dem Försterradius R_0 .

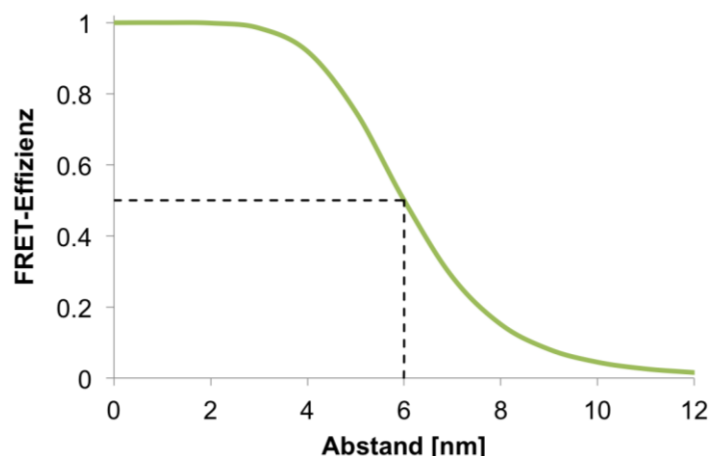


Abbildung 12: Schematischer Verlauf der FRET-Effizienz in Abhängigkeit von der Distanz zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor. Grün: FRET-Effizienz, gestrichelte, schwarze Linie: Wendepunkt der Kurve bzw. Försterradius.

Der Försterradius hängt wiederum vom Überlappungsintegral J (Formel 4), vom Orientierungsfaktor κ^2 , der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des

Akzeptors ϕ_D^0 , sowie dem Brechungsindex des Mediums n ab. Die Berechnung des Försterradius erfolgt nach Formel 3 [35]:

$$R_0 = \text{const.} \sqrt[6]{\left(\frac{\kappa^2 \phi_D^0 J}{n^4}\right)}$$

Formel 3

Mit

$$J = \int_{\lambda} I_{\lambda}^D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Formel 4

J	Überlappungsintegral
$I_{\lambda}^D(\lambda)$	Normalisierte Emissionsintensität des Donors
$\varepsilon_A(\lambda)$	Extinktionskoeffizient des Akzeptors
λ	Wellenlänge
R_0	Försterradius
κ^2	Orientierungsfaktor der Fluoreszenzquantenausbeute
ϕ_D^0	Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
n	Brechungsindex des Mediums

Da die Distanz in der FRET auftritt (2 nm - 10 nm) der typischen Größe vieler Makromoleküle entspricht, lässt sich dieser Effekt für biologische Anwendungen verwenden. Durch die Auswahl geeigneter FRET-Paare lassen sich sowohl Konformationsänderungen in Makromolekülen, als auch Assemblierung und Zerfall von Molekülkomplexen qualitativ und quantitativ analysieren [36]. Dies wird im Kapitel 3.8 genauer betrachtet.

2.3. Anisotropie

Eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Berechnung des Farbstoffabstands aus der experimentell bestimmten FRET-Effizienz ist die Kenntnis des Orientierungsfaktors κ^2 der Fluorophore. In den meisten Fällen wird für die Berechnung eine freie Beweglichkeit ($\kappa^2 = \frac{2}{3}$) angenommen. Da diese mittels chemischer Reaktionen kovalent über Linker an die entfaltenen Proteine gebunden werden, muss deren Beweglichkeit nach der Rückfaltung des Proteins überprüft werden. Befinden sich zwei nicht frei bewegliche Fluorophore in einer für FRET geeigneten Distanz, muss deren κ^2 für eine korrekte Berechnung der FRET-Effizienz berücksichtigt werden. Ansonsten kann die FRET-Effizienz sowohl über als auch unterschätzt werden [37].

Für die Bestimmung der Beweglichkeit der Fluorophore bietet sich die Messung der Anisotropie an. Dazu werden Fluorophore mit polarisiertem Licht angeregt und anschließend die Polarisation des emittierten Lichts bestimmt. Da diese von der

Orientierung des Dipolmoments des Fluorophors abhängt, kann sich die Polarisierung des emittierten Lichts ändern, wenn sich das Dipolmoment des Fluorophors während der Lebenszeit des angeregten Zustands ändert. Für kleine, frei bewegliche Moleküle in Lösungen mit niedriger Viskosität ist die Rotationsdiffusionszeit θ (Formel 5) schneller als die Fluoreszenzlebensdauer τ , wodurch das emittierte Licht depolarisiert ist und die Anisotropie (Formel 6) näherungsweise 0 beträgt [33].

$$\theta = \frac{\eta \times V}{k_B T}$$

Formel 5

θ Rotationsdiffusionszeit
 η Viskosität des Mediums
 V Volumen des rotierenden Moleküls
 k_B Boltzmann Konstante
 T Temperatur

$$r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\theta}\right)}$$

Formel 6

r Anisotropie
 r_0 Fundamentale Anisotropie (maximal möglicher Wert)
 τ Fluoreszenzlebensdauer
 θ Rotationsdiffusionszeit

2.4. Einzelmolekül-FRET

Die FRET-Analyse von fluoreszenzmarkierten Proben kann in zwei verschiedene Herangehensweisen unterteilt werden. Zum einen kann die durchschnittliche FRET-Effizienz der gesamten Probe betrachtet werden. Dies geschieht im Molekülensemble. Bei diesen Messungen können schnell Veränderungen der FRET-Effizienz im Bezug auf die Gesamtpopulation der betrachteten Probe detektiert werden. Allerdings können so keine Informationen bezüglich des Auftretens und der Verteilung potentieller Subpopulationen mit unterschiedlichen FRET-Effizienzen erhalten werden. Hierfür müssen Einzelmolekülmessungen durchgeführt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode spFRET (*single particle FRET*, siehe 3.9) wird die Einzelmolekülebene zum einen durch ein sehr kleines Beobachtungsvolumen (1 fl) und zum anderen durch eine sehr niedrige Probenkonzentration (50 pM) gewährleistet. Bei freier Diffusion der zu betrachtenden Teilchen ist somit sichergestellt, dass im Schnitt weniger als ein Teilchen durch das Beobachtungsvolumen diffundiert. Jedes einzelne Teilchen führt während der

Diffusion zu einem „Ausbruch“ an detektierten Photonen, was als *Burst* bezeichnet wird. Für jeden einzelnen *Burst* kann anschließend die FRET-Effizienz unter Berücksichtigung der Detektionseffizienz γ errechnet werden [38]. Die relativen Häufigkeiten der so bestimmten FRET-Werte können in einem Histogramm dargestellt werden, um mögliche Unterzustände im Ensemble aufzutrennen (Abbildung 13, links).

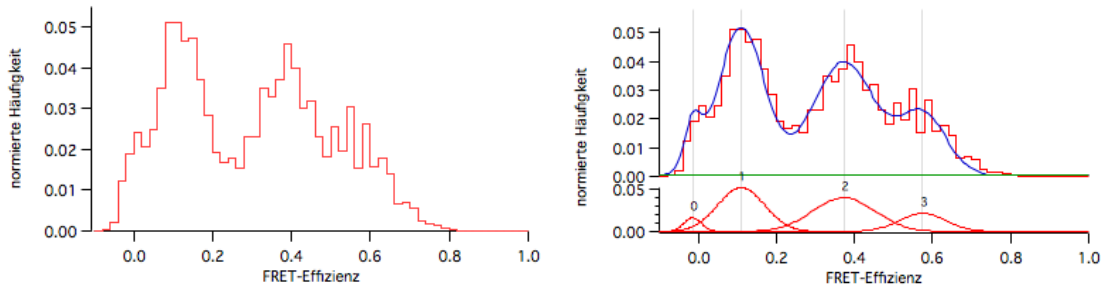


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung eines normierten FRET-Histogramms einer spFRET-Messung. FRET-Histogramm mit unterschiedlichen, gut abgrenzbaren Subpopulationen (links), sowie die Charakterisierung dieser Subpopulationen mit einzelnen Gaußfunktionen (rechts).

Die FRET-Histogramme geben somit Auskunft über die Heterogenität einer Probe, welche sich über einen Multigaussfit in verschiedene Subpopulationen unterteilen lässt. Die Berechnung der FRET-Effizienz erfolgt nach Formel 7 unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors γ (Formel 8).

$$E_{FRET} = \frac{N_A}{N_A + \gamma N_D}$$

Formel 7

$$\gamma = \frac{\eta_A \times \phi_A}{\eta_D \times \phi_D}$$

Formel 8

E_{FRET}	FRET-Effizienz
N_A	Intensität des Akzeptors
N_D	Intensität des Donors
γ	Korrekturfaktor
η_A	Detektionseffizienz für den Akzeptor
ϕ_A	Quantenausbeute des Akzeptors
η_D	Detektionseffizienz für den Donor
ϕ_D	Quantenausbeute des Donors

Die resultierenden FRET-Histogramme können anschließend für die nähere Betrachtung auf verschiedene Weisen in vorhandene Subpopulationen unterteilt werden. Im einfachsten Fall können starre Grenzen im Bezug auf die FRET-Effizienz gesetzt werden. Dieses bietet sich an, wenn z.B. zwei Subpopulationen mit definierten FRET-Effizienzen bezüglich ihrer

Verteilung innerhalb der Gesamtpopulation analysiert werden sollen. Für komplexere Systeme mit vielen verschiedenen Subpopulationen, welche dynamische Verschiebungen der jeweiligen FRET-Effizienz aufweisen, stellt die Beschreibung der Verteilung über einzelne Gaußfunktionen (Abbildung 13, rechts) eine wesentlich genauere Betrachtungsweise dar [38][39]. Diese Methode eignet sich besonders gut, um *in situ*-Konformationsänderungen von Proteinen und Proteinkomplexen unter verschiedenen Bedingungen, z.B. Pufferkonditionen, zu analysieren.

Solange gewährleistet werden kann, dass eine 1:1-Stöchiometrie der Fluorophore vorliegt, welche durch strukturelle Veränderungen des Makromoleküls unbeeinflusst ist, reicht die Betrachtung der FRET-Effizienz für die Analyse der Probe aus. Dies ist in dieser Arbeit bei DNA-markierten Nukleosomen der Fall, da jedes Mononukleosom lediglich eine doppelmarkierte DNA enthält. Die Markierungseffizienz der DNA wird vor der Rekonstitution der Nukleosomen analysiert und nur DNA-Sequenzen mit einer 1:1-Stöchiometrie von Donor zu Akzeptor verwendet. Anders verhält es sich, wenn eines der Histonproteine markiert werden soll. Da je zwei Kopien der Histonproteine im Nukleosom vorliegen, ergeben sich für 100% markierte Histonproteine zwei Szenarien:

- 1) 2:1 Stöchiometrie: Soll der Abstand zwischen einem Histonprotein und einer bestimmten Stelle auf der DNA analysiert werden, so enthält das zu betrachtende Nukleosom zwei histongebundene Donorfluorophore und einen DNA-gebundenen Akzeptorfluorophor.
- 2) 2:2 Stöchiometrie: Soll der Abstand zwischen zwei verschiedenen Histonproteinen analysiert werden, so enthält das zu betrachtende Nukleosom zwei histongebundene Donorfluorophore und zwei histongebundene Akzeptorfluorophore.

Außerdem kann sich die Stöchiometrie der Probe während der Öffnung der Nukleosomen ändern sobald die markierten Untereinheiten disassemblieren.

Bei der Betrachtung von zwei Molekülen M_1 und M_2 , die jeweils entweder mit einem Donor M_1^D oder einem Akzeptor M_2^A markiert wurden, können die in Tabelle 4 aufgeführten Spezies auftreten. Diese Spezies können in spFRET-Messungen mit Einfarbenanregung fehlinterpretiert bzw. nicht detektiert werden [40].

Tabelle 4: Für spFRET-Messungen mit Einfarbenanregung ungeeignete Proben.

Probe	Beschreibung	Detektion
$M_1^D, M_1^D M_2$	Akzeptor ist inaktiv oder nicht vorhanden	$E_{FRET} = 0$
$(M_1^D)_2 M_2^A$	Interaktion von 2 M_1^D mit 1 M_2^A	$0 < E_{FRET} < 1$
$M_2^D (M_1^A)_2$	Interaktion von 1 M_1^D mit 2 M_2^A	$0 < E_{FRET} < 1$
$M_1 M_2^A, M_2^A$	Akzeptor-markiertes Molekül diffundiert frei in Lösung nach Dissoziation	Keine Detektion möglich

Da bei einer 2:1 bzw. 1:2 Stöchiometrie die FRET-Effizienz durch eine erhöhte Anregungswahrscheinlichkeit bzw. einen veränderten Försterradius verfälscht wird [41], empfiehlt es sich für die beschriebenen Szenarien ebenfalls die Stöchiometrie der Probe zu detektieren. Dafür reicht es aus, das für spFRET mit Einfarbenanregung verwendete Setup, um einen Laser zu erweitern, welcher den Akzeptorfluorophor anregen kann. Diese spFRET-Variante mit alternierender Zweifarbenanregung wird als ALEX (*alternating laser excitation*) bezeichnet.

2.5. spFRET mit alternierender Zweifarbenanregung - ALEX

Für ALEX-Messungen werden im Gegensatz zu spFRET-Messungen mit Einfarbenanregung zwei alternierend geschaltete Laser für die separate Anregung verwendet. Ein Laser wird für die Anregung des Donors (im Weiteren als Donorlaser bezeichnet) und ein weiterer für die Anregung des Akzeptors (Akzeptorlaser) benötigt. Hierdurch kann für alle frei in Lösung diffundierenden Teilchen die Emission von Donor und Akzeptor in den verschiedenen Anregungsperioden detektiert werden (Abbildung 14).

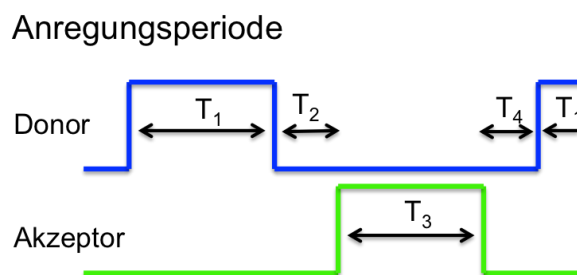


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer alternierenden ALEX-Anregungsperiode. Der Donorlaser ist in Blau, der Akzeptorlaser in Grün dargestellt. T_1 bezeichnet die Donoranregungsphase, T_2 und T_4 die Pausen zwischen den Anregungen und T_3 Akzeptoranregungsphase.

Während einer ALEX-Anregungsperiode wird zuerst durch Einschalten des Donorlasers der Donorfluorophor angeregt. Dieser emittiert pro Anregungszyklus entweder selbst (Formel 10) oder überträgt die aufgenommene Energie strahlungsfrei an einen Akzeptorfluorophor, falls deren Distanz einen solchen Übertrag erlaubt (Formel 11). Hieraus lässt sich wie bei spFRET die distanzabhängige FRET-Effizienz bestimmen [40]:

$$E_{FRET} = \frac{F_{Dex}^{Aem}}{(F_{Dex}^{Aem} + \gamma F_{Dex}^{Dem})}$$

Formel 9

mit

$$F_{Dex}^{Dem} = \sum_{i=i_0}^{i_0+n-1} (f_{Dex}^{Dem})_i$$

Formel 10

und

$$F_{Dex}^{Aem} = \sum_{i=i_0}^{i_0+n-1} (f_{Dex}^{Aem})_i$$

Formel 11

F_{Dex}^{Dem}	Emission des Donors während der Donoranregung (für den ganzen <i>Burst</i>)
f_{Dex}^{Dem}	Um das Hintergrundsignal bereinigte Emission des Donors (pro Intervall)
n	Anzahl an Intervallen eines <i>Bursts</i>
i_0	Intervall, das der Anregungsperiode entspricht
F_{Dex}^{Aem}	Emission des Akzeptors während der Donoranregung (für den ganzen <i>Burst</i>)
f_{Dex}^{Aem}	Um das Hintergrundsignal bereinigte Emission des Akzeptors (pro Intervall)
E_{FRET}	FRET-Effizienz
γ	Korrekturfaktor

An die Donoranregung schließt sich eine kurze Pause an, bevor durch Einschalten des Akzeptorlasers die direkte Anregung des Akzeptorfluorophors (Formel 13) gemessen werden kann. Falls der Donorfluorophor ebenfalls durch den Akzeptorlaser angeregt werden sollte, kann auch die Emission des Donorfluorophors detektiert werden (Formel 14). Die gesamte Anregungsperiode wird durch eine weitere Anregungspause beendet. Die Anregungsperiode ist so gewählt, dass sie mindestens zweimal schneller abläuft als ein Teilchen im Mittel für die Diffusion durch das Fokusvolumen benötigt, Aus den detektierten Emissionen der beiden Anregungen lässt sich die distanzunabhängige Stöchiometrie der Fluorophore berechnen [40]:

$$S = \frac{F_{Dex}^{Aem} + \gamma F_{Dex}^{Dem}}{[(F_{Dex}^{Aem} + \gamma F_{Dex}^{Dem}) + (F_{Aex}^{Aem} + F_{Aex}^{Dem})]}$$

Formel 12

mit

$$F_{Aex}^{Aem} = \sum_{i=i_0}^{i_0+n-1} f_{Aex}^{Aem}$$

Formel 13

und

$$F_{Aex}^{Dem} = \sum_{i=i_0}^{i_0+n-1} f_{Aex}^{Dem}$$

Formel 14

- F_{Aex}^{Aem} Emission des Akzeptors während der Akzeptoranregung
- f_{Aex}^{Aem} Um das Hintergrundsignal bereinigte Emission des Akzeptors
- F_{Aex}^{Dem} Emission des Donors während der Akzeptoranregung
- f_{Aex}^{Dem} Um das Hintergrundsignal bereinigte Emission des Donors
- S Stöchiometrie

Die berechnete FRET-Effizienz und die Stöchiometrie von jedem detektierten *Burst* werden in einem zweidimensionalen Konturplot dargestellt (Abbildung 15).

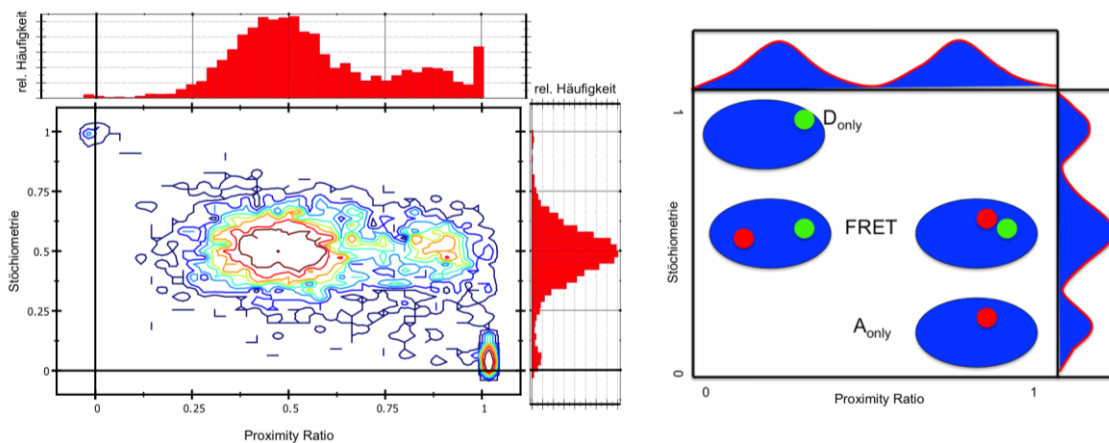


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung eines ALEX-Konturplots (links) und die Interpretation der detektierten Zustände (rechts). Im ALEX-Konturplot ist die Proximity Ratio (P) / FRET-Effizienz (E) gegen die Stöchiometrie (S) aufgetragen. Dadurch wird die Unterscheidung der einzelnen Spezies einer Probe erleichtert. Abbildung angelehnt an [40].

Für die weitere Analyse der detektierten Daten können, wie für spFRET, sowohl feste Grenzen als auch Gaußfits verwendet werden. Eine selektive Betrachtung von doppeltmarkierten Proben/Nukleosomen kann gewährleistet werden, wenn lediglich *Bursts* berücksichtigt werden, deren Stöchiometrie $S > 0,2$ und $S < 0,8$ beträgt.

3. Material

Falls nicht anders vermerkt, wurden Reagenzien der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH verwendet. Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Seralpur PRO, 90-CN, Sera) angesetzt. Puffer und Wasser für spektrochemische Analysen wurden mit Filtern (Anotrop 10, Whatman International Ltd.) einer Porengröße von 0,02 µm gereinigt. Um Adsorptionseffekte und Zerfall der Nukleosomen zu vermeiden wurden silikonbeschichtete Reaktionsgefäße (low-binding Reaktionsgefäß, Biozym Scientific GmbH) und mit Antihalt-Polymeren beschichtete Pipettenspitzen (TipOne RPT, STARLAB GmbH) verwendet.

3.1. DNA-Präparation und Klonierung

3.1.1. Verwendete Präparationskits

Die Präparation der jeweiligen Proben erfolgte nach den Herstellerangaben (Machery-Nagel GmbH & Co) des verwendeten Präparationskits.

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus 1 - 2 %igen Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract II Kit verwendet.

Die Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterien erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid Kit.

3.1.2. Verwendete Primer

Die Herstellung der H2A Histonmutanten erfolgte mittels Overlap-Extension-PCR (siehe 4.1.2) unter Verwendung der folgenden Primer (Firma Sigma).

Tabelle 5: Für die Klonierung der H2A-Mutanten verwendete Primer.

Name	Sequenz 5' – 3'
H2A Nde forward	TATTATCATATGTCAGGAAGAGGCAAACAA
H2A Not I reverse	ATATAGCGGCCGCGTTTACTTGCTCTTGGCCGA
H2A R81A forward	GCAGGTGTGCGGGGATAATGC
H2A R81A reverse	GCATTATCCCCGCACACCTGC
H2A R88A forward	CTCATCGTTGGCCACAGCGAG
H2A R88A reverse	CTCGCTGTGGCCAACGATGAG
H2A R81E forward	GCATTATCCCCGAACACCTGC
H2A R81E reverse	GCAGGTGTTCGGGGATAATGC
H2A R88E forward	CTCGCTGTGGAGAACGATGAG
H2A R88E reverse	CTCATCGTTCTCCACAGCGAG

Für die Subklonierung der H3-Mutanten wurden die Sequenzen erfolgte mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (Tabelle 6) stammen ebenfalls von der Firma Sigma.

Tabelle 6: Für die Subklonierung der H3-Mutanten verwendete Primer.

Name	Sequenz 5' - 3'
H3 Nde forward	TATTATCATATGGCCCGTACCAAGCAGACC
H3 Not I reverse	ATATAGCGGCCGCGTTTAAGCCCTCTCGCCTCG

3.1.3. Verwendeter Vektor

Alle Konstrukte wurden über die Schnittstellen *NdeI* und *NotI* in den pet17b-Vektor (Abbildung 16, Addgene) kloniert.

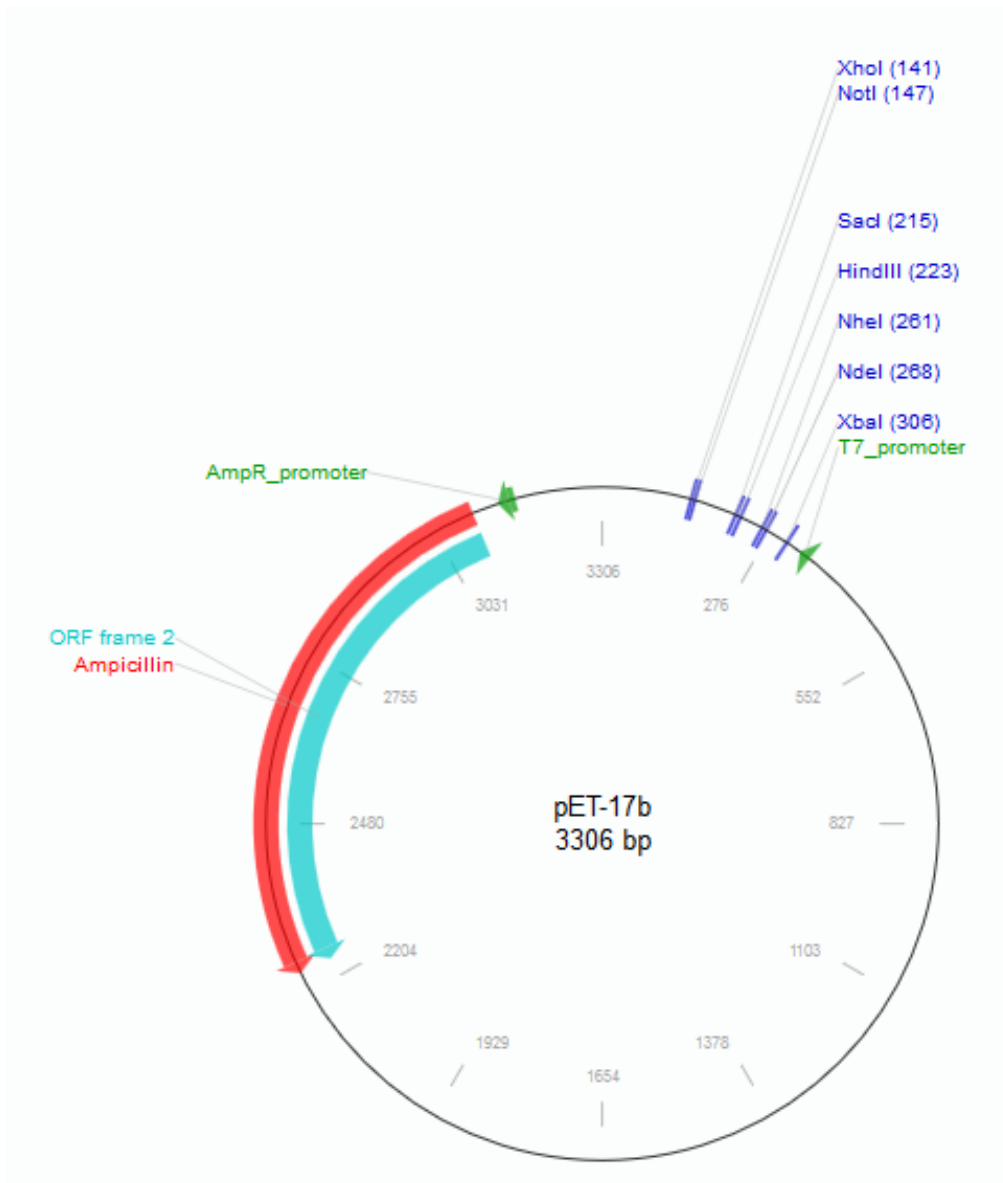


Abbildung 16: Plasmidkarte für Vektor pet17b mit für diese Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen.

3.2. Verwendete Fluorophore

Es wurden Alexa488 und Alexa594 als FRET-Paar verwendet. Die Emissions- und Absorptionsspektren sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Quantenausbeute beträgt $\Phi_D = 0,8$ für Alexa 488 und $\Phi_A = 0,6$ für Alexa 594. Der Försterradius ist $R_0 = 5,56$ nm [17].

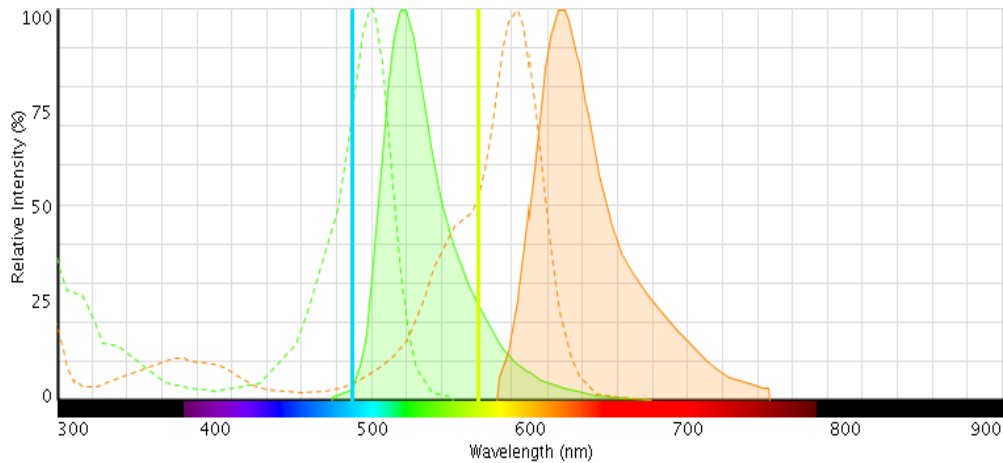


Abbildung 17: Absorptions- (gestrichelte) und Emissionsspektren (eingefärbt) für Alexa488 (grün) und Alexa594 (orange), Anregungswellenlänge des Donorlasers (hellblau) $\lambda = 491$ nm und des Akzeptorlasers (gelb) $\lambda = 561$ nm. Abbildung übernommen aus ThermoFisher – Fluorescence SpectraViewer.

Die Strukturformeln der jeweiligen Maleimide, die für die spezifische Markierung der Histonproteine (siehe Abschnitt 4.7) verwendet wurden, sind in Abbildung 18 dargestellt.

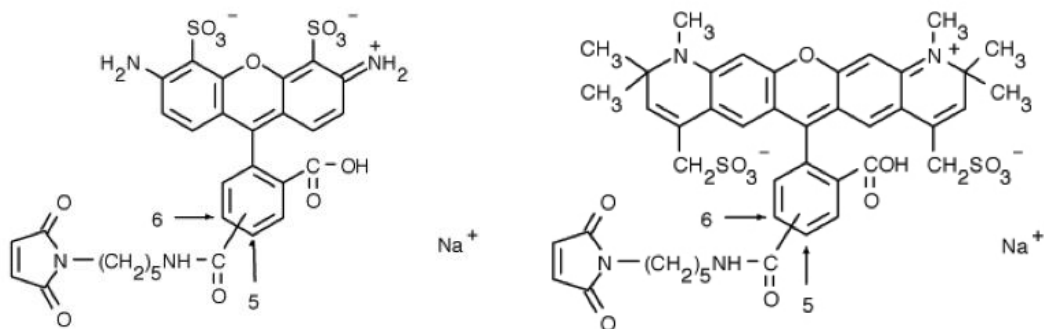


Abbildung 18: Strukturformeln der verwendeten Alexa488- (links) und Alexa594-Maleimide (rechts).

3.2.1. Fluoreszenzmarkierte DNA-Konstrukte

Die verwendete Widom-601 DNA-Sequenz, eine starke Positionierungssequenz mit einer Länge von 146 bp [42], wurde aus dem Plasmid pgem3z 60 amplifiziert. Diese Sequenz wurde für die 170 bp DNA an jedem Ende um ~ 12 bp und für die 210 bp DNA um ~ 32 bp verlängert. In Tabelle 7 ist die Widom-601 Sequenz **fett** und DNA-Arme *kursiv* dargestellt.

Tabelle 7: Sequenz der für die Rekonstitutionen verwendeten DNA

170 bp Sequenz

<i>CATGCACAGG</i>	<i>ATGTATATAT</i>	<i>CTGACACGTG</i>	<i>CCTGGAGACT</i>	<i>AGGGAGTAAT</i>	<i>CCCCTTGGCG</i>
<i>GTAAAAACGC</i>	<i>GGGGGACAGC</i>	<i>GCGTACGTGC</i>	<i>GTTTAAGCGG</i>	<i>TGCTAGAGCT</i>	<i>GTCTACGACC</i>
<i>AATTGAGCGG</i>	<i>CCTCGGCACC</i>	<i>GGGATTCTCC</i>	<i>AGGGCGGCCG</i>	<i>CGTATAGGGT</i>	

210 bp Sequenz

<i>CAAGGTCGCT</i>	<i>GTTCAATACA</i>	<i>TGCACAGGAT</i>	<i>GTATATATCT</i>	<i>GACACGTGCC</i>	<i>TGGAGACTAG</i>
<i>GGAGTAATCC</i>	<i>CCTTGGCGGT</i>	<i>TAAAACGCGG</i>	<i>GGGACAGCGC</i>	<i>GTACGTGCGT</i>	<i>TTAAGCGGTC</i>
<i>CTAGAGCTGT</i>	<i>CTACGACCAA</i>	<i>TTGAGCGGCC</i>	<i>TCGGCACCGG</i>	<i>GATTCTCCAG</i>	<i>GGCGGCCCGC</i>
<i>TATAGGGTCC</i>	<i>ATCACATAAG</i>	<i>CGGATGAACT</i>			

Die verwendeten DNA-Konstrukte wurden mit Hilfe unterschiedlicher, fluoreszenzmarkierter Primer (Tabelle 8) durch präparative PCR hergestellt

Tabelle 8: Für die Herstellung fluoreszenzmarkierter DNA-Sequenzen verwendete Primer.

Name	Name	Farbstoff / Position
210 bp Sequenz	Intern – doppelt markiert	Alexa488
		Alexa594
170 bp Sequenz	Intern – doppelt markiert	Alexa488
		Alexa594
	Intern - Akzeptor	Alexa594
	Dyaden Achse - Akzeptor	Alexa594
	Dyaden Achse invers - Akzeptor	Alexa594

3.2.2. Fluoreszenzmarkierte Histon-Konstrukte

Es wurden die Histonproteine H2BT112C¹, H3K4C², H3K9C² für die Fluoreszenzmarkierung verwendet.

¹ Prof. Karolin Luger, University of Colorado Boulder, "Chromatin Structure & Dynamics"

² Prof. Jennifer Nyborg, Colorado State University, "Biochemistry and Molecular Biology"

Tabelle 9: Rekonstituierte Nukleosomenkonstrukte

Histon	Position	Farbstoff	DNA/Histon	Position	Farbstoff
H2B	T112C	Alexa488	170 bp	-52	Alexa594
			170 bp	-15	Alexa594
	Alexa594	H3	K9C	Alexa488	
H3	K4C	Alexa488	170 bp	+ 15	Alexa594
			170 bp	- 15	Alexa594
	K9C	Alexa488	170 bp	+ 15	Alexa594
			170 bp	- 15	Alexa594

3.3. Proteinexpression

3.3.1. Ampicillin

Es wurde eine Ampicillin-Stammlösung mit einer Konzentration von 25 mg/ml in H₂O hergestellt, durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert, à 10 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.3.2. LB-Amp-Platten

LB-Amp-Platten wurden nach Anleitung mit Difco™ LB-Agar (Lennox) hergestellt, mit Ampicillin einer Endkonzentration von 50 - 100 µg/ml versetzt und bei 4 °C gelagert.

3.3.3. LB-Medium

Das Difco™ LB Broth Medium wurde nach Anleitung (Miller) angesetzt und der pH-Wert vor dem Autoklavieren auf 7,4 – 7,5 eingestellt. Anschließend kann das Medium bei 4 °C im Kühlraum gelagert werden. Für die Kultivierung von Bakterien wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50 – 100 µg/ml hinzugegeben.

3.3.4. IPTG

Die Proteinexpression in *E. coli* wird mit einem künstlichen Induktor für das Lactose-Operon - Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) - induziert. Es wurde eine IPTG-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 M in H₂O hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.4. Gele

3.4.1. Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden mit LE-Agarose (Biozym) in 0,5x TBE-Puffer angesetzt. Die Lösung wurde in einer Mikrowelle erwärmt bis die Agarose vollständig gelöst war.

1x TBE-Puffer

Tris-HCl	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

Der 0,5x TBE-Puffer diente ebenfalls als Laufpuffer.

3.4.2. Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Gelelektrophorese

Für die Analyse der Proteinexpression wurden gekaufte RunBlue Precast Gele der Firma Expedeon mit einem SDS-Gehalt von 16% verwendet. Als Laufpuffer wurde der mitgelieferte 10x SDS-Puffer benutzt. Die Proben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und ein vorgefärbter Proteinmarker (10 - 175 kDa, Biomol) als Kontrolle verwendet. Nach der Gelelektrophorese (140 V, 40 min) erfolgte eine Färbung mit Coomassie.

3.4.3. Triton-Acetic-Acid-Urea- (TAU-) Gelelektrophorese

TAU-Gele wurden für die Analyse von Histonproteinen und Oktameren verwendet.

Trenngel

		10 ml	40 ml
Acrylamid:Bisacrylamid	30% : 0,8%	5 ml	20 ml
Eisessig	100%	540 µl	2,16 ml
Urea		4,84 g	19,36 g
Triton	0,15 M	0,48 ml	1,92 ml
Thiodiglycol		100 µl	400 µl
TEMED		60 µl	240 µl
Riboflavin	0,005%	1 ml	4 ml
in 0,1 M NaOH			

Acrylamid, Eisessig und Urea wurden zusammengegeben und im Wasserbad unter ständigem Rühren erwärmt. Wenn diese Lösung 37 °C erreicht hatte und alles vollständig eingelöst war, wurden die restlichen Chemikalien zugefügt. Die 0,005%-ige Riboflavin-Lösung in 0,1 M NaOH wurde jeweils frisch aus einer 1%-igen Riboflavin Stammlösung in 0,1 M NaOH angesetzt.

Sammelgel

		10 ml
Acrylamid:Bisacrylamid	30% : 0,8%	2,5 ml
Urea		4,8 g
3 M Kalium-Acetat	pH 5,0	1,25 ml
Triton	0,15 M	0,48 ml
Thiodiglycol		100 µl
TEMED		100 µl
Riboflavin	0,005%	1 ml
ddH ₂ O		1 ml

TAU-Probenpuffer

Es wurde jeweils eine 10 ml Stammlösung des TAU-Probenpuffers angesetzt und die Proben jeweils im Verhältnis 1:1 damit versetzt.

Urea	4,84 g
Eisessig	500 µl pH 3

Laufpuffer

Als Laufpuffer wurde 5%-ige Essigsäure verwendet.

3.4.4. Native-Polyacrylamid-Gele (PAA)

Der Erfolg der Nukleosomenrekonstitutionen wurde mittels PAA-Gelelektrophorese überprüft.

6 % PAA Gel

Acrylamid	60:1	2 ml
TBE	10x	1 ml
ddH ₂ O		7 ml
APS	10%	200 µl
TEMED		3 µl

Laufpuffer

Tris-HCl	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM
	pH 7,5

3.5. Färbung der Gele

3.5.1. Coomassie

Die Färbung der gekauften RunBlue Precast Gele (Expedeon) erfolgte mit Coomassie.

Färbelösung

Essigsäure	10 %	50 ml
Methanol	20 %	25 ml
Ethanol	42,5 %	212,5 ml
Brilliant Blue R250	0,2 %	1 g
Mit ddH ₂ O auffüllen auf		500 ml

Entfärbelösung

Isopropanol	20 %
Essigsäure	7,5 %

3.5.2. Silberfärbung

Vor der Silberfärbung von TAU-Gelen wurde die Gelkammer gereinigt und nur noch mit Handschuhen gehandhabt, da die Silberfärbung sehr sensitiv gegenüber Proteinen ist.

Färbelösung

Lösung A

Silber	0,8 g
ddH ₂ O	4 ml

Lösung B

NaOH	0,36 %	21 ml
NH ₄ OH	14,8 M	1,4 ml

Lösung A wurde unter ständigem Rühren tropfenweise in Lösung B gegeben, damit das Silber in der Lösung nicht ausfällt und am Ende eine klare Färbelösung entsteht.

Entwicklerlösung

Zitronensäure		1 ml
Formaldehyd	37 %	100 µl

Abstopplösung

Methanol	50 %
Essigsäure	12 %

3.6. Puffer

3.6.1. Für Proteinaufreinigung verwendete Puffer

Lysepuffer

Tris -HCl	50 mM	pH 7,5
KCl	100 mM	
Na-EDTA	1 mM	
<hr/>		
PMSF	1 mM	vor Gebrauch frisch zugeben
Nonidet P40	0,1% (v/v)	

Waschpuffer

Gleiche Zusammensetzung wie Lysepuffer, jedoch ohne Zugabe von PMSF und Nonidet P40.

SAU-50 Puffer

Deionisierter Harnstoff	7 M	
Natrium Acetat	20 mM	pH 5,2
EDTA	1 mM	
KCl	50 mM	

SAU-1000 Puffer

Deionisierter Harnstoff	7 M	
Natrium Acetat	20 mM	pH 5,2
EDTA	1 mM	
KCl	1 M	

Entfaltungspuffer

Guanidin-Hydrochlorid	7 M
Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
DTT	10 mM

Rückfaltungspuffer

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

3.6.2. **Puffer für Nukleosomen Rekonstitution**

Die Rekonstitution von Nukleosomen erfolgte mittels doppelter Dialyse.

50x (5 mM NaCl, TE-Puffer)

NaCl	250 mM
Tris-HCl	500 mM
EDTA	5 mM
	pH 7,5

20x (0,1 M NaCl, TE-Puffer)

NaCl	2 M
Tris-HCl	200 mM
EDTA	2 mM
	pH 7,5

1x (2 M NaCl, TE-Puffer)

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

1x (4 M NaCl, TE-Puffer)

NaCl	4 M
Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,1 mM
	pH 7,5

3.6.3. **HPLC-Puffer**

Die Aufreinigung von markierten und unmarkierten DNA-Sequenzen erfolgte mittels HPLC.

Puffer 1

Tris-HCl	25 mM	pH 7,5
----------	-------	--------

Puffer 2

Tris-HCl	25 mM	pH 7,5
NaCl	1 M	

3.7. Geräte

3.7.1. Zentrifugen

In Tabelle 10 ist eine Übersicht der verwendeten Zentrifugen sowie deren Einsatzgebiet und der jeweils verwendete Rotor aufgeführt.

Tabelle 10: Für die verschiedenen Zentrifugen verwendete Rotoren

Probe/Anwendung	Zentrifuge	Rotor
Plasmidaufreinigung	Eppendorf 5415 C	-
Bakteriensuspension/ Proteinaufreinigung	M+S Laborgeräte RC5C	GSA 601
Bakteriensuspension/ Plasmidaufreinigung	Eppendorf 5804R	A-4-44
Nukleosomen	Eppendorf 5417R	-

3.7.2. Thermocycler

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction) in einem T3 Thermocycler (Biometra).

3.7.3. Gelelektrophorese

Die verwendeten Gelelektrophoresesysteme sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Gelelektrophoreseapparaturen und deren Verwendungszweck

Probe	Gel	System
DNA-Fragmente	Agarosegel	Model EC370 M (E-C Apparatus Corporation)
Oktamere	TAU-Gel	CTI, Gelkammer TV21 (CTI GmbH)
Nukleosomen	PAA Gel	Mini Protean (Bio-Rad)
Proteine	SDS-Gel	CTI, Gelkammer TV21 (CTI GmbH)

3.7.4. Gelstation

Die für die Analyse von unmarkierten DNA-Sequenzen bzw. Nukleosomen verwendeten Gele wurden für 15 min in einer Ethidium Bromid-haltigen Lösung gebadet und anschließend auf einer Gelstation (UV BioDocAnalyse, Biometra) unter Bestrahlung mit UV-Licht fotografiert.

3.7.5. Inkubator

LB-Amp-Platten mit transformierten Bakterien und Restriktionsansätze wurden bei 37 °C in einem Inkubator (WTC, Binder) inkubiert. Die Anzucht von Bakteriensuspensionen im LB-

Amp-Medium und einem Volumen von $V = 5$ ml erfolgte in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Raum unter Verwendung eines Certomat U Schüttlers.

Große Bakteriensuspensionen in LB-Amp-Medium und einem Volumen von $V = 500$ ml wurden hingegen im Inkubator mit integriertem Schüttler (TH30, Edmund Bühler) inkubiert.

3.7.6. **Ultraschallstab**

Bakterienzellen wurden mit einem Ultraschallstab (Branson SONIFIER 250) aufgeschlossen (Einstellungen: *Output control: 5, duty cycle 50 %*).

3.7.7. **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography)**

DNA-Fragmente wurden per HPLC (Crystal 200 High Pressure System, Unicam) über eine Säule (Gen-Pak-Fax, Waters) durch Ionenaustausch aufgereinigt. Das Eluat wurde mit Hilfe des Fraktionssammlers 2111 Multitrack (LKB Bromma) gesammelt.

3.7.8. **Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography)**

Rekombinante Histonproteine wurden schrittweise durch Größenchromatographie mit einer Sepharyl S-200 Säule mittels FPLC (Amershan GP250, Pharmacia) und Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer Mono S HR 10/10 FPLC Säule aufgereinigt.

Rekonstituierte Oktamere wurden lediglich über Größenchromatographie mit einer Superdex 200 Säule aufgereinigt. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (FRAC-100, Pharmacia, Biotech) gesammelt.

3.7.9. **Messkammer**

Für Typhoon- und Einzelmolekülmessungen wurden 384 Mikrokammerplatten (Sensoplate plus, Greiner Bio-One GmbH) verwendet.

3.7.10. **Absorptionsspektrometer**

Absorptionsmessungen erfolgten in SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten (Helma, Probenschichtdicke = 3 mm und min. Probenvolumen $V = 50\text{ }\mu\text{l}$) mit Hilfe des Cary 4E UV-Visible Spektrometers (Varian). Für fluoreszenzmarkierte Proben wurde ein Wellenlängenbereich von $\lambda = 220$ nm bis $\lambda = 750$ nm gemessen und für nichtmarkierte Proben von $\lambda = 220$ nm bis $\lambda = 350$ nm.

3.7.11. Fluoreszenzspektrometer

Die Bestimmung der Anisotropie der Fluorophore erfolgte mit einem SLM-AMINCO 8100 Fluoreszenzspektrometer (SLM, Urbana) in SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten (siehe 4.8). Hierfür wurde die Emission nach Anregung mit einer 150 Watt Xenonlampe gemessen. Die benötigte Anregungswellenlänge und der Detektionsbereich wurden über Monochromatoren eingestellt.

3.7.12. Fluoreszenzscanner

Für die Analyse von fluoreszenzmarkierten Proben wurde ein Multifunktionsscanner (Typhoon 9400, GE Healthcare) – im Weiteren als Typhoon-Scanner bezeichnet – verwendet, der verschiedene Anregungslaser und mehrere Emissionsfilter aufweist. Die spezifische Anregung und selektive Detektion der Emission der Fluorophore erfolgte mit den Einstellungen aus Tabelle 12.

Tabelle 12: Für fluoreszenzmarkierte Proben verwendete Einstellungen des Typhoon-Scanners

Fluorophor	Anregungswellenlänge	Detektionsfilter
Alexa488	488 nm	520 BP40
Alexa594	532 nm	610 BP30

Der Typhoon-Scanner ermöglicht sowohl die Messung von Fluoreszenzintensitäten verschiedener Gele, als auch von Proben in 384 Mikrokammerplatten (siehe 4.11.2).

3.8. Software

3.8.1. ImageQuant

Mit dem Programm ImageQuant (ImageQuant TL Software – GE Healthcare Europe GmbH) wurden die mit Hilfe des Typhoon-Scanners erhaltenen Bilder ausgewertet. Für Ensemblesmessungen wurden verschiedene Bildbereiche definiert (ROI – *region of interest*) und deren Intensität bestimmt. Für Gelanalysen wurde hingegen das Intensitätsprofil des gesamten Bildes verwendet. Die weiteren Berechnungen erfolgten in IgorPro.

3.8.2. IgorPro

Zur Auswertung von Ensemble- und Einzelmolekül-FRET-Messungen wurde das Programm IgorPro (WaveMetrics Inc.) mit den im Folgenden beschriebenen Skripten verwendet.

Skript TyphoonEval – Auswertung von Ensemble-Messungen

Die mittels ImageQuant bestimmten Fluoreszenzintensitäten wurden in IgorPro überführt und mit einem von Sebastian Isbaner geschriebenen Skript analysiert. Zuerst wird der Mittelwert der technischen Triplikate bestimmt und um das Hintergrundsignal der jeweiligen Puffer bereinigt. Im zweiten Schritt müssen die Korrekturfaktoren für die direkte Anregung des Akzeptors K_A und das Übersprechen des Donors K_D in den Akzeptorkanal bestimmt werden.

Die direkte Anregung des Akzeptors wird über zwei Werte einer Probe bestimmt, welche lediglich den Akzeptor in der entsprechenden Messkonzentration enthält.

- 1) Intensität der Fluoreszenz im Akzeptorkanal (A_T) nach Anregung mit dem Donorlaser,
- 2) Intensität der Fluoreszenz im Akzeptorkanal (A_A) nach Anregung mit dem Akzeptorlaser.

Daraus ergibt sich K_A zu:

$$K_A = \frac{A_T}{A_A}$$

Formel 15

Für den Korrekturfaktor K_D wurde eine Probe verwendet, welche lediglich den Donor in der entsprechenden Messkonzentration enthält und ebenfalls zwei Werte bestimmt:

- 1) Intensität der Fluoreszenz im Akzeptorkanal (D_T) nach Anregung mit dem Donorlaser,
- 2) Intensität der Fluoreszenz Donorkanal (D_D) nach Anregung mit dem Donorlaser.

K_D berechnet sich dann zu:

$$K_D = \frac{D_T}{D_D}$$

Formel 16

Mit Hilfe der berechneten Korrekturfaktoren wurde anschließend die *Proximity Ratio* für die einzelnen FRET-Proben berechnet:

$$PR = \frac{E_T - E_D \times K_D - E_A \times K_A}{E_T - E_D \times K_D - E_A \times K_A + E_D}$$

Formel 17

PR *Proximity Ratio*
 E_T Fluoreszenzintensität Transfer-Kanal

E_D	Fluoreszenzintensität Donor-Kanal
E_A	Fluoreszenzintensität Akzeptor-Kanal
K_D	Korrekturfaktor für das Übersprechen des Donors
K_A	Korrekturfaktor für die direkte Anregung des Akzeptors

Die Nukleosomen wurden in TE-Puffern mit verschiedenen Salzkonzentrationen inkubiert, die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten gemessen und die errechneten *Proximity Ratios* in Abhängigkeit der ansteigenden Salzkonzentration dargestellt. Der Kurvenverlauf wird in dem Skript direkt mit einem sigmoidalen Modell beschrieben und anschließend auf den höchsten und den niedrigsten Wert des Fits normalisieren. (Skript: siehe 9.1)

***spFRETEval* -Auswertung von Einzelmolekül-Messungen**

Die Berechnung der *Proximity Ratio* von spFRET Messungen erfolgte mit dem von Alexander Gansen geschriebenen Programm FRETtchen (siehe 3.8.3) [43]. Die Messungen wurden, wie weiter unten beschrieben, um die zuvor bestimmten Korrekturfaktoren bereinigt und die *Proximity Ratio* der einzelnen *Bursts* errechnet. Für die weitere Auswertung wurde mit einem in dieser Arbeit entwickelten Skript (spFRETEval, siehe 9.2) ein Histogramm erstellt, das die *Proximity Ratio* im Bereich von -0,2 – 1,2 in 70 Klassen mit einer Klassenbreite von 0,02 einteilt. Die so erhaltenen Histogramme werden auf die Gesamtburstzahl normiert und anschließend mit der in IgorPro6.3 vorhandenen „MultiPeakFitting2“-Funktion über Gaußfunktionen beschrieben. Für die einzelnen Gaußkurven können der Mittelwert, die Breite und die Fläche bestimmt werden. Der Mittelwert gibt Auskunft über die mittlere *Proximity Ratio* der betrachteten Subpopulation. Die Breite beschreibt die Verteilung der einzelnen Spezies innerhalb einer Subpopulation und kann je nach Größe ein erster Hinweis für dynamische Prozesse sein. Die Fläche unter den einzelnen Gaußkurven ist ein Maß für die Verteilung der einzelnen Populationen im Ensemble. Für eine gegebene Probe wiesen Mittelwert und Breite nur eine minimale Abhängigkeit von der Salzkonzentration auf. Vergleicht man hingegen unterschiedliche Proben bei gleicher Salzkonzentration, können Erwartungswert und Breite der einzelnen Gaußkurven stark variieren.

3.8.3. FRETtchen

Die Berechnung der *Proximity Ratio* aus den spFRET-Daten erfolgte mit dem von Alexander Gansen während seiner Doktorarbeit geschriebenen Programm FRETtchen [43]. Da die Rohdaten lediglich die Information enthalten, wann ein Photon in welchem Kanal detektiert wurde, werden die detektierten Photonen zuerst in einzelne *Bursts* unterteilt. Ein *Burst* ist definiert durch eine bestimmte Mindestanzahl an detektierten Photonen, die einen zeitlichen Mindestabstand zwischen den aufeinanderfolgenden Photonen unterschreiten. Über die *Burstdauer*, die minimale Photonenzahl und die Photonenrate können anschließend *Bursts*

ausgeschlossen werden, die auf aggregierte Nukleosomen oder auf solche, die den Laserfokus lediglich am Rand durchqueren, zurückzuführen sind. Da aggregierte Nukleosomen eine längere *Burstdauer* und eine höhere Photonenrate aufweisen, wurde die Photonenrate auf $15 - 80 \text{ ms}^{-1}$ und die Interphotonenzeit auf $120 \mu\text{s}$ beschränkt. Nukleosomen, die lediglich den Rand des Laserfokus passieren, führen hingegen zu *Bursts* mit sehr kleiner Photonenzahl und können über eine minimale Photonenzahl von 60 ausgeschlossen werden. Für alle ermittelten *Bursts* wird sowohl die *Burstdauer* als auch der Zeitpunkt des *Bursts* bestimmt. Außerdem wird der Korrekturfaktor für das Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal (ω) und das Hintergrundsignal des Puffers experimentell ermittelt. Aus diesen Parametern wird anschließend die *Proximity Ratio* von jedem *Burst* nach Formel 20 bestimmt.

$$N_D = N_D^{det} - B_D \tag{Formel 18}$$

$$N_A = N_A^{det} - B_A - \omega \times N_D \tag{Formel 19}$$

$$PR = \frac{N_A}{N_A + N_D} \tag{Formel 20}$$

- N_D Bereinigte Anzahl an Donorphotonen
- N_A Bereinigte Anzahl an Akzeptorphotonen
- N_D^{det} Detektierte Anzahl an Donorphotonen
- B_D Hintergrundsignal des Donorkanals
- N_A^{det} Detektierte Anzahl an Akzeptorphotonen
- B_A Hintergrundsignal des Akzeptorkanals
- ω Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal
- PR *Proximity Ratio*

Die relevanten Daten werden durch FRETtchen in einer Textdatei mit dem in Tabelle 13 dargestellten Format gespeichert.

Tabelle 13: Aufbau der durch FRETtchen generierten Textdatei

Nummer	Zeitpunkt	Dauer	N_D^{det}	N_A^{det}	PR	<i>Burstrate</i>

Diese Textdatei wurde anschließend in Igor mit dem beschriebenen Skript spFRETEval (siehe 3.8.2 und 9.2) weiter ausgewertet.

3.8.4. ALEXControl

Mit Hilfe des von Sebastian Isbaner während seiner Masterarbeit geschriebenen Programms ALEXControl [44] wird das alternierende Ein- und Ausschalten der beiden verwendeten Laser ermöglicht. Hierfür wird der verwendete AoTF (Acusto Optical Tunable Filter) extern von ALEXControl über eine PCI-Express-Steuerkarte (PCIe-6323, National Instruments) angesteuert. Die gewünschte Anregungssequenz, sowie die Intensität der beiden Laser lassen sich über die verschiedenen Parameter mit ALEXControl einstellen. Darüber hinaus lassen sich unterschiedliche Anregungsmodi wählen. Dadurch können beide Laser auch einzeln oder gleichzeitig kontinuierlich eingeschaltet werden.

3.8.5. ALEXEval

Die Berechnung des Stöchiometriefaktors sowie der *Proximity Ratio* aus den Rohdaten einer ALEX-Messung erfolgte mit dem ebenfalls von Sebastian Isbaner geschriebenen Programm ALEXEval [44]. Die einzulesende Datei enthält auch in diesem Fall lediglich Informationen darüber wann ein Photon auf welcher APD detektiert wurde und wann ein Umschalten der Anregungslaser stattfand. Es ist daher im ersten Schritt wichtig, die gemessenen Photonen den entsprechenden Anregungsperioden zuzuordnen. Anschließend wird auch in diesem Fall eine *Burstsuche* durchgeführt. Hierfür kann in dem Programm zwischen zwei verschiedenen Suchansätzen unterschieden werden: *Sliding Burst search* und *Zweikanal-Burstsuche*. Außerdem kann der Datensatz über einen *Lee-Filter* geglättet werden. Das Ergebnis dieser *Burstsuche* führt zu einer Textdatei mit dem in Tabelle 14 aufgeführten Format.

Tabelle 14: Aufbau der durch das Programm ALEXEval generierten Datei

Startzeit	Dauer	Proximität	Stöchiometrie	Burstsize	N_{Dex}^{Aem}	N_{Dex}^{Dem}	N_{Aex}^{Dem}	N_{Aex}^{Aem}	Burstrate [kHz]	PR raw	SR raw

Für die Berechnung der *Proximity Ratio* (PR) und der Stöchiometrie (S) muss das detektierte Signal zuerst um das Hintergrundsignal des Puffers bereinigt werden. Da bei ALEX-Messungen das Hintergrundsignal für jede mögliche Kombination von Anregungs- und Detektionskanälen berücksichtigt werden muss, erfolgt die Messung des Puffers mit den gleichen Einstellungen wie die eigentlichen Messungen. Im Folgenden beschreibt X_{ex} die

Anregungsperiode und Y_{em} den Detektionskanal ($X, Y = \text{Donor oder Akzeptor}$). Die um das Hintergrundsignal $b_{X_{ex}}^{Y_{em}}$ (mittlere Zählrate im Puffer) bereinigte Photonenzahl $N'_{X_{ex}}^{Y_{em}}$ jeder Kanalkombination ergibt sich aus den gemessenen Photonenzahlen $N_{X_{ex}}^{Y_{em}}$ zu:

$$N'_{X_{ex}}^{Y_{em}} = N_{X_{ex}}^{Y_{em}} - b_{X_{ex}}^{Y_{em}} \times t_B \times \eta_{X_{ex}}$$

Formel 21

Der für diese Berechnung verwendete Tastgrad $\eta_{X_{ex}}$ ergibt sich für den jeweiligen Detektionskanal aus der Länge der entsprechenden Anregungssequenzen T_i (T_1 : Donorlaser, T_2 : Pause, T_3 : Akzeptorlaser, T_4 : Pause; siehe Abschnitt 2.5 spFRET mit alternierender Zweifarbenanregung - ALEX):

$$\eta_{D_{ex}} = \frac{T_1 + T_2}{T_1 + T_2 + T_3 + T_4}$$

Formel 22

$$\eta_{A_{ex}} = \frac{T_3 + T_4}{T_1 + T_2 + T_3 + T_4}$$

Formel 23

Die bereinigten Photonenzahlen $N'_{X_{ex}}^{Y_{em}}$ werden im Anschluss mit den Korrekturfaktoren für die direkte Anregung des Akzeptors (σ) und für das Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal (ω) korrigiert (Formel 24). Daraus ergibt sich für $N'_{D_{ex}}$ der beiden Emissionskanäle $N'_{D_{ex}}^{Dem}$ und $N'_{D_{ex}}^{Aem}$:

$$N'_{D_{ex}} = \gamma \times N'_{D_{ex}}^{Dem} + (N'_{D_{ex}}^{Aem} - \omega \times N'_{D_{ex}}^{Dem} - \sigma \times N'_{A_{ex}}^{Aem})$$

Formel 24

Nimmt man als Näherung für den Detektionsfaktor $\gamma = 1$ und $N'_{A_{ex}}^{Dem} = 0$ an, lassen sich die *Proximity Ratio PR* (Formel 25) und die *Stöchiometrie S* (Formel 26) direkt berechnen.

$$PR = \frac{N'_{D_{ex}}^{Aem} - \omega \times N'_{D_{ex}}^{Dem} - \sigma \times N'_{A_{ex}}^{Aem}}{N'_{D_{ex}}}$$

Formel 25

$$S = \frac{N'_{D_{ex}}}{N'_{D_{ex}} + N'_{A_{ex}}^{Aem}}$$

Formel 26

$N_{X_{ex}}^{Y_{em}}$ Anzahl detektierter Photonen
 $N'_{X_{ex}}^{Y_{em}}$ Bereinigte Anzahl detektierter Photonen

$b_{X_{ex}}^{Y_{em}}$	Hintergrundsignal
t_B	Länge des <i>Bursts</i>
ω	Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal
σ	direkte Anregung des Akzeptors
PR	<i>Proximity Ratio</i>
S	Stöchiometrie

Wurde der Detektionsfaktor γ experimentell ermittelt, kann anstelle der *Proximity Ratio* direkt die FRET-Effizienz und die zugehörige bereinigte Stöchiometrie S_γ berechnet werden.

3.8.6. MatLab

Mit einem von Jörg Langowski geschriebenem Skript (ALEX-3D, siehe 9.3) können die in ALEXEval berechneten Werte für die *Proximity Ratio* und den Stöchiometriefaktor dreidimensional dargestellt werden. Die drei Achsen werden dabei durch die *Proximity Ratio* als X-Achse, der Stöchiometriefaktor als Y-Achse sowie der Häufigkeit als Z-Achse dargestellt.

3.9. spFRET- / ALEX-Setup

Sowohl für spFRET als auch für ALEX-Messungen wurde der gleiche Aufbau verwendet (Abbildung 19). Die verschiedenen Messmethoden unterscheiden sich lediglich in wenigen Details. Die Ansteuerung der Laser erfolgt für spFRET-Messungen direkt über den AoTF, während bei ALEX-Messungen das Programm ALEXControl die Steuerung des AoTF übernimmt. Außerdem wird für spFRET-Messungen lediglich der Donorlaser mit $\lambda = 491$ nm benutzt, während bei ALEX-Messungen Donor- und Akzeptorlaser alternierend geschaltet werden. Der Laserstrahl wird in beiden Fällen über dichroitische Spiegel zum AoTF geleitet, hinter dem AoTF in eine optische Faser eingekoppelt und in den Mikroskopaufbau eingebracht. Dort wird er abermals von einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch das Objektiv in die Probe fokussiert. Falls nun ein fluoreszenzmarkiertes Teilchen durch das Fokusvolumen diffundiert, wird Licht einer längeren Wellenlänge durch dieses Teilchen emittiert bzw. der Akzeptor über FRET zur Emission angeregt. Das emittierte Licht kann nun den dichroitischen Spiegel passieren und wird über eine Linse auf die Lochblende fokussiert. Lediglich Licht aus der Fokusebene kann die Lochblende passieren. Über einen nachfolgenden dichroitischen Spiegel wird das Licht seiner Wellenlänge nach in Donor- und Akzeptorkanal unterteilt und über eine Linse auf die jeweilige APD fokussiert. Der schematische Aufbau des Setups ist in Abbildung 19 dargestellt.

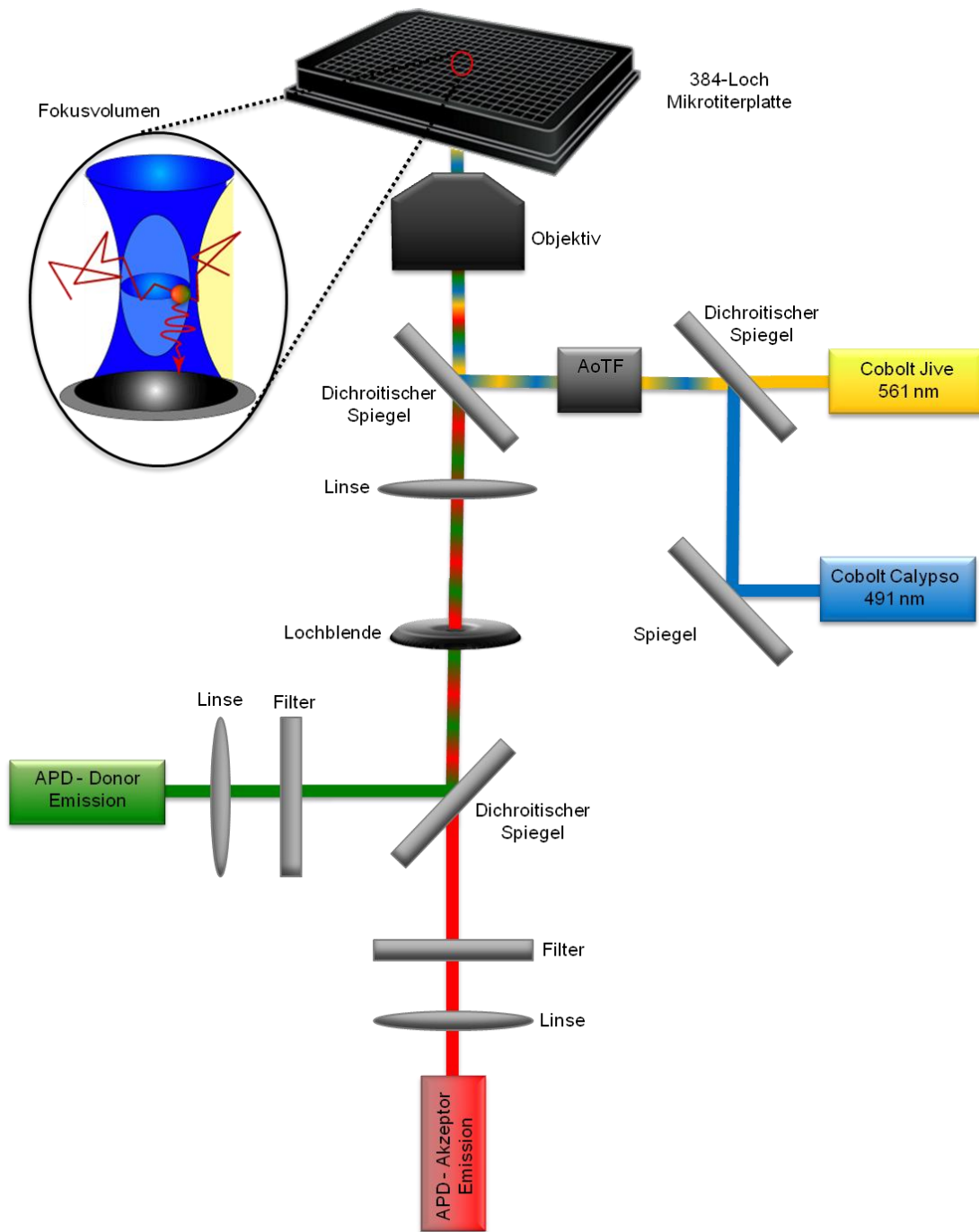


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Aufbaus, der für die Einzelmolekülmessungen verwendet wurde.

4. Methoden

4.1. Klonierung der Histonmutanten

4.1.1. Subklonierung der H3-Mutanten

Die Sequenzen der beiden H3-Mutanten (siehe 3.2.2) wurden mittels PCR amplifiziert, mit *NotI* und *NdeI* geschnitten und in den Pet17b-Vektor (siehe 3.1.3) ligiert.

4.1.2. Overlap-Extension-PCR für H2A-Mutanten

Die Mutationen wurden durch Overlap-extension-PCR mit dem PCR-Reagenz SuperHot Mastermix (Bioron GmbH) ins Innere des H2A-Gens eingebracht.

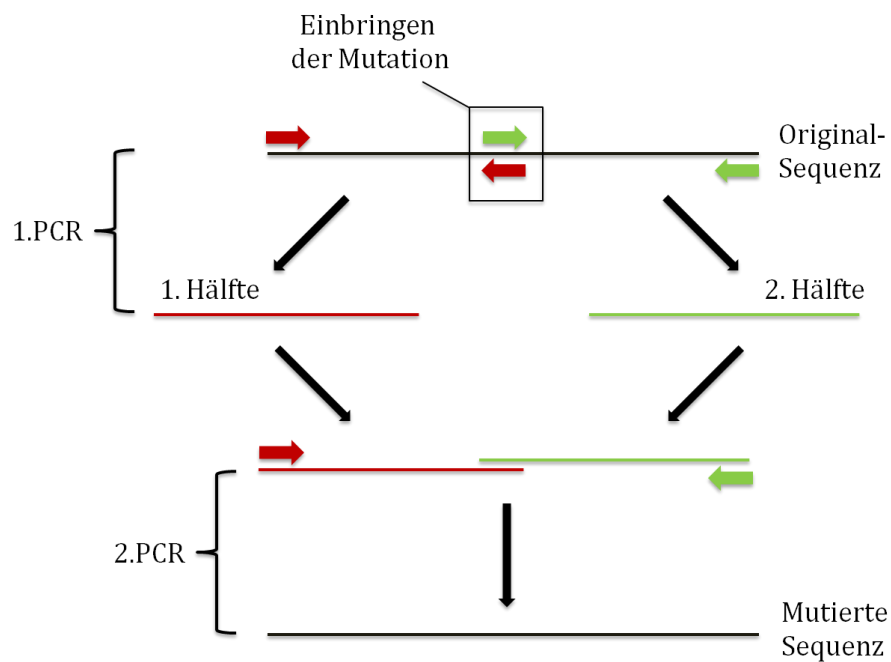



Abbildung 20: Schematischer Ablauf einer Overlap-Extension-PCR

Für die Overlap-Extension-PCR werden zwei Primer Paare benötigt. Ein Primerpaar ist jeweils homolog zu der Anfangs- bzw. Endsequenz des zu amplifizierenden Gens. Das interne Primerpaar enthält die gewünschte Mutation und ist ansonsten ebenfalls homolog zu der Gensequenz. Die Sequenz wird mit einem Zwei-Schritt-PCR-Programm (Tabelle 15) im ersten Schritt nur vom Anfang bis zur gewünschten Mutation bzw. vom Ende bis zur Mutation amplifiziert.

Tabelle 15: für die Overlap-Extension-PCR verwendetes PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	94°C	5 min 00 sec
Denaturierung	94°C	1 min 00 sec
Elongation	72°C	0 min 30 sec
Endelongation	72°C	10 min 00 sec
Abkühlen	25°C	60 min 00 sec



Die so erhaltenen PCR-Produkte werden mit Hilfe eines 2 %-igen Agarosegels größenchromatografisch aufgetrennt, die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten und mit einem PCR-Aufreinigungs-kit extrahiert. Die beiden Produkte werden anschließend in äquimolaren Konzentrationen für eine weitere PCR mit dem gleichen PCR-Programm verwendet. Um die Ausbeute zu erhöhen, wird das benötigte Primer-Paar erst hinzugefügt, wenn die ersten vollständigen Produkte vorhanden sind (ca. 10 Zyklen). Davor dienen die überlappenden Fragmente reziprok als Primer für die stattfindende Amplifikation.

4.1.3. Restriktion

Das aufgereinigte PCR-Produkt und der zu verwendende Vektor wurden mit je 20 Units pro μg DNA mit *NdeI* und *NotI* (über Nacht, 37 °C) geschnitten. Um potentiell nicht geschnittene Plasmide zu eliminieren, wird der Ansatz über ein Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

4.1.4. Ligation

Das geschnittene Fragment (Insert) wurde mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor ligiert.

Ligationsansatz:

Insert	200 ng
Vektor	50 ng
10x Ligase Puffer	1:10
T4 DNA Ligase	400 Units

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert (mindestens 3 h) und anschließend per Hitzeschock in *E. coli* XL10 Gold (Agilent Technologies, Inc.) transformiert.

Hitzeschockprotokoll:

Auftauen	20 min auf Eis
Inkubation mit Ligationsansatz	10 min auf Eis
Hitzeschock	40 sec, 42 °C
Zellregeneration	10 min auf Eis

Die transformierten Bakterien wurden direkt auf ampicillinhaltige LB-Platten (3.3.2) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Da Ampicillin auf den Aufbau der Mureinschicht und nicht auf die Proteinexpression wirkt, kann die Vermehrung in SOC-Medium übersprungen werden.

4.1.5. **Plasmidaufreinigung**

Die Isolierung der transformierten und replizierten Plasmide erfolgte aus einer Bakterienkultur mit einem Volumen von 5 ml LB-Medium mit 50 – 100 µg/ml Ampicillin. Die Kultur wurde bei 110 rpm im 37 °C Raum über Nacht geschüttelt und die Plasmide anschließend per Mini-Präparation aufgereinigt. Nach erfolgreicher Aufreinigung wurden jeweils zwei Kontrollrestriktionsreaktionen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden die Restriktionsenzyme *NotI* und *NdeI* verwendet, welche zuvor zum Schneiden des Inserts sowie des Vektors benutzt wurden. Der zweite Ansatz enthielt *SacI*, da das eingebrachte, für H2A kodierende Gen eine intrinsische Schnittstelle enthält und somit ein Linearisieren des Vektors ermöglicht. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines 1 %-igen Agarosegels überprüft, bevor die Plasmide zum Sequenzieren an die Firma GATC Biotech versandt wurden.

4.2. **Gelelektrophorese**

4.2.1. **Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung der verschiedenen DNA-Proben erfolgte mit Agarosegelen (3.4.1).

1% Agarose	> 1 kbp	1 kbp Marker (Bioron GmbH)
2% Agarose	< 1 kbp	100 bp Marker (Bioron GmbH)

Vor dem Laden wurden ~ 50 ng der jeweiligen Proben im Verhältnis 1:4 mit 5x Ladepuffer versetzt und das Gel anschließend bei 120 V für 1 h laufen gelassen. Die Färbung der Gele erfolgte für 15 min unter ständigem Schütteln in einer Ethidiumbromid-Lösung.

4.2.2. **TAU-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe von TAU-Gelen (3.4.3) können die unterschiedlichen Histonproteine sowie deren modifizierte Varianten voneinander getrennt werden. Die Auftrennung erfolgt nach Ladung und Masse, wobei die Proteine durch den niedrigen pH-Wert negativ geladen vorliegen. Es wurden jeweils 2 µg aufgereinigtes Protein bzw. 4 µg Oktamer aufgetragen und das Gel für 20 h bei 120 V laufen gelassen. Fluoreszenzmarkierte Proben können nach dem Lauf sofort mit dem Typhoon-Scanner analysiert werden. Nichtmarkierte Proben wurden durch Silberfärbung gefärbt. Die Fixierung der Proteine erfolgte dabei für 2 – 3 h in 50 % Methanol,

wobei das Methanol stündlich gewechselt wurde. Anschließend wurde das Gel für 15 min in der Färbelösung gebadet, zweimal mit ddH₂O gewaschen und dann für 4 – 5 min in der Entwicklerlösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Abstopplösung gestoppt und diese für eine längere Lagerung durch ddH₂O ersetzt.

4.2.3. PAA-Gelelektrophorese

Sowohl markierte als auch nichtmarkierte Nukleosomen wurden mit PAA-Gelen (3.4.4) analysiert..

Tabelle 16: Für PAA-Gele verwendete Proben und deren benötigte Probenmenge

Probe	Probenmenge	Färbung
Markierte Nukleosomen	20 ng	keine
Nicht markierte Nukleosomen	50 ng	Ethidiumbromid

Als Kontrolle wurden jeweils 2 µl eines 100 bp Markers (Bioron 100 bp Ladder, Bioron GmbH) verwendet. Die Laufzeit des Gels betrug 40 - 50 min bei 110 V.

4.3. Proteinaufreinigung

Die hier durchgeführte Proteinaufreinigung lehnt sich an das Protokoll von Karolin Luger [45] zur Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Histonen an.

4.3.1. Transformation in *E. coli* BL21

Für die Proteinexpression wurden *E. coli* BL21(DE3) (Agilent Technologies) Bakterien per Hitzeschock transformiert. Dieser Stamm enthält bereits ein Plasmid, das nach Induktion mit IPTG (siehe 3.3.4) zur Expression der T7-Polymerase führt, die die Transkription von Genen ermöglicht, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Somit kann die Proteinexpression gezielt eingeleitet werden.

4.3.2. Proteinexpressionstest

Vor der Überexpression und Aufreinigung des gewünschten Proteins wurde eine Kontrolle im kleineren Maßstab durchgeführt. Hierfür wurden 6 Kolonien von einer LB-Amp-Platte (siehe 3.3.2) in je 5 ml LB-Amp-Medium (siehe 3.3.3) überführt und bis zu einer OD von 0,3 – 0,6 bei 37 °C und 110 rpm wachsen gelassen. Von allen Kulturen wurden Glycerinkulturen (0,5 ml Kultur mit 0,5 ml Glycerin) hergestellt und bei -80 °C eingefroren. Der Rest der Kultur (4,5 ml) wurde durch IPTG (siehe 3.3.4) mit einer Endkonzentration von 0,2 mM induziert, wobei eine Kultur als Negativ-Kontrolle nicht induziert wurde. Alle Kulturen

werden für weitere 3 h bei 37 °C und 110 rpm geschüttelt, abzentrifugiert und die Proteinexpression mit Hilfe eines SDS-Gels (3.4.2) kontrolliert.

4.3.3. **Überexpression der Proteine**

Für die Überexpression wurde jeweils der am besten exprimierende Klon direkt von der Glycerinkultur in eine 5 ml LB-Amp Kultur überführt. Diese wurde für 4 h bei 37 °C, 110 rpm geschüttelt, anschließend in 800 ml LB-Amp überführt und in zwei Kolben für weitere 5 h bei 37 °C, 110 rpm inkubiert. War nach dieser Inkubationszeit eine OD von mindestens 0,4 erreicht, wurde mit IPTG (Endkonzentration: 0,2 mM) induziert und die Kultur weitere 3 h geschüttelt. Aus der Kultur wurden 5 ml für eine Plasmidaufreinigung mit anschließender Sequenzierung abgenommen. Die restliche Kultur wurde abzentrifugiert und die Proteinexpression mittels SDS-Gel überprüft.

4.3.4. **Aufreinigung mittels FPLC**

Das aus der Proteinüberexpression erhaltene Pellet wurde in 40 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen anschließend mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen. Die Ultraschallbehandlung erfolgte in 4 Zyklen a 15 sec auf Eis, zwischen den Zyklen wurde jeweils eine Pause von 1 min eingelegt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (20 min, 12000 rpm, 4 °C) und das entstandene Pellet abermals in Lysepuffer (3.6.1) resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit Lysepuffer und zwei weitere Male mit Waschpuffer wiederholt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und entweder bei -20 °C aufbewahrt oder direkt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min in 250 µl DMSO inkubiert. Anschließend wurde das Pellet mit einem Spatel resuspendiert, langsam 10 ml Entfaltungspuffer und 100 µl einer 1 M DTT Lösung hinzugegeben und für 1 h langsam bei Raumtemperatur gerührt. Das Pellet wurde anschließend langsam mit einer Glaspipette weiter resuspendiert. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, 20 °C) wurde der Überstand behalten, das Pellet abermals in DMSO inkubiert und die bereits beschriebenen Schritte noch einmal wiederholt. Die erhaltenen Überstände wurden vereinigt, gefiltert (0,45 µm Porengröße) und für die eigentliche Proteinaufreinigung mittels FPLC (3.7.8) verwendet. Für den ersten Schritt, die Größenchromatographie, wurde die Säule zuvor mit SAU-1000 Puffer äquilibriert, anschließend der gefilterte Überstand mit einer Flussrate von 3 ml/min auf die Säule aufgetragen und das Eluat in Fraktionen mit V = 1 ml aufgefangen. Gleichzeitig wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm gemessen. Je 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Gel überprüft und geeignete Fraktionen anschließend mit einem Absorptionsspektrometer (3.7.10) auf DNA-Verunreinigungen untersucht. Alle Fraktionen, die das aufzureinigende Protein enthielten und ein Verhältnis von $OD_{260nm}/OD_{280nm} < 1,4$

aufwiesen wurden vereinigt und das Gesamtvolumen mittels Vivaspin 20 (MWCO 10000, GE Healthcare) auf $V < 10$ ml aufkonzentriert. Anschließend wurde dreimal für 2 h gegen 400 ml ddH₂O dialysiert. Das dialysierte Eluat wurde für den zweiten Schritt der Aufreinigung, die Ionenaustausch-Chromatographie, auf eine zuvor mit SAU-50 Puffer äquilibrierte Mono S Säule aufgetragen, über einen langsam ansteigenden Gradienten von SAU-50 zu SAU-1000 wieder eluiert und in einzelnen Fraktionen mit einem Volumen von $V = 0,5$ ml aufgefangen. Die Fraktionen wurden abermals mittels SDS-Gel überprüft, geeignete Fraktionen zusammengeführt und dreimal für 2 h gegen 400 ml ddH₂O dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Konzentration des reinen Proteins mit einem Absorptionsspektrometer (siehe 3.7.10) bestimmt und das Protein mit einer Endmenge von 1 mg in Mikroreaktionsgefäßen mit der Uniequip Univapo H Zentrifuge (Montreal Biotech Inc.) lyophilisiert.

4.4. Oktamer-Rekonstitution

Für die Oktamerrekonstitution wurden alle Histonproteine in Entfaltungspuffer gelöst, um eine komplette Entfaltung der Proteine zu gewährleisten. Die Histonproteine wurden in äquimolarer Konzentration gemischt und die finale Konzentration auf 1 mg/ml mit Entfaltungspuffer (siehe 3.6.1) eingestellt.

Tabelle 17: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der verwendeten Histone [46]

Histon	Organismus	Molekulargewicht [Da]	Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]
H2A	<i>X. laevis</i>	13960	4050
H2B	<i>X. laevis</i>	13774	6040
H3	<i>X. laevis</i>	15273	4040
H4	<i>X. laevis</i>	11236	5040

Der Ansatz wurde in einer Dialysekassette (Slide-A-Lyzer 7000 MWCO, Pierce) dreimal für 2 h und einmal über Nacht bei 4 °C gegen 400 ml Rückfaltungspuffer (siehe 3.6.1) dialysiert. Bei den ersten beiden Dialyseschritten wurde der Rückfaltungspuffer mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration: 5 mM) versetzt, um die Ausbildung von H3-Dimeren über Disulfidbrücken zwischen den intrinsischen Cysteinen zu verhindern. Potentielle Aggregate wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 rpm, 4 °C) aus der Probe entfernt und eine Größenchromatographie mittels FPLC (siehe 3.7.8) durchgeführt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden auf einem TAU-Gel überprüft. Fraktionen, die alle vier Histonproteine in äquimolaren Konzentrationen enthielten, wurden für die Rekonstitution von Nukleosomen verwendet werden.

4.5. Nukleosomen-Rekonstitution

Für die Rekonstitution von Nukleosomen wurde DNA mit einem Überschuss an Oktamer gemischt. Das richtige Verhältnis von DNA zu Oktamer muss für jedes Oktamer experimentell ermittelt werden. Da die DNA in ddH₂O gelöst ist, wurde das gleiche Volumen gefilterter 4 M NaCl TE-Puffer zugegeben, um eine Endkonzentration von 2 M NaCl TE-Puffer zu erhalten und auf 1 µg DNA pro 25 µl durch Zugabe von gefiltertem 2 M NaCl TE-Puffer eingestellt. Der fertige Ansatz wurde auf einem Schüttler (30 min, 200 rpm, Raumtemperatur) inkubiert und anschließend für die doppelte Dialyse in ein Dialysehütchen (Dialysekassette Slide-A Lyzer Mini Dialysats Units, 7000 MWCO, Thermo Scientific) überführt. Das Dialysehütchen wurde mit einem Schwimmer in einen Dialyseschlauch (SpectralPor Dialysis Membrane, MWCO: 6-8 000) mit 15 ml 2 M NaCl TE-Puffer gesetzt und für 5 h bei 4 °C gegen 0,1 M NaCl TE-Puffer dialysiert. Danach wurde das Dialysehütchen mit einem Schwimmer über Nacht gegen 5 mM NaCl TE-Puffer dialysiert. Der Erfolg der Rekonstitution wurde mit einem 6 % PAA-Gel überprüft.

4.6. Fluoreszenzmarkierung von Nukleosomen

Für die Fluoreszenzmarkierung der Nukleosomen wurden die beiden Fluorophore Alexa488 und Alexa594 (3.2) verwendet. Diese Fluorophore können sich entweder auf der DNA oder an einem der 4 unterschiedlichen Histone befinden.

4.6.1. DNA-Markierung

Für die in dieser Arbeit verwendeten Nukleosomen wurde die Widom-601 DNA-Sequenz verwendet. Mit Hilfe von aufgereinigten, fluoreszenzmarkierten Primern (IBA GmbH) können während einer PCR die Fluorophore an die gewünschten Stelle in die DNA-Sequenz eingebracht werden. Die Widom-601 DNA-Sequenz wurde aus dem Plasmid pgem3z 601 amplifiziert.

Tabelle 18: Für die DNA-Markierung verwendeter PCR-Ablauf

	Temperatur	Dauer
Aufschmelzen	96 °C	30 sec
Annealing	45 °C	60 sec
Amplifikation	72 °C	60 sec
Ende	20 °C	2 h



Um die so erhaltenen fluoreszenzmarkierten DNAs von den anderen Bestandteilen des PCR-Ansatzes zu trennen, wurde mittels Ethanol und Natriumacetat gefällt und anschließend zentrifugiert (10000 rpm, 60 min, 4 °C). Das Pellet wurde in Puffer 1 gelöst und abschließend für die Aufreinigung mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (3.7.7) verwendet.

4.6.2. DNA-Aufreinigung mittels HPLC

Während der HPLC konnten überschüssige DNA-Nebenprodukte sowie das eingesetzte Plasmid und die Primer aus der Lösung entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte über eine Gen-Pak-Fax Ionenaustauscher-Säule (3.7.7) durch das Anlegen eines Salzgradienten (100 % Puffer 1 (0 M NaCl) zu 100% Puffer 2 (1 M NaCl)) mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml pro Minute. Das Eluat wurde in einzelnen Fraktionen aufgefangen und anschließend auf einem nativen PAA Gel (3.4.4) überprüft. Alle Fraktionen, die lediglich das gewünschte, markierte PCR-Produkt enthielten, wurden zusammengeführt und abermals mit Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation (10000 rpm, 60 min, 4°C) wurde das erhaltene Pellet in Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

4.7. Proteinmarkierung

Um Fluoreszenzmarkierungen einzelner Histonproteine durchzuführen, wurde an der gewünschten Markierungsposition ein Cystein in die Proteinsequenz eingebracht. Diese Veränderung erfolgte auf DNA-Ebene mittels PCR (4.1) und somit bereits vor der Proteinaufreinigung. Nach Zugabe der Fluorophore reagiert das Cystein des Proteins in einer Additionsreaktion mit dem über einen Linker an den Fluorophor gebundenen Maleimid (3.2). Das lyophilisierte Protein wurde in Entfaltungspuffer (pH 7,5) mit 10-fachem Überschuss TCEP aufgenommen und ein Gesamtvolumen von 500 µl eingestellt. Durch die Zugabe von TCEP wurden unerwünschte Disulfidbrücken aufgebrochen und somit das in die Proteinsequenz eingebrachte Cystein für die Additionsreaktion zugänglich gemacht. Die Zugabe des Alexa-Maleimids erfolgte unter Schütteln (200 rpm, Raumtemperatur) in 3 Schritten im Abstand von je 1 h. Die Endkonzentration des Alexa-Maleimids entsprach der 10-fachen Konzentration des zu markierenden Proteins. Nach der letzten Zugabe wurde die Reaktionslösung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und die Reaktion am nachfolgenden Tag durch Zugabe von Cystein, mit einer dem Alexa-Maleimid entsprechenden Endkonzentration, abgestoppt. Die Markierungseffizienz wurde anschließend auf einem TAU-Gel überprüft. Hierfür wurden jeweils 2 µg des markierten und des nicht markierten Histonproteins eingesetzt. Mit Hilfe des Typhoon-Scanners (3.7.12) kann die Fluoreszenz der eingesetzten Histonproteine analysiert werden. Das Verhältnis der

einzelnen Histonproteine und die Markierungseffizienz kann durch eine Silberfärbung (0) quantifiziert werden.

4.8. Absorptionsspektroskopie

Unter Absorption versteht man die exponentielle Abnahme der Lichtintensität I_0 die auftritt, wenn Licht einer bestimmten Intensität I eine Probe mit Schichtdicke d durchläuft. Die Abnahme der Intensität hängt von dem probenspezifischen Extinktionskoeffizienten ε ab, welcher ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der wellenlängenabhängigen Absorption eines Photons ist [47]:

$$I = I_0 \times e^{-\varepsilon d}$$

Formel 27

Die Transmission T beschreibt die Durchlässigkeit des Mediums und ergibt sich aus den Intensitäten I und I_0 :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Formel 28

Die Absorption A einer Probe, die in wässriger Lösung in einer bestimmten Konzentration c vorliegt, lässt sich über der Lambert-Beer'sche-Gesetz (Formel 29) beschreiben.

$$\lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} = \varepsilon \times c \times d = A$$

Formel 29

Die Konzentration c von DNA, Oktameren und Nukleosomen kann daher spektroskopisch über die Absorption A bestimmt werden, die bei der Wellenlänge des jeweiligen Absorptionsmaximums gemessen wurde.

Tabelle 19: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proben

Probe	λ_{\max}	ε [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]
DNA (160 bp)	260 nm	2,112
Histon Oktamer	278 nm	40380
Histon H2A	278 nm	4050
Histon H2B	278 nm	6070
Histon H3	278 nm	4040
Histon H4	278 nm	5400
Alexa488	495 nm	73000
Alexa594	590 nm	90000

Bei fluoreszenzmarkierter DNA oder Oktameren muss die für λ_{\max} ermittelte Extinktion jedoch um die anteilige Extinktion des jeweiligen Fluorophors bereinigt werden. Unter Berücksichtigung der vom Hersteller angegebenen Korrekturfaktoren ergeben sich folgende Gleichungen:

$$A_{DNA} = A_{260nm} - 0,3 \times A_{495} - 0,43 \times A_{590}$$

Formel 30

$$A_{Okt} = A_{278nm} - 0,11 \times A_{495} - 0,56 \times A_{590}$$

Formel 31

Anschließend lässt sich die jeweilige Markierungseffizienz ME mittels folgender Gleichungen berechnen:

$$ME_{DNA} = \frac{c_{Fluorophor}}{c_{DNA}}$$

Formel 32

$$ME_{Okt} = \frac{c_{Fluorophor}}{c_{Okt}}$$

Formel 33

4.9. Messung der Fluoreszenzanisotropie

Die Anisotropie von fluoreszenzmarkierten Histonproteinen und DNAs wurde mit Hilfe eines Fluorimeters (3.7.11) bestimmt. Hierfür wurden Filter in dessen Strahlengang eingesetzt, welche die Polarisationsrichtung des Anregungslichts verändern und die Detektion von horizontaler oder vertikaler Emission ermöglichen. Für die Messungen wurde nacheinander mit horizontal und vertikal polarisiertem Licht angeregt und separat die Intensität der horizontal und vertikal polarisierten Emission gemessen. Für die Berechnung der Anisotropie muss berücksichtigt werden, dass sich die Transmissionseffizienz des Monochromators für horizontal und vertikal polarisiertes Licht unterscheidet. Der benötigte Korrekturfaktor (G , Formel 34) kann aus dem Verhältnis der detektierten Emissionsintensitäten von horizontal und vertikal polarisiertem Licht nach Anregung mit horizontal polarisiertem Licht bestimmt werden.

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Formel 34

$$\frac{I_2}{I_1} = \frac{I_{VV}}{I_{HV}} \times \frac{1}{G}$$

Formel 35

$$r = \frac{\frac{I_2}{I_1} - 1}{\frac{I_2}{I_1} + 2}$$

Formel 36

G	Korrekturfaktor für den Monochromator
I_{xy}	Intensität bei Anregung mit x polarisiertem Licht und y polarisierter Emission
H	Horizontal polarisiert
V	Vertikal polarisiert
r	Anisotropie

Die Messung der Anisotropie für Alexa488 erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 495$ nm, und die Emission wurde bei $\lambda = 523$ nm detektiert. Für Alexa594 wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 585$ nm und Detektion bei $\lambda = 616$ nm verwendet.

4.10. Restriktionsanalyse von Nukleosomen

Die Positionierung der Nukleosomen kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Enzyme und Puffer: Fermentas) überprüft werden. Die verwendete 210 bp Widom-601 DNA-Sequenz weist 49 bp vom Ende der DNA entfernt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Hinfi* auf, während sich die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PmlI* 49 bp vom anderen Ende der DNA befindet. Für die Restriktionsanalyse wurde jeweils 1 pmol der Nukleosomen 1:10 im entsprechenden Standard-Restriktionspuffer (Fermentas) verdünnt und das jeweilige Restriktionsenzym ebenfalls 1:10 zu dem Ansatz gegeben. Für *Hinfi* wurde der Puffer *red* und für *PmlI* der Puffer *yellow* verwendet. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert und anschließend auf ein Acrylamidgel aufgetragen.

4.11. FRET-Messungen

Die FRET-Effizienz der fluoreszenzmarkierten Nukleosomen kann entweder im Molekülensemble oder in Einzelmolekülmessungen bestimmt werden. Im Folgenden werden die Durchführung, die notwendigen Vorbereitungen sowie die Probenpräparation für beide Methoden vorgestellt.

4.11.1. **Vorbereitung der Messkammern**

Um Messungen an Nukleosomen in 384-Loch Mikrotiterplatten durchführen zu können, müssen die Platten zuvor gereinigt und beschichtet werden. Ohne entsprechende Beschichtung kann es zu Adsorptionseffekten kommen, was wiederum zum Verlust bzw. Zerfall der Proben führen kann. Alle Kammern der Platten wurden daher zuerst 5 - 6 mal mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit Hellmanex (Hellma GmbH & Co. KG) (1%) inkubiert und währenddessen geschüttelt. Nach der Inkubation wurde das Hellmanex mit ddH₂O aus den Kammern gewaschen, bis kein Schaum mehr entstand. Der Reinigungsschritt mit Hellmanex und das anschließende waschen mit ddH₂O wurden noch einmal wiederholt. Im nächsten Schritt wurde die Oberfläche der Kammern mit 0,1 M HCl aktiviert. Es wurden dafür alle Kammern der Platte befüllt und wiederum unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Aktivierungsschritt wurde noch einmal wiederholt, die Platte anschließend gründlich mit ddH₂O ausgewaschen und für ca. 1 h unter einem Abzug getrocknet. Für die Beschichtung wurden 60 µl Sigmacote in jede Kammer gefüllt und für 20 – 30 sec inkubiert. Nach dieser Einwirkzeit wurde die Platte ein letztes Mal gründlich mit ddH₂O gewaschen und abermals unter dem Abzug getrocknet.

4.11.2. **Typhoon Messungen**

Für Messungen im Molekülensemble wurde der Typhoon-Scanner verwendet, da hiermit gleichzeitig sehr viele fluoreszierende Proben gleichzeitig vermessen werden können. Für Nukleosomen konnte so eine Salzreihe von 50 mM - 1,2 M NaCl mit mehreren technischen Replikaten innerhalb weniger Minuten gemessen werden. Bei solchen Messungen betrug die finale Probenkonzentration 300 pM. Die verschiedenen Salzpuffer wurden aus zuvor gefiltertem TE-Puffer und 4 M NaCl TE-Puffer hergestellt. Die Puffer wurden mit Vitamin C (0,8 mM) für die Photostabilität der Fluorophore und Nonidet P40 (Roche Diagnostics) (0,01 %) als Detergenz versetzt. Beide Komponenten wurden jeweils frisch in TE-Puffer angesetzt bzw. verdünnt und anschließend zu jedem einzelnen Messpuffer hinzugefügt. Nachdem alle Puffer angefertigt waren, wurden diese in Triplikaten mit einem Volumen von 50 µl in der Mikrotiterplatte gescannt. Erst wenn sichergestellt werden konnte, dass kein Puffer Verunreinigungen aufwies, wurde je 5,1 µl einer 10 nM Nukleosomen-Lösung in „low-binding“ Mikroreaktionsgefäßen mit 164,9 µl des jeweiligen Salzpuffers für 1 h inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Probe in Triplikaten mit einem Volumen von 50 µl in die Mikrotiterplatte überführt und am Ende der Inkubationszeit auf dem Typhoon-Scanner gemessen. Während der Messung wurden Daten aus drei verschiedenen Kanälen mit den folgenden Einstellungen aufgenommen:

Tabelle 20: Für die Ensemblemessungen verwendete Einstellungen für den Typhoon-Scanner

	Kanal	Fluorophor	Anregungswellenlänge	Detektionsfilter	Detektorspannung
E_D	Donor	Alexa488	488 nm	520 BP40	625 V
E_A	Akzeptor	Alexa594	532 nm	610 BP30	675 V
E_T	Transfer	Alexa594	488 nm	610 BP30	625 V

4.11.3. SpFRET-Messungen

Einzelmolekülmessungen können mit dem spFRET Aufbau in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Im Gegensatz zu Messungen im Molekülensemble können dabei verschiedene Populationen und somit verschiedene Zustände der Nukleosomen detektiert werden. Für die Justage des Setups wurde eine Alexa488 Probe mit einer Konzentration von 1 – 2 nM verwendet. Anschließend wird in einer 5 – 10 minütigen Messung die Reinheit der Puffer überprüft und deren Hintergrundsignal bestimmt. Um das Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal zu bestimmen, wurde eine Alexa488 markierte DNA in der Messkonzentration von 50 pM gemessen. Für die Herstellung der verschiedenen Nukleosomenproben wurden markierte und die entsprechenden unmarkierten Nukleosomen einer Konzentration von 10 nM im Verhältnis 1 + 5 (markiert + unmarkiert) gemischt und je 3 μ l des Gemisches in 97 μ l Messpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messungen erfolgten wie bei dem Typhoon-Scanner in Salzpuffern verschiedener NaCl-Konzentrationen mit Vitamin C und Nonidet P40. Die finale Nukleosomenkonzentration betrug wie bei Ensemblemessungen 300 pM, wobei nur 50 pM davon fluoreszenzmarkiert waren. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Probe in die Mikrotiterplatte überführt und für 17 min mit einer Laserintensität von 50 μ W gemessen. Die Aufzeichnung der Messungen erfolgte über eine Einzelphotonenzählerkarte (TimeHarp200, PicoQuant GmbH), welche das Signal über einen Router (PRL400, PicoQuant GmbH) an den Computer weiterleitet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FRETtchen und IgorPro (siehe Abschnitt 3.8.2 und 3.8.3).

4.11.4. ALEX-Messungen

Die Präparation der Proben für ALEX-Messungen entspricht der Probenpräparation für spFRET-Messungen (4.11.3). Die alternierende Anregung ermöglicht, neben der Bestimmung der *Proximity Ratio*, die Bestimmung des Stöchiometriefaktors und gibt somit Informationen über den Markierungsgrad der zu analysierenden Probe. Diese Information ist von besonderer Relevanz bei der Betrachtung von proteinmarkierten Nukleosomen, da das Histon-Oktamer jeweils zwei Kopien der vier Proteine enthält. Durch ALEX kann den

detektierten *Proximity Ratios* ebenfalls eine bestimmte Stöchiometrie zugeordnet werden. Dies ermöglicht eine bessere Unterscheidung potentiell auftretender Subpopulationen als mit Einfarbenanregung. In dieser Arbeit wurden Konstrukte verwendet, die eine Donormarkierung an einem Histonprotein und eine Akzeptormarkierung auf der DNA aufwiesen. Tabelle 21 gibt einen Überblick über alle in dieser Arbeit möglichen Subpopulationen und deren Stöchiometriefaktoren.

Tabelle 21: Stöchiometrie der möglichen Subpopulationen

Donor	Akzeptor	Stöchiometrie
1	0	1
2	0	1
2	1	0,6-0,7
1	1	0,5
0	1	0

Die Verteilung der beschriebenen Subpopulationen hängt sowohl von dem Markierungsgrad als auch von dem Zustand der Nukleosomen ab. Falls die Distanz zwischen Donor und Akzeptor bei doppeltmarkierte Nukleosomen zu groß ist, um einen FRET-Übertrag zu ermöglichen, weist diese Probe eine *Proximity Ratio* von $PR \sim 0$ und einen Stöchiometriefaktor von $S = 0,5$ auf. Dies ist der Fall, wenn die Markierungspositionen bereits im geschlossenen Zustand zu weit voneinander entfernt sind oder sich die Distanz durch Konformationsänderungen während der Öffnung ändert. Anders verhält es sich für zerfallene, doppeltmarkierte oder unzureichend markierte Nukleosomen. Diese weisen ebenfalls eine *Proximity Ratio* von $PR \sim 0$ auf, besäßen jedoch Stöchiometriefaktoren von $S = 0$ sowie $S = 1$.

Die Aufzeichnung der Daten erfolgte auch in diesem Fall über die TimeHarp. Lediglich für die Ansteuerung der beiden Laser wurde die von Sebastian Isbaner programmierte Software ALEXControl verwendet (3.8.4). Die Intensität beider Laser oberhalb des Objektivs wurde für die Justage auf jeweils $10 \mu\text{W}$ eingestellt und eine 100 % doppeltmarkierte DNA verwendet. Anschließend wurde eine 10 minütige ALEX-Messung durchgeführt. Jede ALEX-Messung wies eine Donor- bzw. Akzeptoranregungszeit von $T_1 = T_3 = 100 \mu\text{s}$ und eine Pause zwischen den Anregungen von $T_2 = T_4 = 10 \mu\text{s}$ auf. Der Stöchiometriefaktor einer 100 %ig doppelt markierten DNA sollte eine Stöchiometrie von $S = 0,5$ aufweisen. Falls für die Testmessung eine Verschiebung des Stöchiometriefaktors auftritt, kann dieser über die Laserintensitäten auf $S = 0,5$ eingestellt werden. Anschließend wurden das Hintergrundsignal des Puffers, die direkte Anregung des Akzeptors sowie das Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit ALEXEval und IgorPro (siehe Abschnitt 3.8.2 und 3.8.5).

4.11.5. **Einzelmolekül-Multiparameter Fluoreszenz-Messungen**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Seidel (Molekulare physikalisch Chemie – Universität Düsseldorf) könnten Einzelmolekül-Multiparameter Fluoreszenz-Messungen (*single-molecule multiparameter fluorescence detection - smMFD*) durchgeführt werden. Bei dieser Methode kann neben der FRET-Effizienz auch die Anisotropie und die Lebenszeit der jeweiligen Fluorophore detektiert werden [48]. Da die Lebenszeit des Donor direkt durch die FRET-Effizienz und die Anisotropie durch die Dynamik des markierten Objekt beeinflusst werden, können mit Hilfe dieser Parameter statische und dynamische FRET-Populationen unterschieden werden [49].

4.12. **Grobkörnige (Coarse grained) Simulationen**

Die Simulationen der H3-Histonschwanz Dynamik wurden am Weizmann Institute of Science in der Arbeitsgruppe Levy (Computational Molecular Biophysics) durchgeführt. Für die Simulationen wurde die Kristallstruktur des Nukleosoms (PDB: 1KX5, [30]) verwendet. Der verwendete Code basiert auf einem topologiebasiertem Model (GO-Model, [50]). Jede Aminosäure wird in der Simulation durch eine Kugel und jedes Nukleotid durch drei Kugeln dargestellt. Allerdings wurden die DNA-Kugeln immobilisiert und lediglich die Bewegungen der AS-Kugeln berücksichtigt.

5. Ergebnisse

In dieser Arbeit wird zum einen der Einfluss von Mutationen in der $\alpha 3$ -Region des Histonproteins H2A auf die Stabilität und den Öffnungsmechanismus des Nukleosoms analysiert. Zum anderen werden die Dynamik und die intranukleosomale Wechselwirkungen des H3-Histonschwanzes genauer charakterisiert. Im Folgenden werden zuerst die Probenpräparation und die durchgeführten Messungen der H2A-Mutanten vorgestellt, bevor im zweiten Teil die Ergebnisse der Probenpräparation und der durchgeführten Messungen der H3-Mutanten dargestellt werden.

5.1. Einfluss von Mutationen der H2A $\alpha 3$ -Region auf die Nukleosomenarchitektur

Um den Einfluss der einzelnen Mutationen im Bereich der $\alpha 3$ -Region des Histonproteins H2A auf die Stabilität und den Öffnungsmechanismus des Nukleosoms analysieren zu können, wurden die im Folgenden dargestellten Vorarbeiten durchgeführt.

Die Klonierung und Aufreinigung einiger H2A-Mutanten wurde in Zusammenarbeit mit den in Tabelle 22 aufgeführten Praktikanten durchgeführt.

Tabelle 22: Hergestellte H2A-Mutanten

H2AR88A H2AR81AR88A	Andrea Breitkopf
H2AR81E H2AR88E	Johanna Mehl
H2AR81ER88E	Martin Würtz

5.1.1. Klonierung und Proteinaufreinigung der H2A-Mutanten

Alle H2A-Mutanten wurden wie unter 4.1.1 beschrieben in den pet17b-Vektor kloniert und mittels Restriktionsanalyse und anschließender Sequenzierung überprüft. Die so erhaltenen Plasmide wurden für die Proteinexpression und -aufreinigung verwendet. Aus Bakterienkulturen mit einem Volumen von 400 – 800 ml konnten nach erfolgreicher Überexpression 2 - 4 mg reines Protein gewonnen werden. Abbildung 21 zeigt eine exemplarische Absorptionsmessung während der durchgeführten Größenchromatographie.

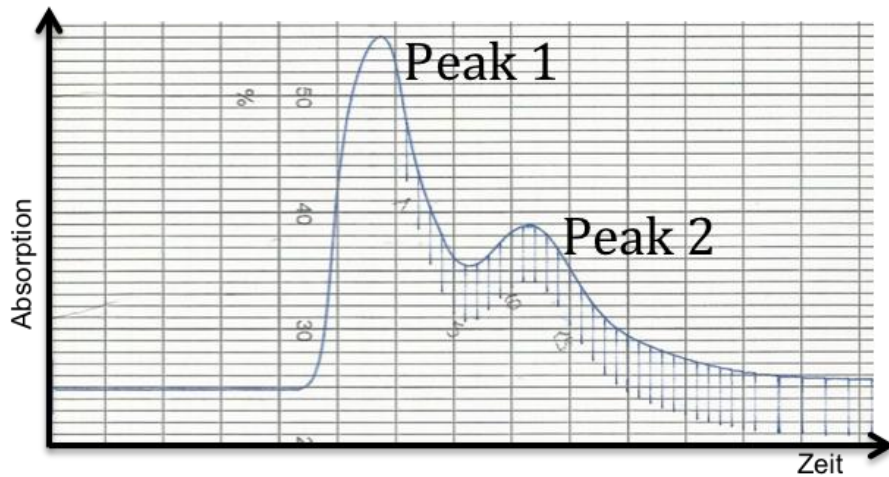


Abbildung 21: Absorption während der größenchromatografischen Auftrennung von H2AR81AR88A nach Überexpression. Durchgezogene, blaue Linie: gemessene Absorption in Abhängigkeit der Zeit; Vertikale Striche: Einzelnen Fraktionen

Die Proteine werden hierbei der Größe nach - von groß nach klein - von der Säule eluiert. Bei der Aufreinigung von Histonproteinen erhält man bei einer Flussrate von 3 ml/min die ersten Fraktionen nach ca. 20 min. In dem ersten erkennbaren Peak (vgl. Abbildung 21) sind Proteine enthalten, die größer als die Histonproteine sind. Der zweite Peak enthält Proteine in der Größenordnung der Histonproteine. Die entsprechenden Fraktionen wurden zur Kontrolle wie unter 4.3.4 beschrieben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Lediglich Fraktionen, die eine Bande von ca. 11 kDa aufwiesen, wurden für die anschließende Ionen-Austausch-Chromatographie weiterverwendet. Hierbei werden Proteine ähnlicher Größe durch sukzessive Erhöhung der KCl-Konzentration ihrer Ladung nach aufgetrennt (Abbildung 22). Histonproteine werden üblicherweise bei einem Mischungsverhältnis der beiden KCl-Puffer

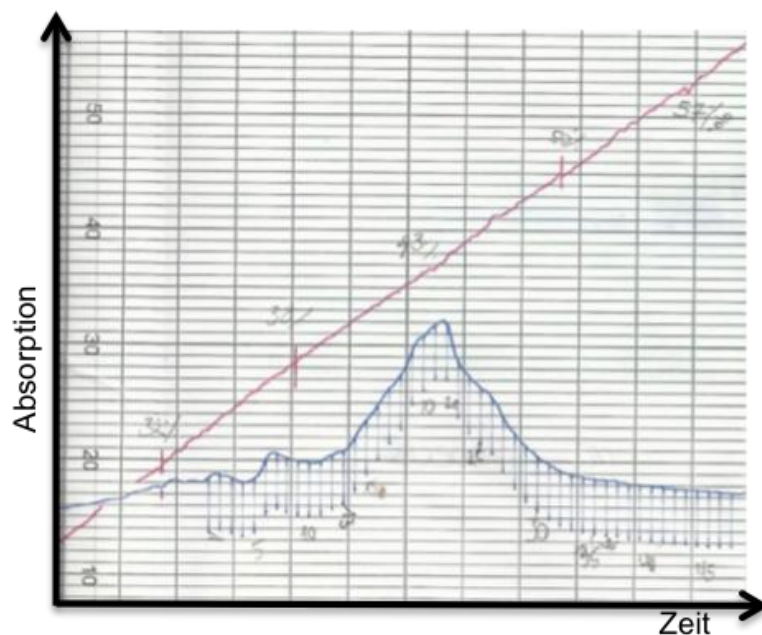


Abbildung 22: Absorption während der Ionen-Austausch-Chromatographie von H2AR81AR88A. Durchgezogene, blaue Linie: gemessene Absorption; Vertikale Striche: einzelnen Fraktionen; Rote Linie: ansteigende KCl-Konzentration.

von 38 - 50% eluiert, welches einer KCl-Konzentration von etwa 0,38 - 0,50 M entspricht. Die so erhaltenen Fraktionen wurden zur Analyse wiederum auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurde das Wildtyp-H2A-Protein aufgetragen und im Weiteren lediglich Fraktionen verwendet, die eine Bande der gleichen Größe aufwiesen. Diese Fraktionen wurden vereint, lyophilisiert und anschließend in Entfaltungspuffer aufgenommen. Abbildung 23 zeigt ein TAU-Gel der hergestellten, mutierten H2A-Proteine nach erfolgreicher Aufreinigung im Vergleich zum Wildtyp-H2A.

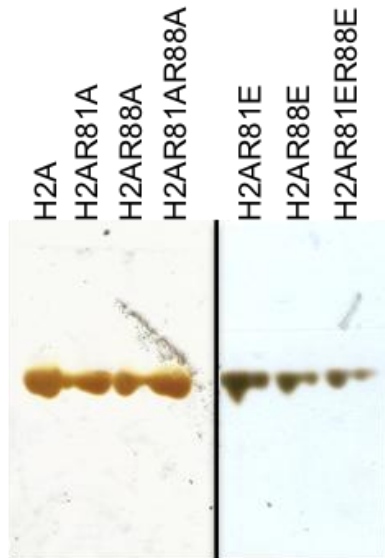


Abbildung 23: TAU-Gel der mutierten H2A-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-H2A. Es wurde jeweils 1 µg der einzelnen Proteine aufgetragen.

Nur mutierten H2A-Proteine, die auf dem TAU-Gel lediglich eine Bande auf der Höhe des Wildtyp-H2A aufwiesen, wurden anschließend für die Rekonstitution von Histon-Oktameren verwendet.

5.1.2. Oktamer- und Nukleosomenrekonstitution mit H2A-Mutanten

Die Rekonstitution der Oktamere erfolgte wie unter 4.4 beschrieben. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 1 mg angesetzt. Abbildung 24 zeigt ein TAU-Gel der aufgereinigten Histonoktamere unter Verwendung von je einer der generierten H2A-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Oktamer und den einzelnen Histonproteinen.

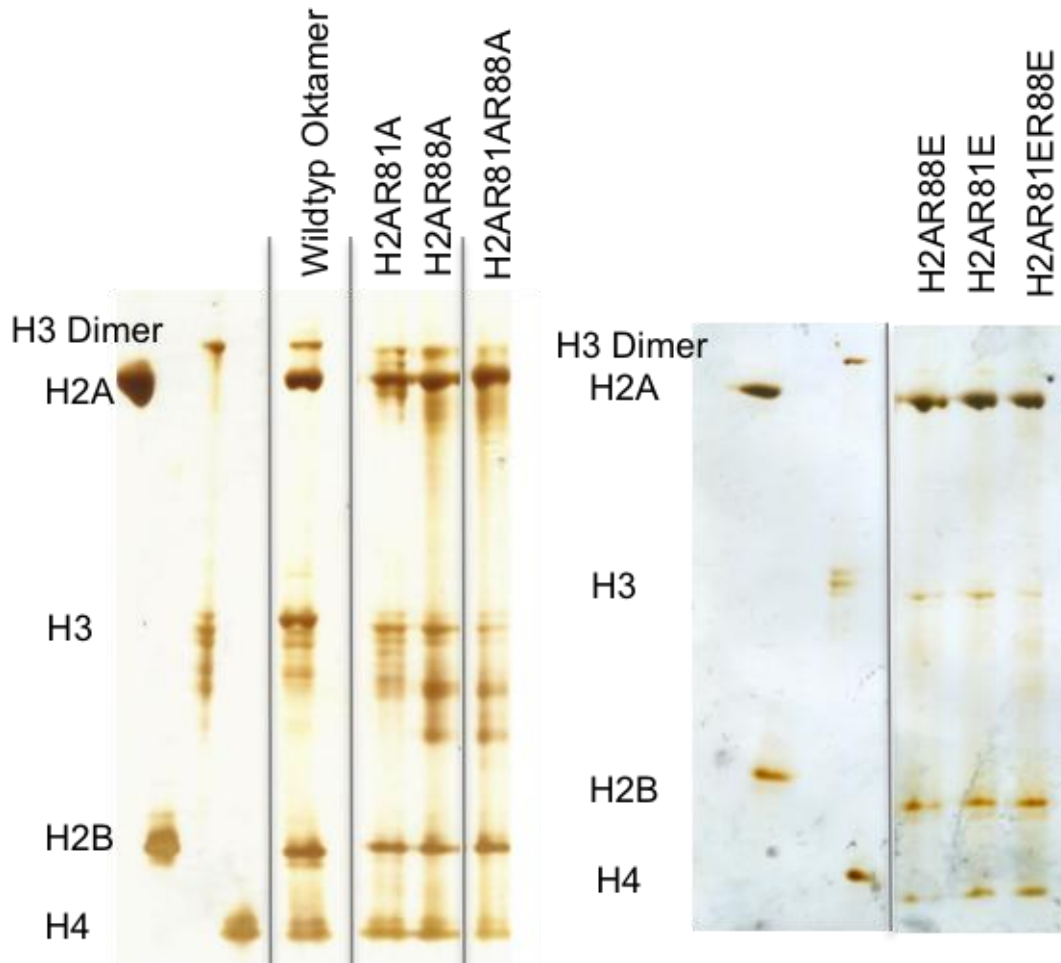


Abbildung 24: TAU-Gel der rekonstituierten Oktamere im Vergleich zum Wildtyp Oktamer und der einzelnen Histonproteine. Es wurde je 1 μg der reinen Histonproteine und je 4 μg der Oktamere aufgetragen

Die dargestellten Oktamere enthalten alle vier Histonproteine, was ein erstes Zeichen für eine erfolgreiche Rekonstitution unter Verwendung der H2A-Mutanten ist. Die entsprechenden Oktamere wurden anschließend für die Rekonstitution von Nukleosomen verwendet. Da es wichtig ist, dass während der Nukleosomen-Rekonstitution weder ein Überschuss an freier DNA, noch Protein-Aggregate entstehen, muss zuerst das geeignete Verhältnis von Histonoktameren zu DNA (Tabelle 23) ermittelt werden. Dies erfolgte mit unmarkierter, 170 bp langer DNA. Die Verhältnisse wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Johanna Mehl¹, Martin Würtz² und Maria Mildenerberger³ ermittelt.

Tabelle 23: Für die Rekonstitution von Nukleosomen ermittelte Verhältnisse von DNA zu Oktamer

Oktamer mit H2A-Mutation	Verhältnis DNA : Oktamer
H2AR81A	1 : 1,70
H2AR88A	1 : 1,80
H2AR81AR88A	1 : 1,65
H2AR81E ¹	1 : 2,20
H2AR88E ¹	1 : 2,20
H2AR81ER88E ²	1 : 1,70
H2B488 H2A ³	1 : 1,80
H2B488 H2AR81A ³	1 : 1,80
H2B488 H2AR88A ³	1 : 1,80
H2B488 H2AR81AR88A ³	1 : 1,80
H2B488 H2AR81E	1 : 1,70
H2B488 H2AR88E	1 : 2,10
H2B488 H2AR81ER88E	1 : 1,90

Nachdem das beste Verhältnis von DNA zu Oktamer bestimmt war, wurde die Rekonstitution von Nukleosomen unter Verwendung einer doppeltmarkierten DNA durchgeführt. Bei dieser DNA befindet sich der Farbstoff Alexa488 an Position +41 bp und Alexa594 an Position -53 bp im Bezug auf das Zentrum der DNA-Sequenz des Nukleosoms. Die so rekonstituierten Nukleosomen mit Alanin-Mutation (RA) sind in Abbildung 25 dargestellt.

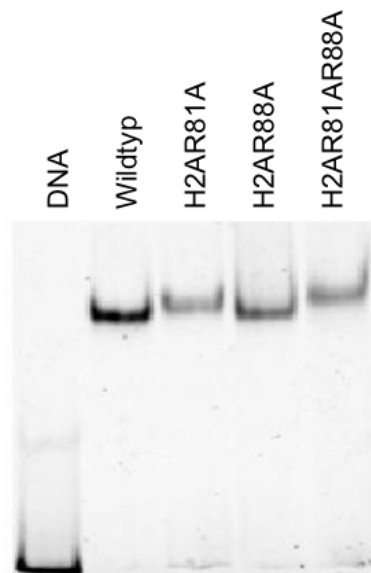


Abbildung 25: Acrylamidgel nach der Nukleosomenrekonstitution. Es wurde je 0,5 pmol Probe aufgetragen. Die verwendete DNA wurde als Größenvergleich mit aufgetragen

Durch den Größenvergleich mit der verwendeten DNA und dem Wildtyp-Nukleosom ist deutlich erkennbar, dass die Rekonstitution für alle Oktamere erfolgreich war. Außerdem ist in allen Fällen eine einzige klare Bande sichtbar, was wiederum Auskunft über die

Positionierung der Nukleosomen gibt. Falls mehrere Banden mit unterschiedlichen Laufweiten detektierbar sind, ist dies ein Zeichen für eine gemischte Population mit unterschiedlichen Positionierungen. Für die hier betrachteten Nukleosomen kann daher von einer einzigen Population von Nukleosomen ausgegangen werden. Allerdings sind Unterschiede in der Laufweite der einzelnen Nukleosomen erkennbar. Lediglich das Nukleosom in dem H2AR88A verwendet wurde, zeigt eine dem Wildtyp entsprechende Laufweite. Die Banden der beiden Nukleosomen, in denen H2AR81A und H2AR81AR88A vorhanden sind, liegen oberhalb der Bande des Wildtyp-Nukleosoms. Dies lässt sich ebenfalls für die Mutanten mit Austausch von Arginin zu Glutaminsäure detektieren. Auch bei diesen Mutanten zeigt lediglich die Mutante mit Austausch an Position 88 eine dem Wildtyp entsprechende Laufweite. Die unterschiedlichen Laufweiten lassen sich eventuell durch einen unterschiedlichen Öffnungsgrad der verschiedenen Nukleosomen erklären, da sich Teilchen mit größerem hydrodynamischem Radius langsamer durch die Gelmatrix bewegen als Teilchen mit kleinem hydrodynamischem Radius. Dies wird unter 5.1.3 näher betrachtet.

Neben den bereits beschriebenen Oktameren wurden weitere Histonoktamere hergestellt, die neben der jeweiligen H2A-Mutation ein Alexa488 markiertes H2BT112C Protein enthalten. Die weitere Analyse der resultierenden Nukleosomen ist unter 5.1.5 dargestellt.

Im ersten Schritt wurde somit gezeigt, dass sowohl Oktamere als auch intakte Nukleosomen unter Verwendung von H2A-Proteinen mit Mutation in der α 3-Region erfolgreich rekonstituiert werden können.

5.1.3. Restriktionsanalyse der Nukleosomen

Die verwendete 210 bp lange Widom-601 DNA-Sequenz enthält zwei Restriktionsschnittstellen, welche in etwa den gleichen Abstand zum Ende der DNA-Arme aufweisen. Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HinfI* befindet sich 49 bp von einem Ende der DNA entfernt, während sich die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PmlI* 43 bp vom anderen Ende der DNA entfernt befindet (vgl. Abbildung 26). Bei korrekter Positionierung werden im Wildtyp-Nukleosom beide Schnittstellen durch das Histonoktamer unzugänglich. Die Restriktionsanalyse von Nukleosomen kann somit genutzt werden um zusätzliche Informationen über die Positionierung der Nukleosomen zu erhalten. Allerdings können die Restriktionsschnittstellen auch durch strukturelle Veränderungen zugänglich werden. In einem solchen Fall bleibt die Positionierung der Nukleosomen zwar erhalten, aber die DNA-Arme weisen einen größeren Abstand zum Histonkern auf, was wiederum zur Zugänglichkeit der Restriktionsschnittstellen führt. Durch die Verwendung

einer mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markierten DNA können die beiden DNA-Arme nach erfolgter Restriktion über das Fluoreszenzsignal unterschieden werden. In Abbildung 26 sind die verschiedenen Nukleosomen nach dreistündiger Restriktionsanalyse im Vergleich zu der reinen DNA und dem Wildtyp-Nukleosom dargestellt.

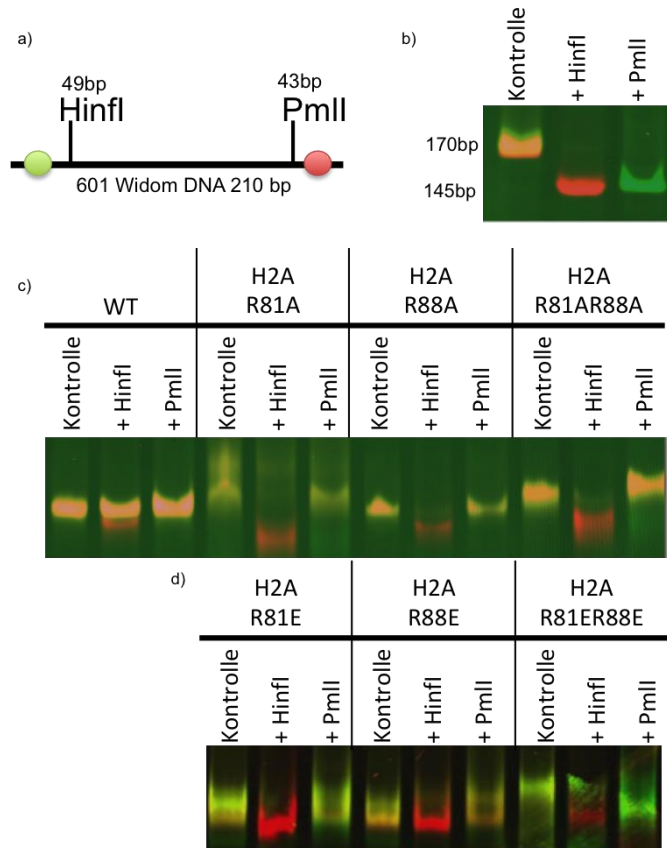


Abbildung 26: Restriktionsanalyse von Nukleosomen mit Mutation in H2A im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. a) Position der Farbstoffe und Schnittstellen im DNA-Fragment; b) 6 % PAA-Gel der verwendeten DNA; c) Restriktionsanalyse von Nukleosomen mit RA Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom, d) Restriktionsanalyse der Nukleosomen mit RE Mutation. Kontrolle: Probe in Restriktionspuffer nach dreistündiger Inkubation bei 37° C ohne Enzym, +*Hinfl*: Restriktionsanalyse mit *Hinfl*, +*PmlI*: Restriktionsanalyse mit *PmlI*.

Die Restriktionsanalyse zeigt deutlich, dass die ungebundene DNA für beide Restriktionsenzyme zugänglich ist. Im Wildtyp-Nukleosom sind hingegen beide Schnittstellen größtenteils durch das Histonoktamer blockiert. Für den Restriktionsverdau mit *Hinfl* lässt sich eine kleine Fraktion an Nukleosomen erkennen, bei denen die *Hinfl* Schnittstelle bereits zugänglich ist. Der Vergleich des Intensitätsprofils der geschnittenen und der ungeschnittenen Nukleosomenbande zeigt, dass 18 % der Wildtyp-Nukleosomen eine zugängliche *Hinfl* Schnittstelle aufweisen. Die teilweise zugängliche Schnittstelle kann über das sogenannte Nukleosomen „breathing“ erklärt werden, bei dem sich der Abstand zwischen den Enden der DNA-Arme dynamisch ändert und die Schnittstelle somit zugänglich werden kann. Da rekonstituierte Nukleosomen normalerweise in TE-Puffer mit 5 mM NaCl bei pH 7,5 bei 4 °C aufbewahrt werden, stellen die für die Restriktionsanalyse benötigten

Pufferbedingungen suboptimale Bedingungen für Nukleosomen dar. Für das Restriktionsenzym *Hinfl* werden 10 mM Tris-HCl (pH 8,5, 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl und 0,1 mg/ml BSA benötigt. Für *PmlI* beinhaltet der Puffer 33 mM Tris-Acetat (pH 7,9, 37°C), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat und 0,1 mg/ml BSA. Durch die unterschiedlichen Pufferbedingungen kann lediglich der relative Unterschied zwischen den mutierten Nukleosomen im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom betrachtet werden. Die *Hinfl*-Restriktionsanalyse in Abbildung 26 zeigt, dass diese in Nukleosomen mit H2AR81A-, H2AR81AR88A-, H2AR81E- und H2AR81ER88E-Mutation zu 100% geschnitten werden kann. Die entsprechende Schnittstelle ist in Nukleosomen mit H2AR88A-Mutation zu 81 % und mit H2AR88E-Mutation zu 85% zugänglich. Bei der Restriktionsanalyse mit *PmlI* ist die Schnittstelle in Nukleosomen mit H2AR81A-, H2AR81AR88A- und H2AR81E-Mutation teilweise zugänglich. Aus dem Intensitätsprofil der Nukleosomenbanden lässt sich entnehmen, dass bei Nukleosomen mit H2AR81A-Mutation 11 %, bei H2AR81AR88A-Mutation 15 % geschnitten wurden. Lediglich für Nukleosomen mit H2AR81E-Mutation und H2AR81ER88E-Mutation ist die *PmlI*-Restriktionsschnittstelle unter diesen Bedingungen zu 100 % zugänglich.

Durch die Restriktionsanalyse konnte also gezeigt werden, dass die Restriktionsschnittstellen durch die Mutationen zugänglich werden. Dieser Effekt lässt sich hinsichtlich der Position (1) und der Ladung (2) der eingebrachten Mutation unterteilen:

- 1) R88 < R81 < R81R88
- 2) RA < RE

Um diesen Effekt weiter zu charakterisieren, werden im Folgenden die Ergebnisse der Stabilitätsmessungen im Molekülensemble und Einzelmolekülmessungen betrachtet.

5.1.4. Stabilitätsmessungen von Nukleosomen mit H2A-Mutation

Um die Stabilität von Nukleosomen zu vergleichen, bietet sich die Verwendung der doppeltmarkierten DNA (Alexa488: +41 bp; Alexa594: -53 bp) an. Da die FRET-Effizienz ein Maß für die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren ist, lassen sich hierüber Rückschlüsse auf die Topologie der DNA ziehen. In der ungebundenen, linearen DNA ist der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren mit 94 bp (ca. 32 nm) zu groß für einen strahlungsfreien Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren. Im intakten Nukleosom kommen die beiden Fluorophore durch die Struktur des Nukleosoms in einen Abstand (ca. 6 nm) in dem ein mittleres FRET-Signal ($PR \approx 0,39$) detektierbar ist. Aus

diesem Grund ist es möglich, das Öffnen des Nukleosoms indirekt über die strukturellen Veränderungen der DNA zu verfolgen. Diese Messungen können sowohl im Molekülensemble, als auch über Einzelmolekülmessungen durchgeführt werden.

Ensemblemessungen von Nukleosomen mit H2A-Mutation

Die Messungen im Molekülensemble erfolgten grundsätzlich bei einer Nukleosomenkonzentration von 300 pM. Die Proben wurden für 1 h in den entsprechenden Puffern mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen inkubiert, und anschließend die Fluoreszenz mit dem Typhoon-Scanner gemessen. Dazu wurden drei verschiedene Bilder, je eins für den Donor-, den Akzeptor- und den FRET-Kanal aufgenommen. Aus den Intensitätsprofilen der einzelnen Kanäle kann die *PR* für jede Probe bestimmt werden. Jede Pufferbedingung wird hierbei in technischen Triplikaten gemessen, anschließend wird die mittlere *PR* bestimmt. Für die weitere Analyse kann zum einen die mittlere *PR* für jede NaCl-Konzentration bestimmt werden und deren Abhängigkeit über einen sigmoidalen Fit beschrieben werden (Abbildung 27 und Abbildung 28). Zum anderen kann jede einzelne Messung über einen sigmoidalen Fit beschrieben werden und anschließend der Mittelwert der resultierenden Wendepunkte bestimmt werden (Abbildung 29).

Abbildung 27 zeigt die normierte *PR* in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration aller Nukleosomen mit RA-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom unter Verwendung der doppelt-intern markierten DNA (Alexa488: +41 bp; Alexa594: -53 bp).

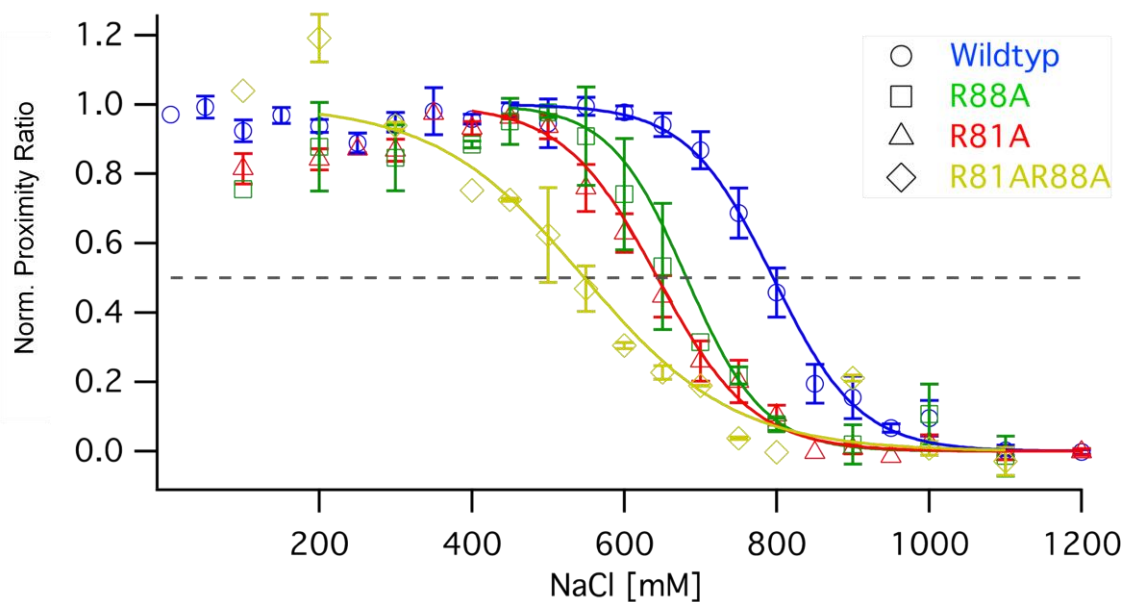


Abbildung 27: Normierte Nukleosomenfraktion für Nukleosomen mit RA-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. Blau: Wildtyp, Grün: H2AR88A, Rot: H2AR81A, Gelb: H2AR81AR88A

Die normierte PR in Abbildung 27 konnte für alle Nukleosomen über einen sigmoidalen Fit beschrieben werden. Allerdings unterscheidet sich die Steigung der Fits im Wendepunkt zwischen dem Wildtyp-Nukleosom und den einzelnen Mutanten. Dies ist ein erster Hinweis dafür, dass die Interaktion an den Kontaktpunkten zwischen dem Histonoktamer und der DNA durch die Mutation geschwächt sein könnte (siehe 1.1).

Über den Wendepunkt kann die NaCl-Konzentration bei der 50 % der Nukleosomen zerfallen sind bestimmt werden. Dieser $c_{1/2}$ -Wert kann daher als Maß für die Stabilität der Nukleosomen betrachtet werden. Die $c_{1/2}$ -Werte der mutierten Nukleosomen sind im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom zu niedrigeren NaCl-Konzentrationen verschoben. Der Vergleich aller RA-Mutanten ergibt folgenden Trend für die Stabilität S

$$S_{\text{Wildtyp}} > S_{R88A} > S_{R81A} > S_{R81AR88A}$$

Der Einfluss der Mutationen auf die Stabilität stimmt somit mit dem zuvor unter 5.1.3 beschriebenen Trend im Bezug auf die Position der Mutation überein.

Um den zweiten unter 5.1.3 beschriebenen Trend bezüglich der Ladung der eingebrachten Mutation zu überprüfen, wurden ebenfalls die $c_{1/2}$ -Werte für die RE-Mutanten bestimmt. Die gemittelten Messwerte wurden auch in diesem Fall über einen sigmoidalen Fit beschrieben (Abbildung 28).

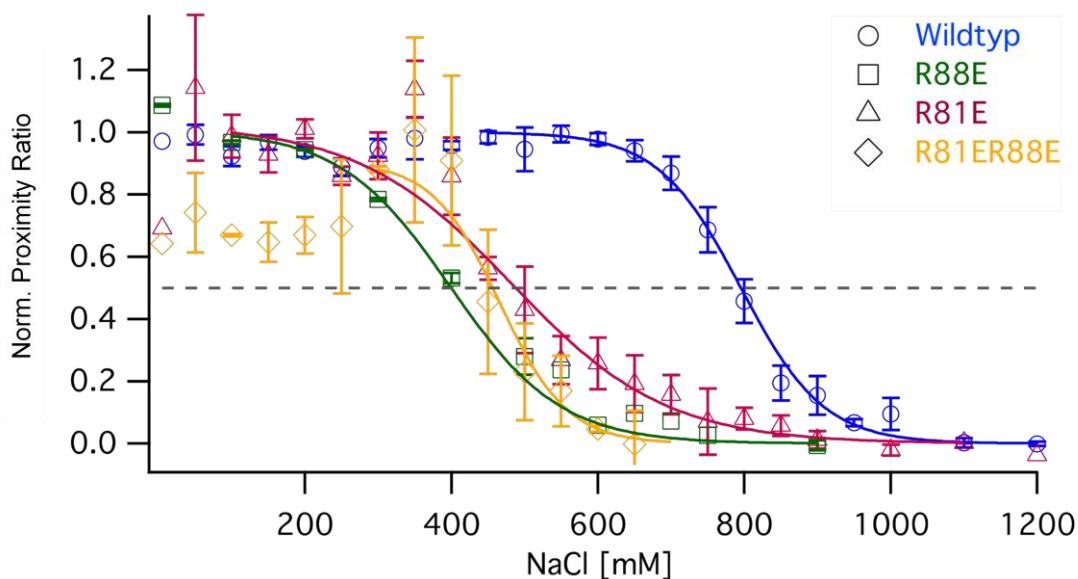


Abbildung 28: Normierte Nukleosomenfraktion für Nukleosomen mit RE-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. Blau: Wildtyp, Dunkelgrün: H2AR88E, Bordeaux: H2AR81E, Orange: H2AR81ER88E

Die Ensemblemessungen für Nukleosomen mit RE-Mutation unterscheiden sich deutlich von denen der Wildtyp-Nukleosomen. Der Kurvenverlauf für RE-Mutanten ist wie für die RA-Mutanten zu niedrigen NaCl-Konzentrationen verschoben. Es ist somit deutlich erkennbar, dass die eingeführten Mutationen zu einer verringerten Stabilität führen. Allerdings kann der Kurvenverlauf für Nukleosomen mit R81E- bzw. R81ER88E- kaum noch durch eine sigmoidale Funktion beschrieben werden. Für diese Nukleosomen lässt sich die „Schulter“, welche bereits im Wildtyp-Nukleosom im Bereich von 400 – 700 mM NaCl erkennbar ist, verstärkt detektieren. Da es bei Ensemblemessungen nicht möglich ist, Informationen über die Verteilung der Subpopulationen zu erhalten, liegt die Vermutung nahe, dass die Höhe der „Schulter“ durch strukturelle Veränderungen hervorgerufen sein könnte, die durch präparative Unterschiede zwischen den Nukleosomen auftreten könnten. Um solche Effekte bei der Auswertung zu berücksichtigen wurden zusätzlich spFRET-Messungen (siehe: Einzelmolekülmessungen von Nukleosomen mit H2A-Mutation) durchgeführt. Als alternative Auswertung wurde an die einzelnen Ensemblemessungen ein sigmoidaler Fit angelegt und der Mittelwert der so erhaltenen $c_{1/2}$ Werte bestimmt. Abbildung 29 gibt einen Überblick über die gemittelten $c_{1/2}$ Werte von allen H2A-Mutanten.

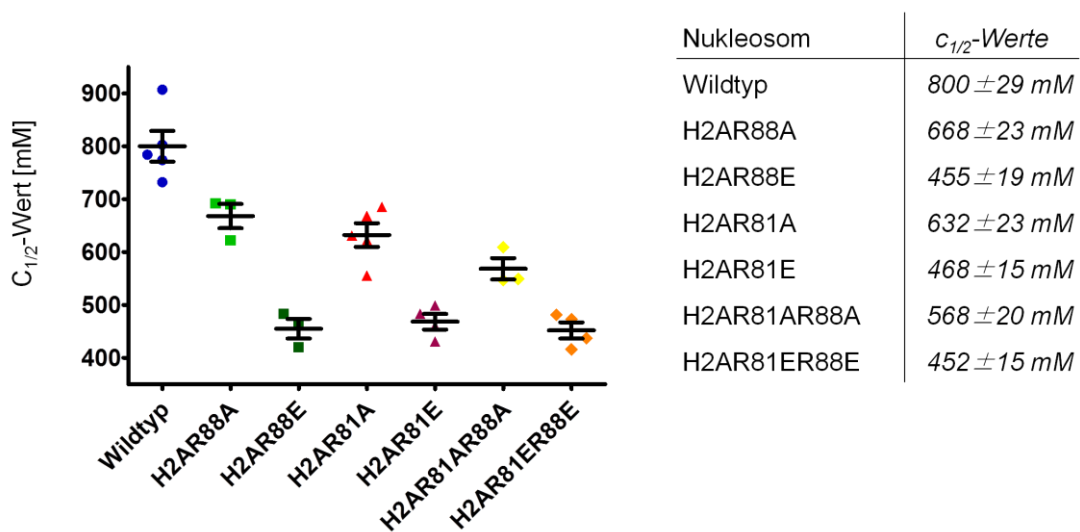


Abbildung 29: Mittlere $c_{1/2}$ -Werte für Nukleosomen mit H2A-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. Links: Blau: Wildtyp-Nukleosom, Grün: H2AR88A-Mutante, Rot: H2AR81A-Mutante, Gelb: H2AR81AR88A-Mutante, Dunkelgrün: H2AR88E-Mutante, Bordeaux: H2AR81E-Mutante, Orange: H2AR81ER88E-Mutante; Rechts: $c_{1/2}$ -Werte und Standardfehler der jeweiligen Nukleosomen.

Aus den ermittelten $c_{1/2}$ -Werten lässt sich somit entnehmen, dass der Einfluss der eingebrachten Mutationen von zwei Faktoren beeinflusst wird. Zum einen spielt bei RA-Mutanten die Position der Mutation eine entscheidende Rolle, da eine Mutation an Position 81 zu einer stärkeren Destabilisierung führt, als eine Mutation an Position 88 (1). Zum anderen ist die Ladung der eingebrachten Aminosäure wichtig für die Stabilität. So lässt sich

für RE-Mutation ein destabilisierender Effekt beobachten, welcher signifikant stärker ist als bei RA-Mutation (2).

Der Einfluss der Mutationen hinsichtlich der Stabilität der Nukleosomen lässt sich somit in die zwei unter 5.1.3 bereits eingeführten Kategorien unterteilen:

- 1) Einfluss der Position der einbrachten Mutation
R88A < R81A < R81AR88A.
- 2) Einfluss der Ladung der eingebrachten Mutation
RA < RE.

Um die statistische Signifikanz der ermittelten $c_{1/2}$ -Werte zu überprüfen wurde ein einfaktorielles Anova- und ein anschließender Tukey-Test durchgeführt. Der Unterschied zwischen den gemittelten $c_{1/2}$ -Werten der betrachteten Nukleosomen lässt sich mit diesem Test bezüglich ihrer p-Werte in drei Signifikanzniveaus $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) einteilen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Ergebnisse des einfaktorielles Anova- und des Tukey-Test bezüglich der Stabilitätsunterschiede zwischen den Nukleosomen

$\Delta c_{1/2}$ [mM]	R88A	R81A	R81AR88A	R88E	R81E	R81ER88E
Wildtyp	132 ± 6 (**)	168 ± 8 (***)	232 ± 10 (***)	345 ± 15 (**)	332 ± 16 (***)	348 ± 16 (***)
R88A		36 ± 2	100 ± 4	213 ± 8 (***)	200 ± 8 (***)	216 ± 9 (***)
R81A			64 ± 3	177 ± 8 (***)	164 ± 8 (***)	181 ± 8 (***)
R81AR88A				113 ± 4	100 ± 4	117 ± 5 (*)
R88E					-13 ± 1	3 ± 1
R81E						17 ± 1

Der Unterschied zwischen den $c_{1/2}$ -Werten einer jeden Mutante und dem $c_{1/2}$ -Wert des Wildtyp Nukleosoms wird als mindestens „sehr signifikant“ (**) eingestuft (Tabelle 24). Für den Vergleich der $c_{1/2}$ -Werte der einzelnen Mutanten untereinander werden die Unterschiede häufig als nicht signifikant eingestuft. Vergleicht man jedoch die zusammengehörigen Paare, wie R81A mit R81E oder R81AR88A mit R81ER88E, werden die Unterschiede als mindestens signifikant eingestuft.

Jedoch wird bei Ensemblemessungen über die gesamte Population gemittelt, wodurch signifikante strukturelle Veränderungen während der Öffnung der Nukleosomen eventuell nicht analysiert werden können. Um weitere Informationen über den Einfluss der H2A-Mutationen auf das Öffnungsverhalten der mutierten Nukleosomen zu erhalten, wurden spFRET-Messungen durchgeführt.

Einzelmolekülmessungen von Nucleosomen mit H2A-Mutation

Einzelmolekülmessungen liefern Informationen über die Heterogenität einer Probe. So kann unter anderem das Verhältnis einzelner Subpopulationen während der Öffnung der Nucleosomen bestimmt werden. Für doppelt DNA markierte Wildtyp-Nucleosom lassen sich während der salzinduzierten Öffnung vier Populationen bestimmen. Diese können mit Hilfe von Gaußfits (Abbildung 30) beschrieben und somit der Anteil der jeweiligen Population bestimmt werden.

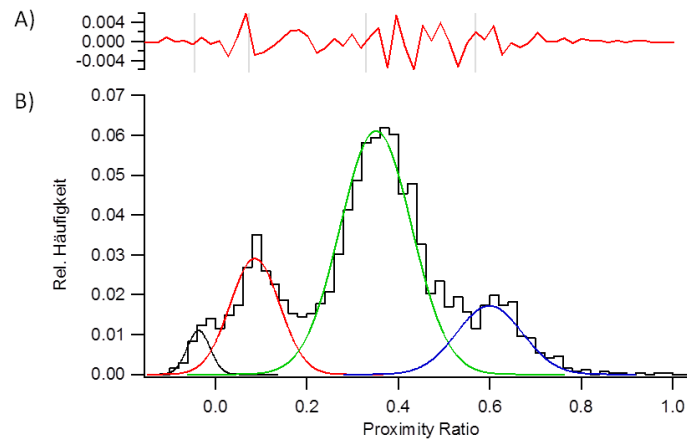


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der Gaußfits einer spFRET-Messung des Wildtyp-Nucleosoms bei 400 mM NaCl. A) Residuen des Fits. B) Schwarz: Häufigkeitsverteilung der PRs; Einzelne Komponenten des Multi-Gaußfits: Grau/Peak0: Donor-only Spezies; Rot/Peak1: Freie DNA; Grün/Peak2: Intaktes Nucleosom; Blau: teilweise disassembliertes Nucleosom.

Über den Multigaußfit lassen sich vier Populationen mit unterschiedlicher, mittlerer PR bestimmen. Die in Abbildung 30 mit „0“ bezeichnete Gaußkurve stellt die Donor-only Spezies dar. Zu dieser Subpopulation gehören alle Moleküle die lediglich ein Donorsignal liefern und wird daher im Folgenden nicht weiter betrachtet. Die drei übrigen Subpopulationen „1“, „2“ und „3“ können unterschiedlichen Zuständen des Nucleosoms zugeordnet werden (Tabelle 25). Die Bezeichnung dieser drei Zustände - L-FRET, M-FRET und H-FRET - leiten sich von den englischen Begriffen *low*, *mid* und *high* bezüglich der PR dieser Zustände ab.

Tabelle 25: Aus Einzelmolekülmessungen bestimmbare PR der Nucleosomen mit doppelt-intern markierter DNA (Alexa488: +41 bp; Alexa594: -53 bp)

	L-FRET	M-FRET	H-FRET
PR	0,08	0,39	0,64
Bedeutung	Freie DNA , fast vollständig disassemblierte Nucleosomen	Intaktes Nucleosom	Teilweise zerfallenes Nucleosom

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen aller Nukleosomen mit H2A-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom analysiert. Da Nukleosomen bei niedrigen Konzentrationen instabil sind, wurden die markierten Nukleosomen mit den entsprechenden unmarkierten Nukleosomen im Verhältnis von 1:5 gemischt, um eine Gesamtkonzentration von 300 pM zu erreichen. Es wurden Messungen im Bereich von 5 - 1000 mM NaCl durchgeführt. Abbildung 31 zeigt exemplarische Ergebnisse dieser Messungen für NaCl-Konzentrationen von 5 mM, 400 mM und 700 mM.

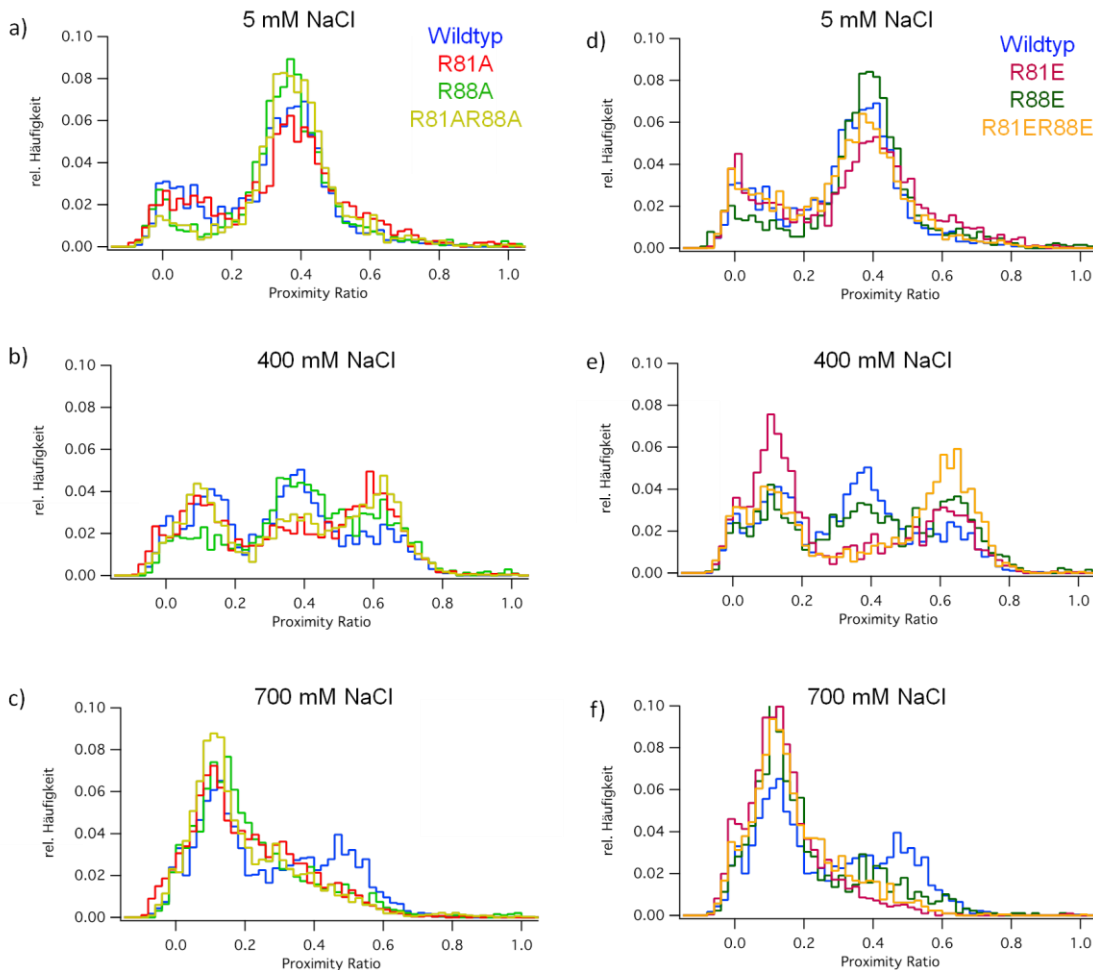


Abbildung 31: spFRET-Histogramme von mutierten Nukleosomen im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. Blau: Wildtyp-Nukleosom, Grün: H2AR88A-Mutante, Rot: H2AR81A-Mutante, Gelb: H2AR81AR88A-Mutante, Dunkelgrün: H2AR88E-Mutante, Bordeaux: H2AR81E-Mutante, Orange: H2AR81ER88E-Mutante Die Messungen erfolgten jeweils nach 1 h Inkubation in TE-Puffer mit NaCl-Konzentrationen von 5 mM (a, d), 400 mM (b, e) und 700 mM (c, f). **Links:** Nukleosomen mit RA-Mutation (a, b, c); **Rechts:** Nukleosomen mit RE-Mutation (d, e, f).

Der Vergleich der Einzelmolekülmessungen zeigt, dass alle mutierten Nukleosomen die gleichen Subpopulationen aufweisen wie das Wildtyp-Nukleosom. Die Messung bei 5 mM NaCl stellt den Ausgangszustand der Nukleosomen dar, da die Nukleosomen bei dieser NaCl-Konzentration aufbewahrt werden. Aus den PR-Histogrammen lassen sich unter diesen Bedingungen sowohl für die Wildtyp- als auch für Nukleosomen mit H2A-Mutation lediglich

die M-FRET-Population – intaktes Nukleosom – und ein geringer Anteil der L-FRET-Population – freie DNA – detektieren. Der Anteil der freien DNA variiert zwischen den einzelnen Rekonstitutionen, wobei Nukleosomen mit einem Anteil von mehr als 5 % freier DNA verworfen wurden. Die Verteilung der Subpopulationen für Nukleosomen mit H2A-Mutation ist bei 5 mM NaCl mit der des Wildtyp-Nukleosoms vergleichbar. Was wiederum belegt, dass trotz Mutation intakte Nukleosomen rekonstituiert werden konnten. Bei höheren NaCl-Konzentrationen lassen sich jedoch Unterschiede zwischen den betrachteten Nukleosomen feststellen. Messungen bei 400 mM NaCl zeigen einen deutlich erhöhten Anteil der H-FRET-Population. Der Anteil dieses Zustandes lässt sich durch die beiden zuvor unter 5.1.3 beschriebenen Trends bezüglich der Position und der Ladung der eingebrachten Mutationen beschreiben. Im Bereich von 700 mM NaCl lässt sich darüber hinaus der destabilisierende Effekt der H2A-Mutationen deutlich erkennen, da für alle Nukleosomen mit H2A-Mutation nur noch eine klar definierte Subpopulation - L-FRET - erkennbar ist. Zur Analyse der Verteilung der Unterzustände wurde die Fläche unter den Gaußfits der einzelnen Populationen gegen die NaCl-Konzentration aufgetragen. (Abbildung 32 und Abbildung 33).

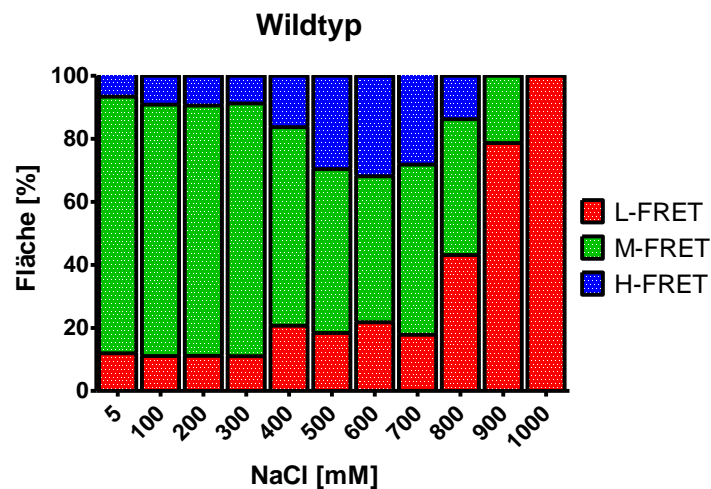


Abbildung 32: Überblick über die NaCl-abhängige Verteilung der Subpopulationen während der Öffnung des Wildtyp-Nukleosoms. Rot: L-FRET; Grün: M-FRET; Blau: H-FRET.

Für das Wildtyp-Nukleosom lässt sich während der Öffnung ein Anstieg der H-FRET-Population beschreiben, welche einen Wert von $22 \pm 3\%$ bei NaCl-Konzentrationen von 400 mM erreicht. Die M-FRET-Population verringert sich mit steigenden NaCl-Konzentrationen, was den ersten Schritt des Zerfalls der intakten Nukleosomen darstellt. Mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen kann ebenfalls ein Anstieg der L-FRET-Population beobachtet werden, was wiederum das Ablösen der DNA vom übrigen Histonkomplex repräsentiert und das finale Stadium des Zerfalls ist. Die Verteilung der drei Populationen im Wildtyp-Nukleosom wird als Referenz für die mutierten Nukleosomen genommen, um

weitere Informationen über den Einfluss der Mutation auf den Öffnungsmechanismus des Nucleosoms zu erhalten. Die Verteilung der Subpopulationen für die H2A-Mutanten während der salzinduzierten Öffnung lässt sich aus Abbildung 33 entnehmen.

Für alle Nucleosomen mit H2A-Mutation lassen sich signifikante Unterschiede bezüglich des

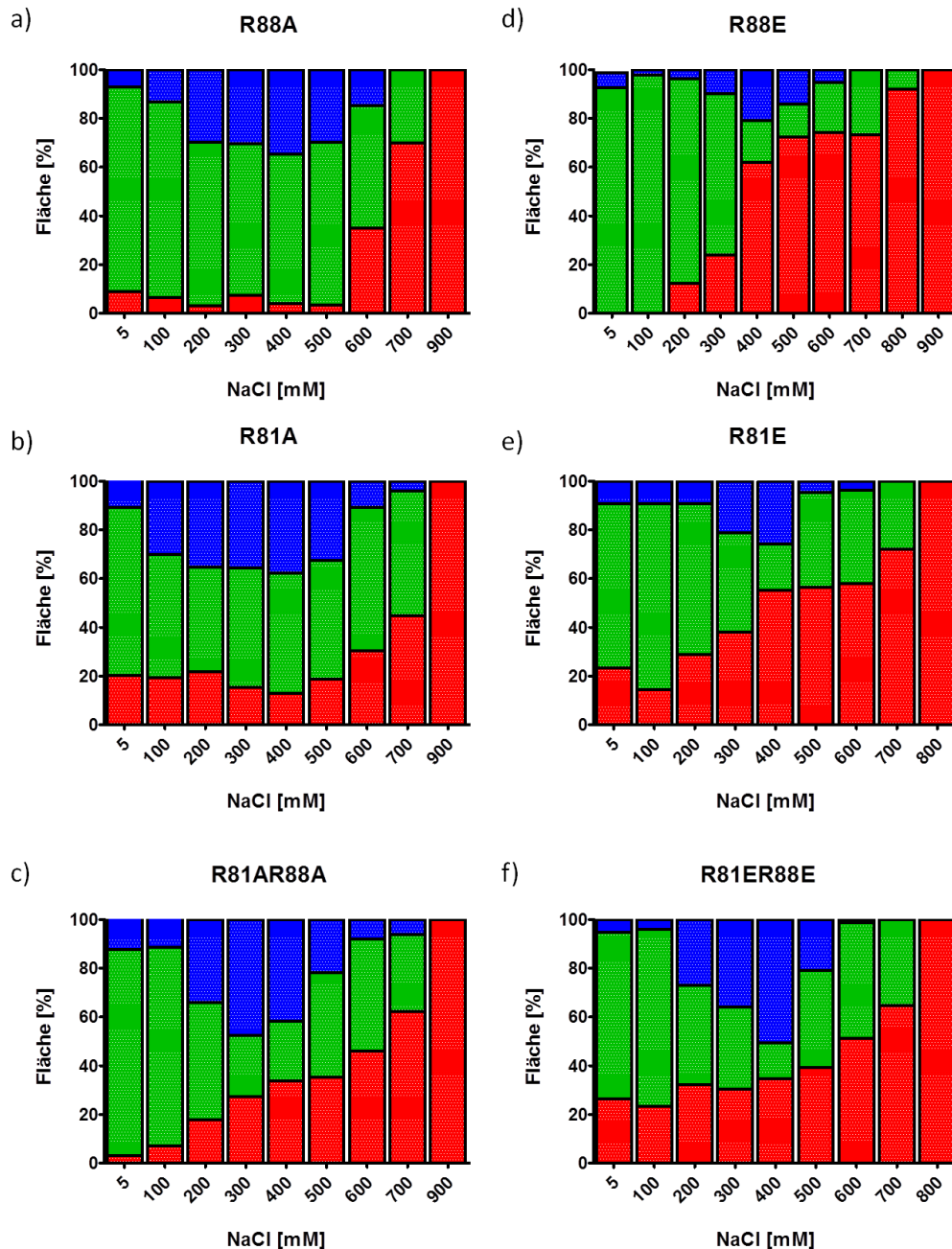


Abbildung 33: Überblick über die NaCl-abhängige Verteilung der Subpopulationen während der Öffnung der H2A-mutierten Nucleosomen. Rot: L-FRET; Grün: M-FRET; Blau: H-FRET.

Anteils des H-FRET-Zustandes feststellen. Bei Nucleosomen mit H2AR88A-Mutation nimmt der H-FRET-Zustand einen maximalen Anteil von $33 \pm 4\%$ an und für Nucleosomen mit H2AR81A-Mutation $42 \pm 3\%$. Nucleosomen mit H2AR81AR88A-Mutation weisen mit $47 \pm 2\%$ eine noch höhere H-FRET-Population auf. Für die Nucleosomen mit H2A-RE-

Mutationen zeigt sich ein ähnliches Bild. Für Nukleosomen mit R88E-Mutation beträgt der Anteil der H-FRET-Population durchschnittlich $21 \pm 3 \%$, wohingegen bei Nukleosomen mit R81E-Mutation die H-FRET-Population lediglich einen Anteil von $30 \pm 2 \%$ ausmacht. Den größten Anteil der H-FRET-Population ($54 \pm 2 \%$) findet sich bei Nukleosomen mit R81ER88E-Mutation. Allerdings ist ebenfalls auffällig, dass sich der Anteil der L-FRET-Population zwischen den einzelnen Mutanten stark unterscheidet. Da diese Population die freie DNA darstellt, scheint die Instabilität der Nukleosomen ebenfalls ein früheres Ablösen der DNA vom Histonkern zu bewirken.

Um die Auswirkungen der Mutationen auf die Nukleosomenfraktion betrachten zu können, wird im Folgenden der Anteil der H-FRET-Population an der gesamten Nukleosomenfraktion (M-FRET + H-FRET) betrachtet. Die M-FRET-Population stellt Nukleosomen im intakten und die H-FRET-Population im teilweise zerfallenen Zustand dar. Das Verhältnis dieser beiden Populationen zueinander gibt Auskunft über strukturelle Veränderungen zwischen den betrachteten Nukleosomen im Verlauf der salzinduzierten Öffnung. In Abbildung 34 ist der prozentuale Anteil der H-FRET-Population an der gesamten Nukleosomenfraktion (M- und H-FRET-Population) für alle Proben bei 400 mM NaCl dargestellt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels Student-T-Test überprüft.

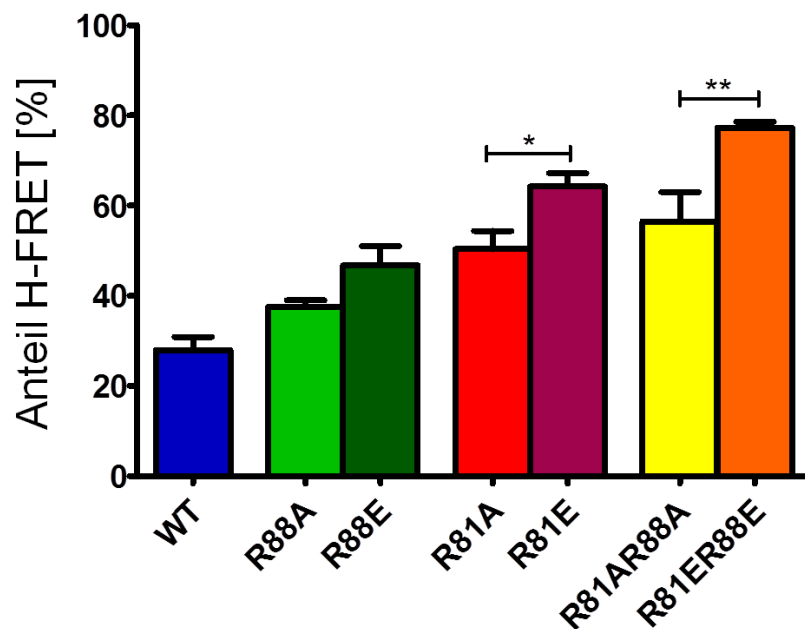


Abbildung 34: Prozentualer Anteil der H-FRET-Population an der gesamten Nukleosomenfraktion bei 400 mM NaCl. Blau: Wildtyp-Nukleosom, Grün: H2AR88A-Mutante, Rot: H2AR81A-Mutante, Gelb: H2AR81AR88A-Mutante, Dunkelgrün: H2AR88E-Mutante, Bordeaux: H2AR81E-Mutante, Orange: H2AR81ER88E-Mutante.

Der prozentuale Anteil der H-FRET-Population an der gesamten Nukleosomenfraktion bei 400 mM NaCl ist in allen Nukleosomen mit H2A-Mutation erhöht. Der direkte Vergleich zeigt

deutlich, dass die jeweilige RE-Mutation einen stärkeren Effekt hervorruft als die RA-Mutation. Auch hier zeigt sich, dass eine Mutation an der Position 81 einen größeren Einfluss auf die Höhe der H-FRET-Population aufzeigt, als eine Mutation an Position 88. In der Doppelmutante ist der höchste Anteil des H-FRET-Zustandes im Bezug auf die Nukleosomenfraktion vorhanden. Obwohl diese Nukleosomen in Ensemblemessungen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Stabilität aufweisen, kann durch Einzelmolekülmessungen ein struktureller Unterschied detektiert werden. Die Unterschiede bezüglich des H-FRET-Zustandes zwischen diesen Mutanten kann mit $P=0,0054$ als statistisch signifikant angesehen werden. Über Einzelmolekülmessungen ist somit ein Unterschied zwischen den RE-Mutanten feststellbar, der in Ensemblemessungen verborgen bleibt. Bezüglich der Stabilität zeigt sich in Einzelmolekülmessungen ein mit den Ensemblemessungen vergleichbares Ergebnis.

Durch die Einzelmolekülmessungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stabilität der Nukleosomen als auch die Höhe des H-FRET-Zustandes von der Position und der Ladung der eingebrachten Mutation abhängen. Auch hier lässt sich der Einfluss in den zwei bereits beschriebenen Kategorien zusammenfassen (siehe 5.1.3)

5.1.5. Analyse des Einflusses der H2A-Mutationen auf den Öffnungsmechanismus des Nukleosoms

Um den Einfluss der Mutationen auf die Nukleosomenarchitektur im Detail zu verstehen werden im Folgenden die einzelnen Schritte des Öffnungsmechanismus näher betrachtet. Hierzu können zwei Konstrukte verwendet werden die Vera Böhm in ihrer Doktorarbeit etabliert hat [51]. In beiden Fällen wird das Histonprotein H2B an der Position T112C mit Alexa488 markiert. Die Rekonstitution der Oktamere erfolgt im Unterschuss (~10%) von markiertem H2BT112C. Für die übrigen 90 % wird unmarkiertes H2B verwendet. Dieses Vorgehen ist notwendig, da jedes Oktamer zwei Kopien von jedem Histonprotein beinhaltet. Durch die Rekonstitution im Unterschuss kann sichergestellt werden, dass lediglich ein geringfügiger Anteil der Oktamere zwei markierte Proteine aufweist. Statistisch ergibt sich ein Verhältnis von 81 % unmarkierte, 18 % einfach markierte und 1 % doppelt markierte Oktamere. Für die Nukleosomenrekonstitution wurden anschließend zwei verschiedene DNAs verwendet. Bei dem ersten Konstrukt befindet sich Alexa594 an der Position -15 bp von der Mitte der DNA-Sequenz (im Weiteren als *dyad* bezeichnet). Mit diesem Konstrukt lassen sich strukturelle Veränderungen zwischen dem (H2A-H2B)-Dimer und der DNA im Bereich der Dyadenachse analysieren. Das zweite Konstrukt ist hingegen am äußeren DNA-Arm (-53 bp; im Weiteren als *int* bezeichnet) markiert und ermöglicht die Analyse von strukturellen Veränderungen zwischen dem (H2A-H2B)-Dimer und dem äußeren DNA-Arm.

Die Verwendung dieser beiden Konstrukte ermöglichte die Detektion des „Butterfly-Zustandes“ [19]. Es handelt sich hierbei um einen Intermediärzustand bei dem die Interaktionen zwischen den Dimeren und dem Tetramer bereits aufgebrochen ist, aber alle 4 Histonproteine weiterhin in dem Komplex vorhanden sind.

Mit Hilfe dieser Konstrukte wurde im Folgenden der Einfluss der Mutationen auf den Öffnungsmechanismus und den Butterfly-Zustand der Nucleosomen untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen Einzelmolekülmessungen sind für Nucleosomen mit RA-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nucleosom exemplarisch in Abbildung 35 dargestellt [43][44].

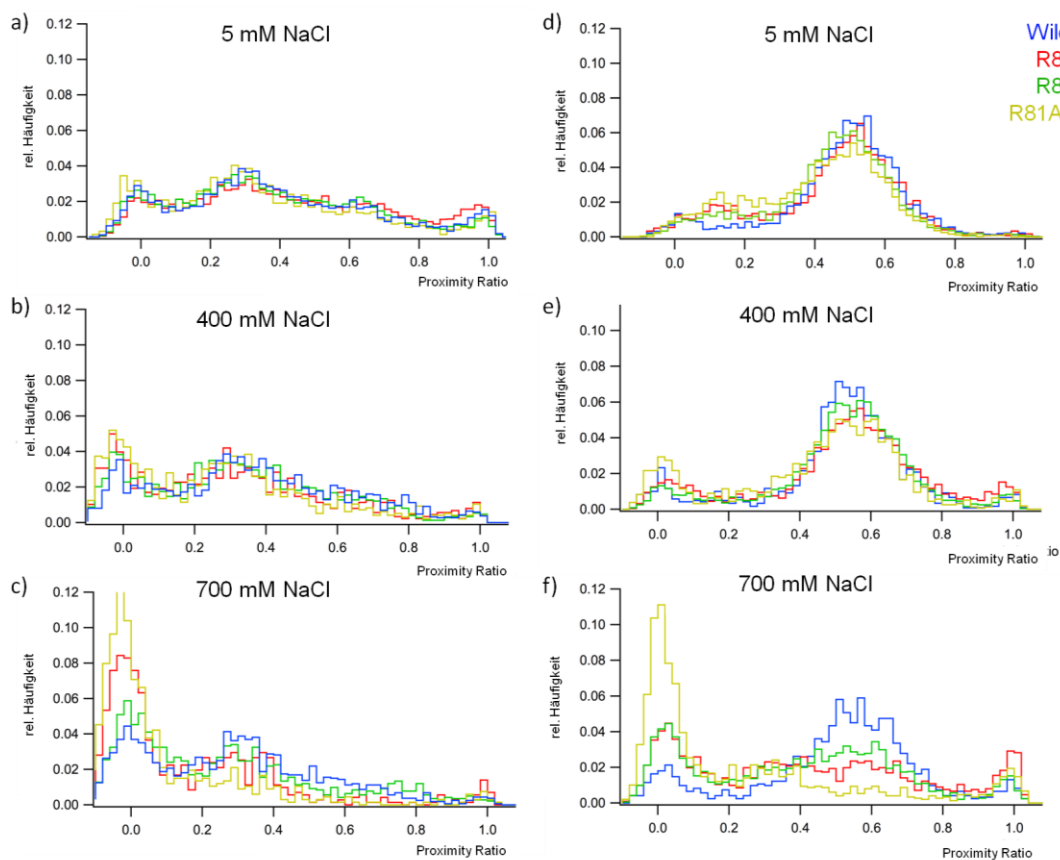


Abbildung 35: spFRET-Histogramme bezüglich der Dimer-DNA-Interaktion von RA mutierten Nucleosomen im Vergleich zum Wildtyp-Nucleosom. . Blau: Wildtyp-Nucleosom, Grün: H2AR88A-Mutante, Rot: H2AR81A-Mutante, Gelb: H2AR81AR88A-Mutante. Messungen erfolgten jeweils nach 1 h Inkubation in TE-Puffer mit NaCl-Konzentrationen von 5 mM (a, d), 300 mM (b, e) und 500 mM (c, f). **Links:** (H2A-H2B)-Dimer und Dyadenachse (a, b, c); **Rechts:** (H2A-H2B)-Dimer und äußerer Arm der DNA(d, e, f).

Die Messungen zeigen, dass für Nucleosomen mit RA-Mutation die gleichen Subpopulationen nachweisbar sind wie für das Wildtyp-Nucleosom. Für beide Konstrukte lässt sich der Einfluss der Mutationen auf die Stabilität der Nucleosomen detektieren. Für das int-Konstrukt lässt sich darüber hinaus bei 5 mM NaCl eine Population mit mittlerer PR von $PR = 0,14$ beobachten. Für das Wildtyp-Nucleosom lässt sich in diesem Bereich ebenfalls eine Population erahnen, welche jedoch lediglich $9 \pm 4\%$ des gesamten FRET-Signals ausmacht

und nicht klar definiert ist. Bei den betrachteten RA-Mutationen beträgt die Fläche unter den Gaußfits mit mittlerer $PR = 0,14$ für $R88A = 14 \pm 8 \%$, $R81A = 18 \pm 5 \%$ und für $R81AR88A = 23 \pm 4 \%$. Der Anteil dieser Population folgt somit dem zuvor beschriebenen Trend:

$$\text{Wildtyp} < R88A < R81A < R81AR88A.$$

Mit steigender NaCl-Konzentration nimmt der Anteil dieser Population ab und ist bei 400 mM NaCl nicht mehr nachweisbar. Mit steigender NaCl-Konzentration sind für die mutierten Nukleosomen lediglich die gleichen Subpopulationen feststellbar wie beim Wildtyp-Nukleosom. Lediglich der Einfluss der Mutation auf die Stabilität der Nukleosomen wird durch einen verfrühten Zerfall der Nukleosomen mit RA-Mutation erkenntlich.

Entsprechende Einzelmolekülmessungen wurden auch für Nukleosomen mit RE-Mutation durchgeführt (Abbildung 36).

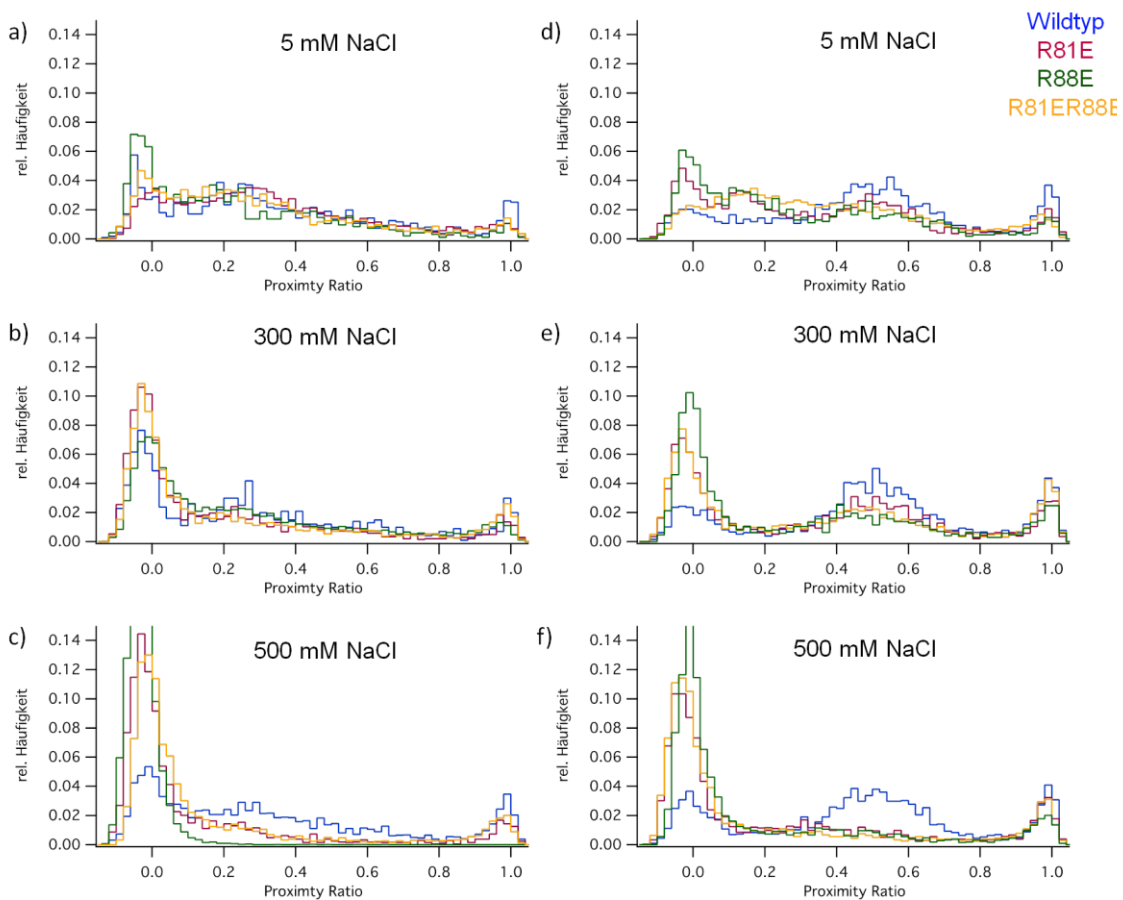


Abbildung 36: spFRET-Histogramme bezüglich der Dimer-DNA-Interaktion von RE mutierten Nukleosomen im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. Blau: Wildtyp-Nukleosom, Dunkelgrün: H2AR88E-Mutante, Bordeaux: H2AR81E-Mutante, Orange: H2AR81ER88E-Mutante. Messungen erfolgten jeweils nach 1 h Inkubation in TE-Puffer mit NaCl-Konzentrationen von 5 mM (a, d), 300 mM (b, e) und 500 mM (c, f). **Links:** (H2A-H2B)-Dimer und Dyadenachse (a, b, c); **Rechts:** (H2A-H2B)-Dimer und äußeren Arm der DNA(d, e, f).

Für Nukleosomen mit RE-Mutation lässt sich ein ähnlicher Effekt beobachten. Auch in diesem Fall zeigen sich während der Öffnung des dyad-Konstrukts keine signifikanten Unterschiede bezüglich der *PR* und der Verteilung der Subpopulationen. Lediglich der Einfluss der Mutationen auf die Stabilität der Nukleosomen ist durch die Abnahme des FRET-Signals bei NaCl-Konzentrationen von 500 mM nachweisbar. Das int-Konstrukt hingegen zeigt auch für Nukleosomen mit RE-Mutation bei 5 mM NaCl eine Population mit mittlerer $PR = 0,14$. Der Anteil dieser Subpopulation beträgt für R88E = $42 \pm 8 \%$, R81E = $37 \pm 10\%$ und für R81ER88E = $56 \pm 8 \%$. Da je zwei Kopien von jedem Histon im Nukleosom vorhanden sind, kann die Proteinmarkierung zu verschiedenen Spezies führen, welche in spFRET-Messungen mit Einfarbenanregung nicht unterschieden werden können. Für die zuvor beschriebene Population mit mittlerer $PR = 0,14$ kann daher kein Rückschluss auf die zugrunde liegende Stöchiometrie gezogen werden. Um sicherzustellen, dass diese Subpopulation die Distanz zwischen einem Dimer und der DNA an Position -53 bp darstellt, können Messungen mit alternierender Laseranregung (ALEX: siehe 2.5) durchgeführt werden. Mit ALEX kann neben der *PR* auch die Stöchiometrie der Fluorophore für jeden einzelnen *Burst* bestimmt werden, wodurch eine selektive Betrachtung bestimmter *Bursts* ermöglicht wird. Im Folgenden wurde lediglich die *PR* der *Bursts* mit einer Stöchiometrie von $S = 0,2$ bis $S = 0,8$ betrachtet. Da der Anteil der Population mit niedriger *PR* für das Nukleosom mit R81ER88E-Mutation am größten ist, wurden die ALEX-Messungen mit dieser Mutante und dem Wildtyp-Nukleosom durchgeführt. Die Abbildung 37 zeigt exemplarisch die mittels ALEX-Messungen erstellten *PR*-Diagramme für Nukleosomen mit R81ER88E-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom bei 5 mM, 300 mM, 500 mM und 800 mM NaCl.

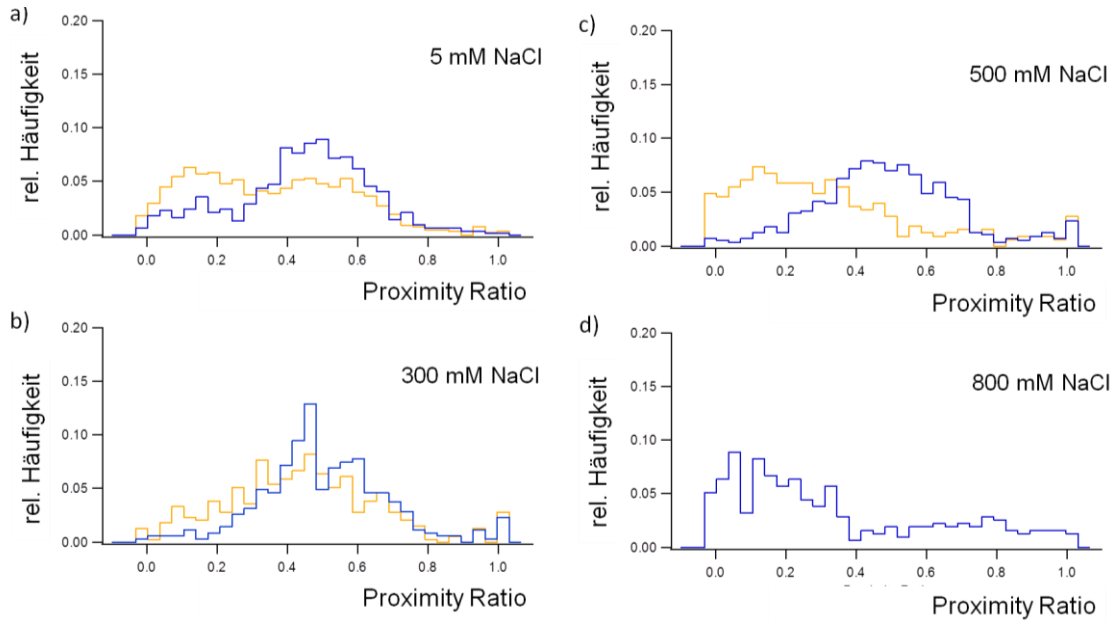


Abbildung 37: Selektive ALEX-PR-Histogramme der Nucleosomenfraktion. Das Wildtyp-Nucleosom ist in schwarz und das R81ER88E-Nucleosom in orange dargestellt. Es wurden lediglich Bursts mit einer Stöchiometrie von $S = 0,2$ bis $S = 0,8$ berücksichtigt.

Über die gezielte Auswahl von *Bursts* mit einer Stöchiometrie von $S = 0,2$ bis $S = 0,8$ kann die intakte, doppelt-markierte Nucleosomenfraktion selektiv betrachtet werden. Der Vergleich von Abbildung 37 mit den mittels spFRET-Messungen erhaltenen Histogrammen zeigt, dass die relative Häufigkeit von *Bursts* mit $PR \approx 0$ und $PR \approx 1$ reduziert wurde. Diese *Bursts* gehen somit auf Moleküle zurück, die nur einen der beiden Fluorophore besitzen oder nur einer der beiden aktiv ist. Bei einer $PR \approx 0$ ist lediglich eine Donormarkierung vorhanden; Moleküle mit Akzeptormarkierung führen durch direkte Anregung zu einer $PR \approx 1$. Im Vergleich der Histogramme der R81ER88E-Nucleosomen mit den Wildtyp-Nucleosomen zeigen sich für beide Konstrukte zwei Subpopulationen mit einer mittleren $PR \approx 0,18$ und $PR \approx 0,5$. Die Verteilung der beiden Populationen unterscheidet sich jedoch stark zwischen der Mutante und den Wildtyp-Nucleosomen. Bei einer NaCl-Konzentration von 5 mM nimmt die Population mit $PR \approx 0,18$ beim Wildtyp-Nucleosom lediglich einen Anteil vom $11 \pm 2\%$ an, während die gleiche Population im Nucleosom mit R81ER88E-Mutation mit $33 \pm 4\%$ wesentlich prominenter ist. Bei 300 mM NaCl ist die Population für beide Nucleosomentypen nicht mehr vorhanden. Für das R81ER88E-Nucleosom kann ein Anstieg dieser Population bei 500 mM und für das Wildtyp-Nucleosom bei 800 mM NaCl beobachtet werden. Das Auftreten dieser Population bei hohen NaCl-Konzentrationen könnte ein Zeichen für den Zerfall der Nucleosomen sein, da sich während der Öffnung des Nucleosoms der Abstand zwischen dem (H2A-H2B)-Dimer und der DNA vergrößert. Das Wiederauftauchen dieser Population bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen bestätigt wiederum die geringere Stabilität der R81ER88E-Nucleosomen.

Die vergleichende Analyse der salzabhängigen PRs der (H2A-H2B)-Dimere und verschiedenen Positionen auf der DNA, bestätigt abermals den zuvor beschriebenen Einfluss bezüglich der Ladung und der Position der eingebrachten Mutationen. Außerdem nimmt der Anteil einer Population mit niedriger PR bei einer NaCl-Konzentration von 5 mM in den einzelnen Mutanten sukzessive zu. Der Anteil dieser Population an der Gesamtpopulation folgt ebenfalls dem zuvor beschriebenen Trend.

5.1.6. Zusammenfassung der Einflüsse von Mutationen der H2A α 3-Region

Die in diesem Abschnitt erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von verschiedenen Mutationen im Bereich der α 3-Region des H2A-Histonproteins auf die Öffnungsschritte des Nukleosoms sind in Abbildung 38 zusammengefasst. Es wurden hierfür die jeweiligen $c_{1/2}$ -Werte von allen verwendeten Konstrukten verwendet.

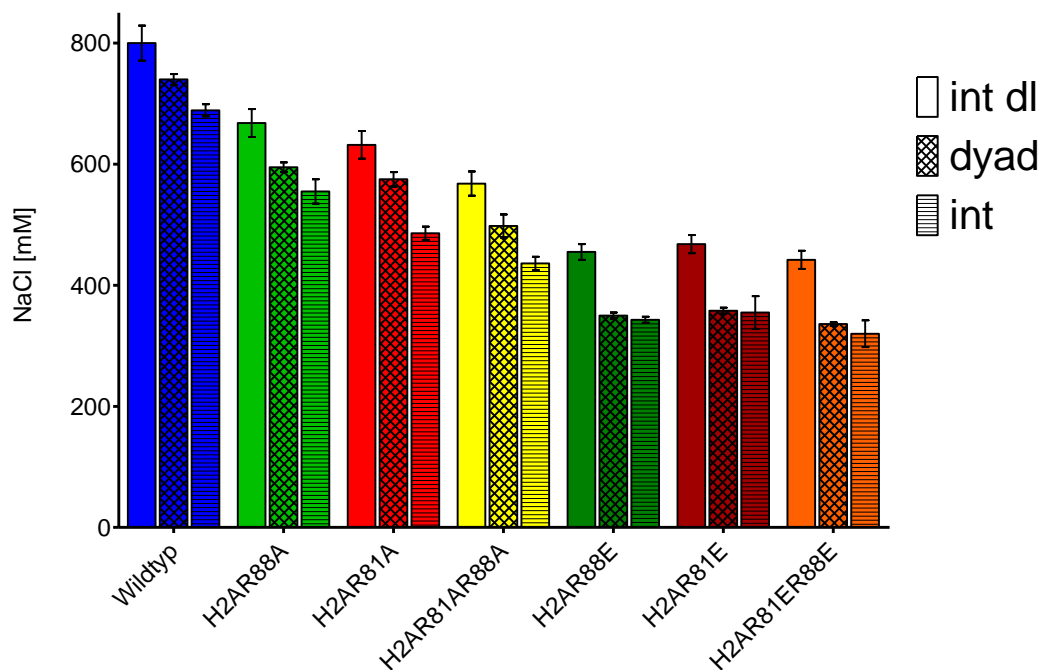


Abbildung 38: $c_{1/2}$ -Werte von allen verwendeten Konstrukten im Vergleich zum Wildtyp-Nukleosom. Das Wildtyp-Nukleosom ist in Blau, die H2AR88A-Mutante in Grün, die H2AR81A-Mutante in Rot, die H2AR81AR88A-Mutante in Gelb, die H2AR88E-Mutante in Dunkelgrün, die H2AR81E-Mutante in Bordeaux, die H2AR81ER88E-Mutante in Orange dargestellt.

Der Vergleich der $c_{1/2}$ -Werte des Wildtyp-Nukleosoms in Abbildung 38 bestätigt den bereits bekannten Öffnungsmechanismus des Nukleosoms. Während der Öffnung wird im Wildtyp-Nukleosom zuerst die Interaktion zwischen dem (H2A-H2B)-Dimer und dem (H3-H4)₂-Tetramer geschwächt ($c_{1/2}$ -Wert dyad), anschließend kann das Ablösen der Dimere mit Hilfe des int-Konstrukts beobachtet werden und erst bei noch höherer NaCl-Konzentration

wird der $c_{1/2}$ -Wert für das doppelt-intern markierte DNA-Konstrukt erreicht. Vergleicht man nun die entsprechenden $c_{1/2}$ -Werte der RA-Mutanten mit denen des Wildtyp-Nukleosoms, lässt sich eindeutig zeigen, dass die Abfolge dieser Öffnungsschritte durch die Mutation nicht beeinflusst wird. Für diese Konstrukte wird, wie im Wildtyp-Nukleosom, zuerst der $c_{1/2}$ -Wert für das dyad-, anschließend für das int- und als letztes für das doppelt-intern markierte Konstrukt erreicht. Für die Nukleosomen mit RE-Mutation lässt sich hingegen feststellen, dass zwischen dem Aufbrechen der Dimer-Tetramer-Interaktion (dyad) und dem Ablösen der Dimere von der DNA (int) nicht mehr klar unterschieden werden kann. Für diese Konstrukte lassen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer $c_{1/2}$ -Werte feststellen.

Die Beobachtungen bezüglich des Einflusses von verschiedenen Mutationen im Bereich der $\alpha 3$ -Region des H2A-Histonproteins auf das Nukleosom lassen sich abschließend in fünf Punkten zusammenfassen.

- 1) Die Positionierung des Histonoktamers auf der DNA scheint durch die Mutation nicht beeinflusst zu sein.
- 2) Die intrinsischen Restriktionsschnittstellen der DNA werden durch das Einbringen der Mutationen zugänglich.
- 3) Die für das Wildtyp-Nukleosom bekannte H-FRET-Population, welche ein teilweise zerfallenes Nukleosom darstellt, wird durch die eingebrachten Mutationen verstärkt.
- 4) Der Abstand zwischen einem der beiden (H2A-H2B)-Dimere zur DNA-Position -53 bp ist bei den mutierten Nukleosomen bei niedriger NaCl-Konzentration größer als bei Wildtyp-Nukleosomen.
- 5) Alle beobachteten Effekte lassen sich folgendermaßen bezüglich der Position und der Ladung der eingebrachten Mutationen beschreiben:
 - a. Einfluss der Position der einbrachten Mutation bei RA-Mutation:
R88A < R81A < R81AR88A.
 - b. Einfluss der Ladung der eingebrachten Mutation
RA < RE.

5.2. Dynamik des H3-Histonschwanzes

5.2.1. Klonierung und Proteinaufreinigung der H3-Mutanten

Da die ersten Proteinexpressionen der H3-Mutanten (K4C und K9C) erfolglos verliefen, wurden die jeweiligen Gensequenzen in einen pet17b-Vektor umklontiert. Anschließend wurden die Proteine überexprimiert und aufgereinigt (siehe 5.1.1). Beide H3-Mutanten wurden nach erfolgreicher Aufreinigung mit Hilfe eines Alexa488-Maleimid im Histonschwanz markiert. Abbildung 39 zeigt ein TAU-Gel der aufgereinigten Proteine vor und nach der Markierung mit Alexa488.

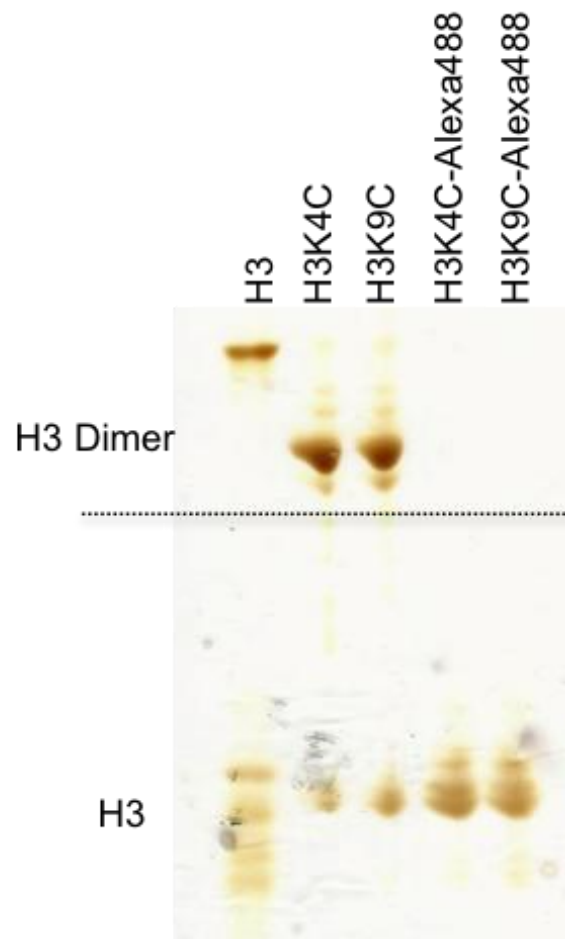


Abbildung 39: TAU-Gel der mutierten H3-Proteine im Vergleich zum Wildtyp H3-Protein. Es wurde jeweils 1 µg der einzelnen Proteine mit und ohne Alexa488-Markierung aufgetragen.

Die Optimierung der Markierungsstrategie erfolgte am Protein H3K9C durch Christina Schneider unter meiner Anleitung. Die Markierungseffizienz konnte durch Änderung des pH-Werts des verwendeten Puffers auf pH 7,5 von ca. 50 % auf annähernd 100 % erhöht werden. Im TAU-Gel ist die hohe Markierungseffizienz durch das Fehlen von H3 Dimeren bei den markierten Proben erkennbar. H3 Dimere entstehen durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen von zwei H3 Proteinen. Durch die Markierung der Proteine mit dem Alexa488

Maleimid, welches in einer Michael-Addition mit der Thiolgruppe des Cysteins reagiert, stehen anschließend keine freien Cysteine mehr zu Verfügung. Da somit lediglich nicht markierte H3 Proteine H3-Dimere bilden können, repräsentiert die fehlende H3-Dimerbande eine annähernd 100 %ige Markierungseffizienz. Für die anschließende Oktamerrekonstitution wurden sowohl die nicht markierten, als auch die mit Alexa488 markierten H3-Proteine verwendet.

5.2.2. Oktamer- und Nukleosomenrekonstitution mit H3-Mutanten

Für die H3-Mutanten wurden verschiedene Oktamere rekonstituiert. Zuerst wurden lediglich nicht markierte Oktamere hergestellt (Abbildung 40), welche für die Stabilitätsmessungen verwendet wurden.

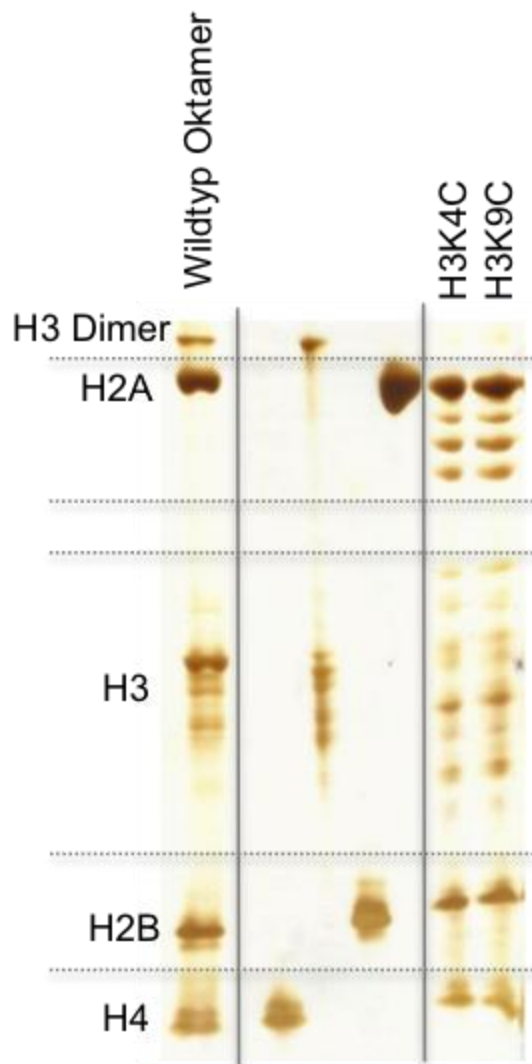


Abbildung 40: TAU-Gel der rekonstituierten Oktamere im Vergleich zum Wildtyp Oktamer und der einzelnen Histonproteine. Es wurde je 1 μ g der reinen Histonproteine und je 4 μ g der Oktamere aufgetragen.

Da die Rekonstitution von Oktameren erfolgreich verlief, konnten die H3-Mutanten für die Herstellung von fluoreszenzmarkierten Oktameren verwendet werden. Es wurden daraufhin Oktamere mit einem Anteil von 15 %, 50% und 100 % markiertem H3 für spFRET- und ALEX-Messungen rekonstituiert. Das Verhältnis von DNA zu Oktamer wurde auch in diesem Fall mit unmarkierter DNA ermittelt und entsprach dem des Wildtyps. Für die folgenden Stabilitätsmessungen wurden Nucleosomen mit der doppeltmarkierten DNA rekonstituiert. Die erfolgreich rekonstituierten Nucleosomen sind in Abbildung 41 erkennbar.

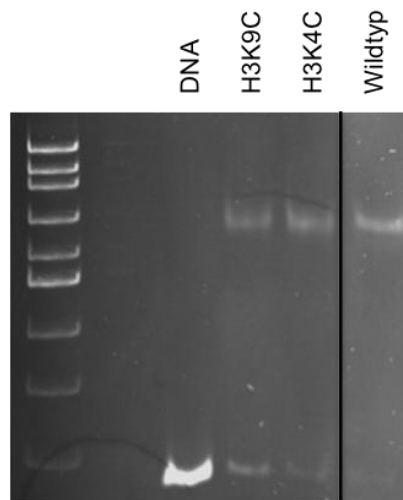


Abbildung 41: Acrylamidgel der Nucleosomenrekonstitution nach Ethidiumbromidfärbung. Es wurde je 1 pmol Probe aufgetragen. Die verwendete DNA wurde als Vergleich mit aufgetragen

Der Vergleich mit der DNA zeigt deutlich, dass die Rekonstitution von Nucleosomen mit H3-Mutation möglich ist. Im Vergleich zum Wildtyp ist kein Unterschied in der Laufweite erkennbar. Außerdem ist in allen Fällen lediglich eine Bande detektierbar, was auf eine homogene Positionierung der Nucleosomen schließen lässt.

5.2.3. Stabilitätsmessungen von H3-Mutanten

Bevor die Dynamik des H3-Histonschwanzes analysiert wurde, wurde der Einfluss der eingebrachten Mutationen auf die Stabilität der Nucleosomen im Molekülensemble und in Einzelmolekülmessungen unter Verwendung der doppeltmarkierten DNA untersucht. Für die Ensemblemessungen wurden die Nucleosomen für 1 h in TE-Puffern mit NaCl-Konzentrationen von 100 – 1200 mM inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Proben gemessen. Wie im Kapitel 5.1.4 beschrieben wurde die normierte *PR* bestimmt und gegen die NaCl-Konzentration aufgetragen (Abbildung 42).

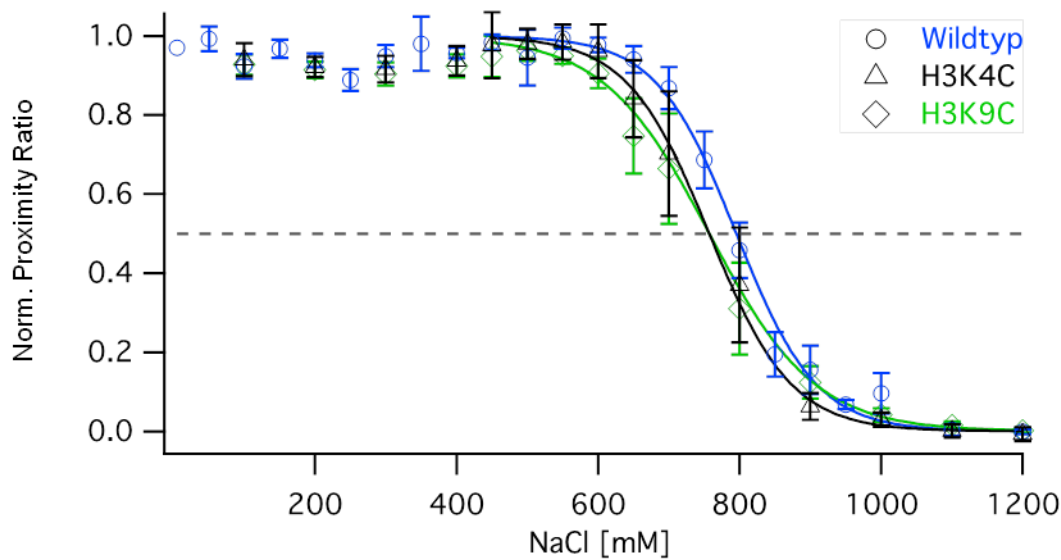


Abbildung 42: Normierte Nucleosomenfraktion für Nucleosomen mit Mutation in H3 gegen das Wildtyp-Nucleosom. Blau: Wildtyp, Schwarz: H3K4C-Mutante; Grün: H3K9C-Mutante; Graue, gestrichelte Linie: $c_{1/2}$ -Wert.

Der Zerfall der Nucleosomen lässt sich in Abbildung 42 über einen sigmoidalen Kurvenverlauf beschreiben. Der Wendepunkt dient als Maß für die Stabilität und wird im Folgenden als $c_{1/2}$ -Wert bezeichnet. Beide H3-Mutanten führen zu einem niedrigeren $c_{1/2}$ -Wert als die Wildtyp-Nucleosomen. Für eine spezifische Markierung des Histonschwanzes müssen zum einen Cysteine an den entsprechenden Positionen eingebracht und natürlich vorkommende Cysteine entfernt werden. Da beide H3-Mutanten eine vergleichbare Destabilisierung aufweisen, könnte dies entweder auf die ebenfalls eingeführte Mutation C110A oder auf die Ladungsänderung durch die jeweilige Lysin/Cystein-Mutation im Histonschwanz zurückzuführen sein.

Alternativ kann jede einzelne Typhoon-Messung über einen sigmoidalen Verlauf beschrieben werden, und der Mittelwert der $c_{1/2}$ -Werte bestimmt werden. In Abbildung 43 ist dies für Nucleosomen mit H3K4C- und H3K9C-Mutation im Vergleich zum Wildtyp Nucleosom dargestellt.

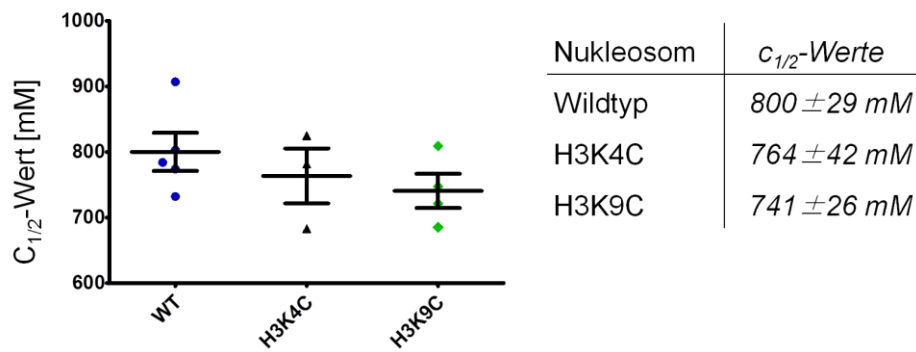


Abbildung 43: Aus Ensemblemessungen gemittelte $c_{1/2}$ -Werte für Nucleosomen mit H2A-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nucleosom. Links: Blau: Wildtyp, Schwarz: H3K4C Mutante; Grün: H3K9C Mutante. Rechts: $c_{1/2}$ -Werte und Standardfehler der jeweiligen Nucleosomen.

Der Vergleich der $c_{1/2}$ -Werte zeigt, dass beide H3-Mutationen zu einer vergleichbaren Destabilisierung der Nucleosomen führen. Mit den ermittelten $c_{1/2}$ -Werten wurde ein einfaktorielles Anova- und ein Tukey-Test durchgeführt, um die statistische Signifikanz der unterschiedlichen $c_{1/2}$ -Werte bewerten zu können (Tabelle 26).

Tabelle 26: Ergebnisse des einfaktorielles Anova- und des Tukey-Tests bezüglich der Stabilitätsunterschiede zwischen den Nucleosomen

Nucleosomen	Differenz der Mittelwerte [mM]	$P < 0,05$
WT vs. H3K4C	36	Nein
WT vs. H3K9C	59	Nein
H3K4C vs. H3K9C	23	Nein

Statistisch betrachtet kann der Unterschied zwischen den H3-Mutanten und den Wildtyp-Nucleosomen nicht als signifikant angesehen werden. Aus diesem Grund wurde die geringfügige Destabilisierung der Nucleosomen im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Es wurden jedoch weitere Einzelmolekülmessungen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die detektierte Destabilisierung keinen Einfluss auf die bereits bekannte Verteilung der verschiedenen FRET-Spezies hat. Abbildung 44 zeigt die Verteilung der PR bei NaCl-Konzentrationen von 200 - 1200 mM der Nucleosomen mit H3-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Nucleosom.

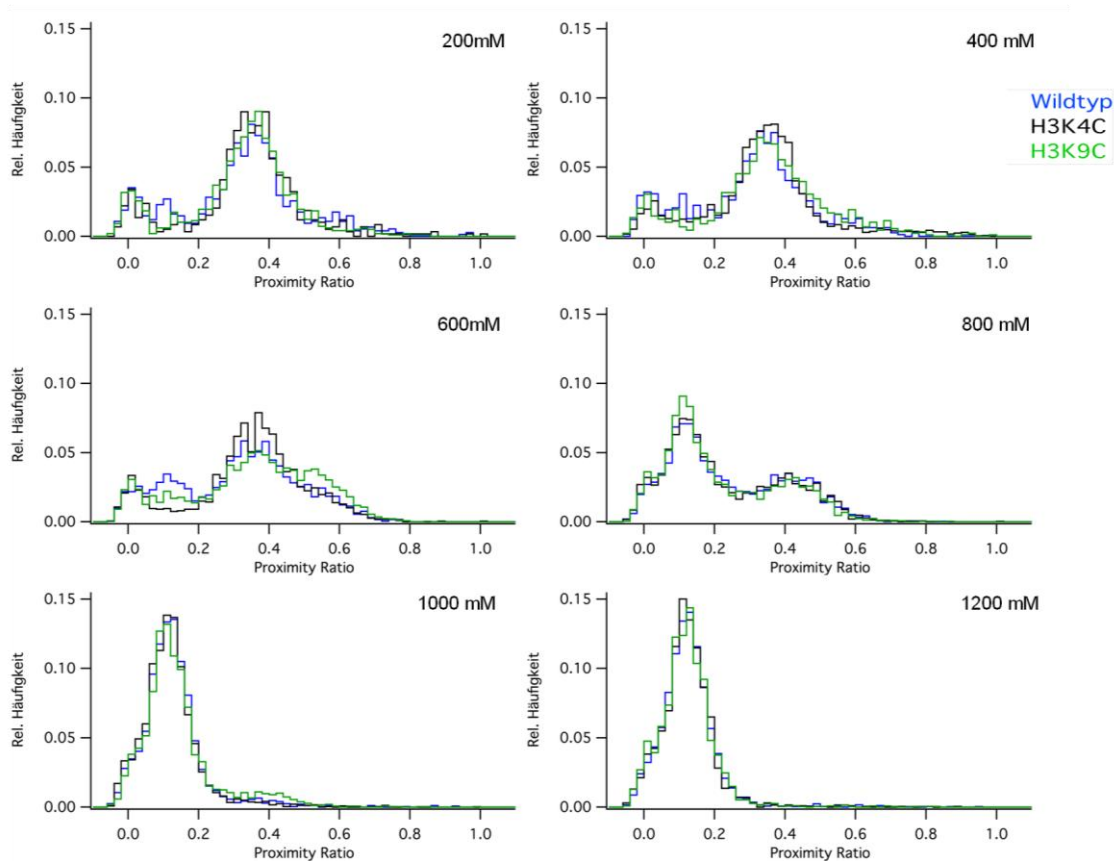


Abbildung 44: spFRET-Histogramme für H3K4C- und H3K9C-Nukleosomen im Vergleich zu Wildtyp-Nukleosomen. Blau: Wildtyp, Schwarz: H3K4C Mutante; Grün: H3K9C Mutante.

Wie bereits beschrieben, lassen sich bei Wildtyp-Nukleosomen verschiedene Zustände während der salzinduzierten Öffnung detektieren. Da die beiden Nukleosomen mit H3-Mutation die gleiche PR-Verteilung wie der Wildtyp aufweisen, lassen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Nukleosomen am besten über die Verteilungen der drei Zustände L-FRET, M-FRET und H-FRET beschreiben. Abbildung 44 zeigt deutlich, dass die Heterogenität der drei Nukleosomen sowohl im Bereich von 200 mM - 400 mM als auch zwischen 800 mM - 1200 mM vergleichbar sind. Die Nukleosomen zeigen in diesem Bereich das gleiche Öffnungsverhalten. Lediglich um 600 mM zeigen sich geringfügige Unterschiede in der Verteilung der M-FRET- und H-FRET-Zustände.

Da beide Konstrukte bei Ensemblemessungen eine Destabilisierung der gleichen Größenordnung aufweisen und bei Einzelmolekülmessungen lediglich geringfügige Unterschiede aufzeigen, wurden im Weiteren beide Konstrukte für die Analyse der Dynamik des H3-Histonschwanzes verwendet.

5.2.4. Bestimmung der Anisotropie der H3 markierten Oktamere

Bevor die hergestellten Alexa488 markierten Oktamere für Messungen Einzelmolekülmessungen eingesetzt wurden, wurde die Anisotropie der Fluorophore und somit deren Beweglichkeit bestimmt (siehe 2.3 und 4.9). Die Fluorophore werden hierfür jeweils mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und anschließend die vertikale und horizontale Emission gemessen (

Tabelle 27). Anisotropie-Werte von unter 0,2 weisen darauf hin, dass die Fluorophore frei beweglich vorliegen [33].

Tabelle 27: Anisotropie von Donor und Akzeptor für H3K9C- und H3K4C- Nukleosomen

	H3K9C	H3K4C
Donor	0.126	0.136

Beide Nukleosomen weisen für den Donor einen Anisotropie-Wert von unter 0,2 auf. Somit scheint der Donor in seiner Beweglichkeit durch die kovalente Bindung an den H3-Histonschwanz nicht beeinflusst zu sein.

Die Bestimmung der Anisotropie beider Fluorophore ist wichtig, da die FRET-Effizienz nicht nur von der Distanz der Fluorophore zu einander, sondern auch von der Orientierung der einzelnen Dipolmomente abhängt. Fluorophore, die durch kovalente Bindung an Proteine oder DNAs gekoppelt wurden, können eine eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen und dadurch die Interpretation der FRET-Messungen verfälschen.

5.2.5. Simulationsergebnisse von Wildtyp- und mutierten Nukleosomen

Um die Dynamik des H3-Histonschwanzes über FRET nachweisen zu können, sollte der Abstand zwischen Donor und Akzeptor idealerweise so gewählt werden, dass er ungefähr dem Försterradius des Fluorophor-Paars (bei den hier verwendeten Fluorophoren: $R_0 = 55,6 \text{ \AA}$) entspricht. Da sich aus der Kristallstruktur des Nukleosoms (Abbildung 45, links) keine intranukleosomalen Interaktionen des H3-Histonschwanzes entnehmen lassen, wurden grobkörnige (coarse grained – 4.12) Simulationen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Yaakov Levy „Computational Molecular Biology“ durchgeführt. Der hierfür verwendete Code basiert auf einem topologiebasiertem Model (GO-Model, [50]). Der Ausgangspunkt für die Simulationen wurde durch die Kristallstruktur des Nukleosoms (PDB: 1KX5, [30]) bestimmt. Jede Aminosäure wird durch eine Kugel (im Weiteren als AS-Kugel bezeichnet) und jedes Nukleotid durch drei Kugeln dargestellt. Bei den AS-Kugeln wird die Position des α -C-Atom verwendet, während die drei Nukleotid-Kugeln die Positionen des

Phosphats, des Zuckers und der jeweiligen Base darstellen. Die Nukleotid-Kugeln wurden „eingefroren“ und können somit ihre, aus der Kristallstruktur entnommene, Position nicht verlassen. Lediglich die AS-Kugeln können sich im Raum bewegen. Der rechte Teil der Abbildung 45 stellt die grobkörnige Struktur des Nukleosoms nach 600 Simulationsschritten dar. In diesem Fall wurden die in der Kristallstruktur vorhandenen Interaktionen innerhalb des H3-Histonschwanzes entfernt, und der Winkel zwischen den einzelnen AS-Kugeln des H3-Histonschwanzes auf einen Anfangswert von 60° gesetzt.

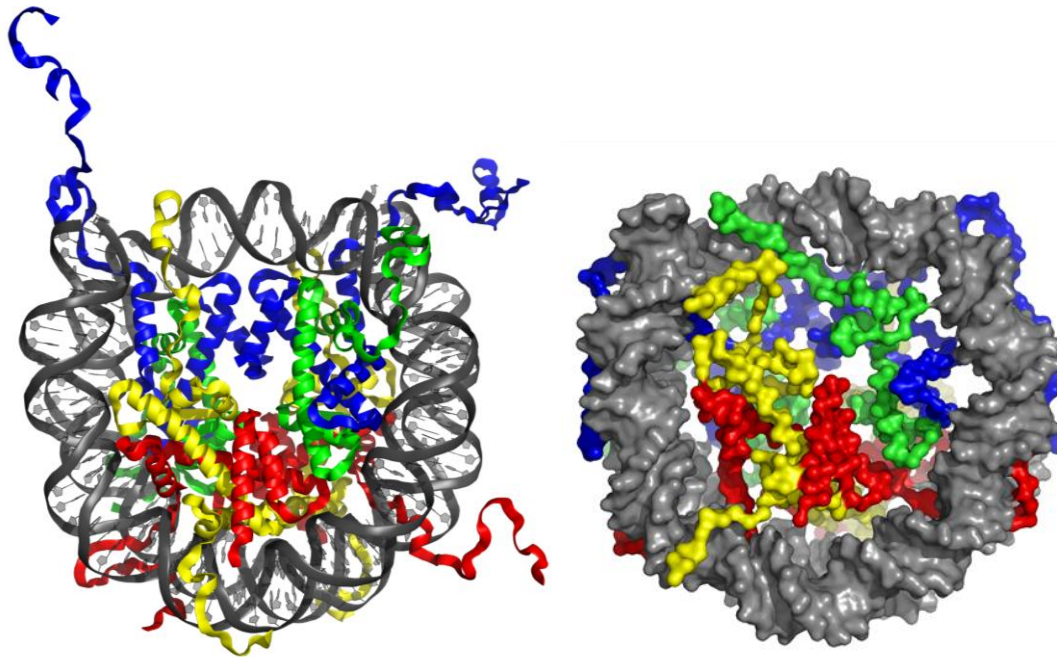


Abbildung 45: Vergleich zwischen der Kristallstruktur und einer grobkörnigen Simulation des Wildtyp-Nukleosoms. Links: Kristallstruktur des Nukleosoms (PDB: 1KX5, [30]), **Rechts:** Rekonstruktion der Positionen der einzelnen Aminosäuren des Wildtyp-Nukleosoms nach 600 Simulationsschritten.

Aus dem Vergleich der Kristallstruktur und der Rekonstruktion der Simulation für das Wildtyp-Nukleosom lassen sich einige wesentliche strukturelle Veränderungen entnehmen. Das Nukleosom weist am Ende der Simulationen eine kompaktere Form auf, bei der alle Histonschwänze mit bestimmten Bereichen der DNA interagieren. Die für diese Arbeit relevanten H3-Histonschwänze befinden sich in dem Spalt zwischen der inneren und der äußeren DNA-Windung. Aus den letzten 50 Simulationsschritten wurde jeweils der minimale Abstand zwischen den AS-Kugeln für H3K4C und H3K9C in beiden Histonproteinkopien und jeder DNA-Kugel berechnet. Als Berechnungsgrundlage wurden die Kugeln der DNA ausgewählt, welche das Phosphatrückgrat darstellen. Anschließend wurde die ermittelte Distanz gegen die Basenpaare auftragen (Abbildung 46, oben). Aus den Replikaten kann alternativ auch die mittlere Distanz mit Standardabweichung berechnet werden um somit Bereiche mit höherer Flexibilität ausfindig zu machen (Abbildung 46, unten). H3K4-1 stellt hierbei das rechte und H3K4-2 das linke H3-Histonprotein aus Abbildung 45 dar.

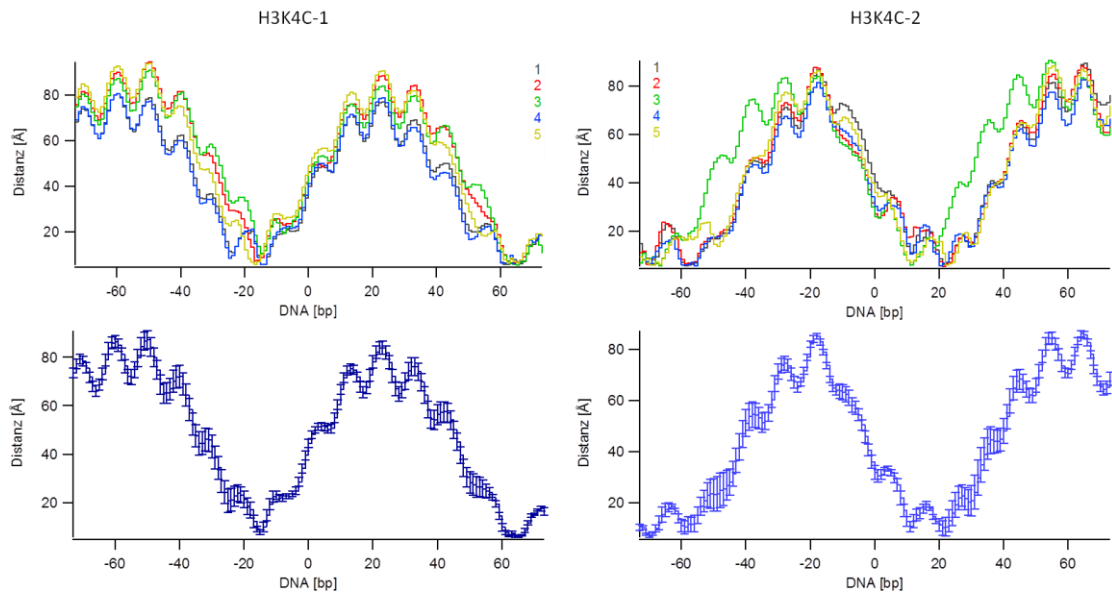


Abbildung 46: Distanz zwischen H3K4C und DNA für des Wildtyp-Nukleosoms am Ende der Simulationen. Oben: Distanzen der einzelnen Simulationen; **Unten:** Mittlere Distanz mit Standardabweichung.

Der obere Teil der Abbildung 46 zeigt deutlich, dass in den Simulationen der geringste Abstand zwischen der Position H3K4C und der DNA im Bereich von ± 15 bp bis ± 25 bp von der Dyadenachse auftritt. Außerdem weisen die verschiedenen Simulationsläufe lediglich eine geringe Variabilität auf, welche im unteren Teil der Abbildung 46 durch die Standardabweichung visualisiert wird. Für die Position H3K9C konnten vergleichbare Distanzen berechnet werden. Auch hier zeigt sich wenig Variabilität zwischen den einzelnen Simulationsläufen (Abbildung 47).

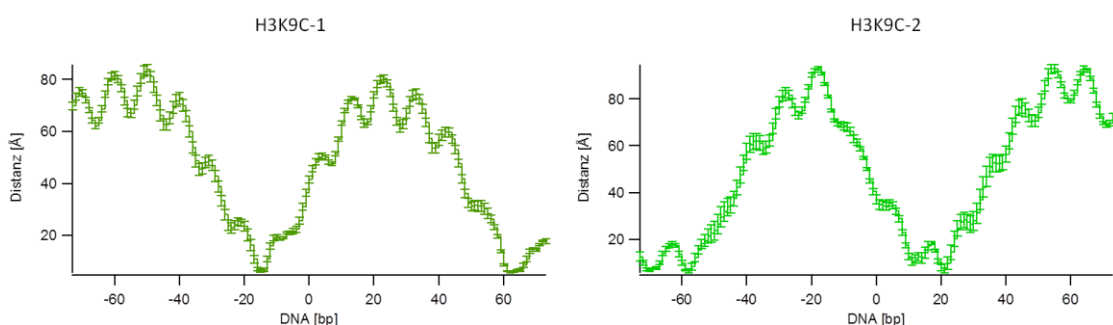


Abbildung 47: : Distanz zwischen H3K9C des Wildtyp-Nukleosoms und der DNA am Ende der Simulationen. Mittlere Distanz mit Standardabweichung.

Die dargestellten Grafiken können darüber hinaus verwendet werden, um den Einfluss der unter 5.1 beschriebenen H2A-Mutationen auf den H3-Histonschwanz zu analysieren. Da bei der hier durchgeführten Simulationsmethode lediglich eine Kugel pro Aminosäure verwendet wurde, kann die Mutationen sehr einfach bezüglich ihrer Ladung berücksichtigt

werden. Eventuell auftretende sterische Effekte, welche durch die Länge der jeweiligen Seitenkette hervorgerufen werden könnten, werden bei diesen Simulationen nicht berücksichtigt. Ein Überblick über die mittleren Distanzen des H3-Histonschwanzes zur DNA der RA-Mutanten ist in Abbildung 48 dargestellt.

Für alle H2A-RA-Mutanten ergeben sich Distanzen, die mit denen des Wildtyp-Nukleosoms

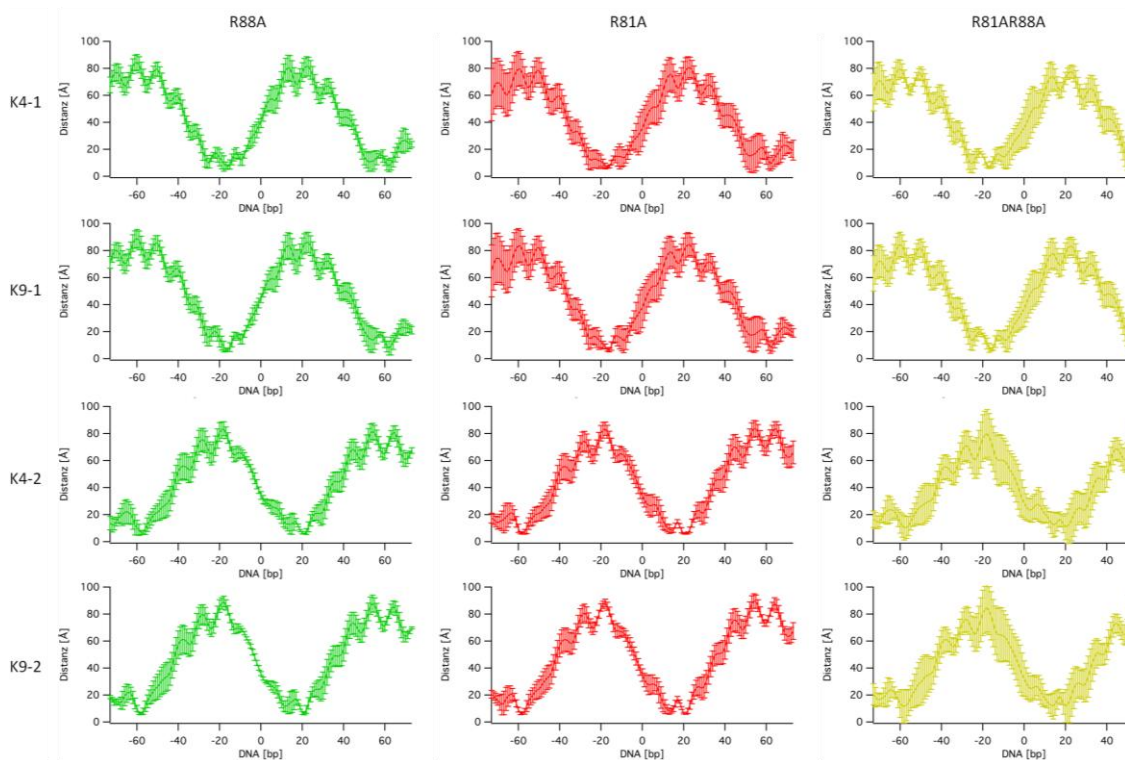


Abbildung 48: Distanz zwischen H3K4C bzw. H3K9C für Nukleosomen mit H2A-RA-Mutation und der DNA am Ende der Simulationen. Gemittelte Interaktionskarten mit Standardabweichung, Grün: H2AR88A-Nukleosom; Rot: H2AR81A-Nukleosom; Gelb: H2AR81AR88A-Nukleosom.

vergleichbar sind. Der geringste Abstand zwischen der Position H3K4 bzw. H3K9 und der DNA liegt bei allen betrachteten Nukleosomen im Bereich von ± 15 bp bis ± 25 bp von der Dyadenachse vor. Der größte Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp-Nukleosom zeigt sich in der Variabilität der Simulationsergebnisse. So zeigen Nukleosomen mit H2AR81A-Mutation eine größere Standardabweichung für die Distanzen zwischen H3-1 und der DNA als H3-2 und der DNA. Diese Mutation scheint in den Simulationen lediglich eines der H3-Histonproteine zu beeinflussen. Nukleosomen mit H2AR81AR88A-Mutation weisen hingegen zusätzlich eine größere Standardabweichung für die Distanzen zwischen H3-2 und der DNA auf. Die Doppelmutteration beeinflusst somit in den Simulationen beide H3-Histonproteine.

Die Simulationen wurden ebenfalls für die H2A-RE-Mutanten durchgeführt. In diesem Fall wurden den betreffenden AS-Kugeln negative Ladungen zugeordnet (Abbildung 49).

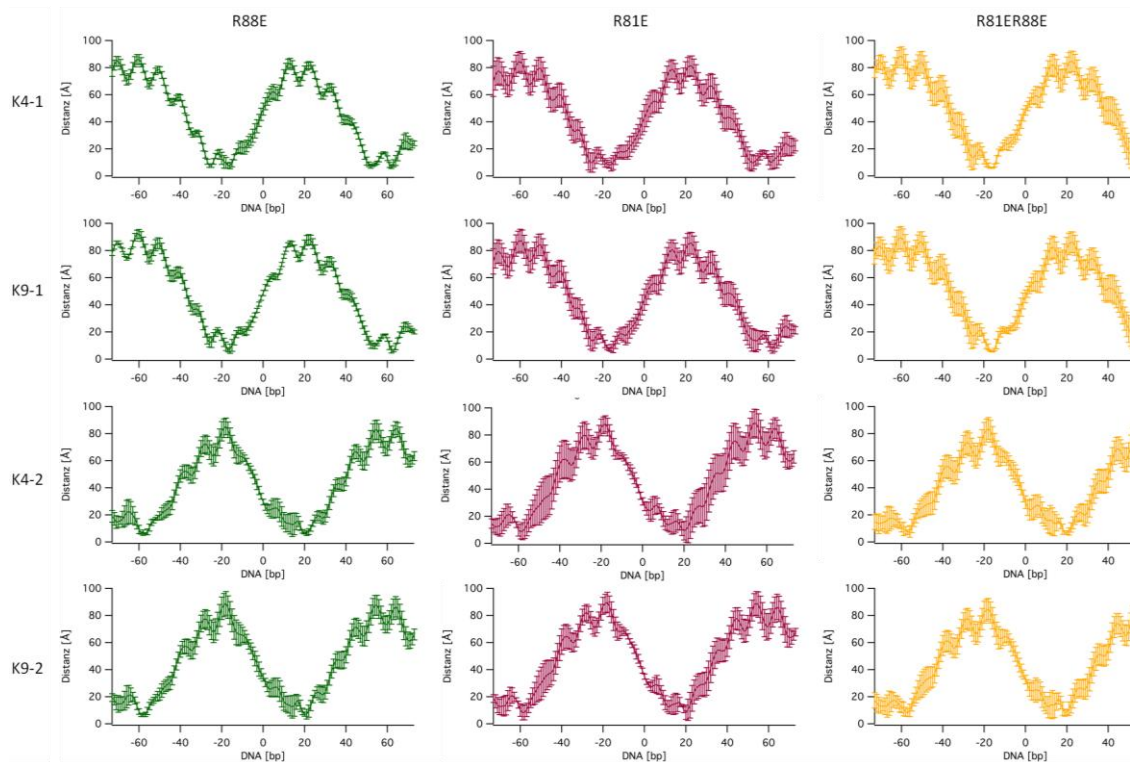


Abbildung 49: Distanz zwischen H3K4C bzw. H3K9C und der DNA für Nucleosomen mit H2A-RE-Mutation am Ende der Simulationen. Mittlere Distanz mit Standardabweichung, Dunkelgrün: H2AR88E-Nucleosom; Bordeaux: H2AR81E-Nucleosom; Orange: H2AR81ER88E-Nucleosom.

Für Nucleosomen mit H2A-RE-Mutation zeigt sich, dass auch für diese Art der Mutation der geringste Abstand zwischen der Position H3K4C und dem Bereich von ± 15 bp bis ± 25 bp von der Dyadenachse beobachtet werden kann. Allerdings weisen Nucleosomen mit H2A-RE-Mutation eine geringere Variabilität zwischen den Simulationen auf als die entsprechende H2A-RA-Mutation. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die unter 5.2.6 beschriebenen FRET-Experimente die Positionen +15 bp und -15 bp auf der DNA für die Akzeptormarkierung ausgewählt.

Um den Einfluss der Mutationen auf andere Bereiche des Nucleosoms zu untersuchen, wurde die Bewegung jeder einzelnen AS-Kugel betrachtet. Hierfür wurde die Distanz zwischen der aus der Kristallstruktur entnommenen Position und der Endposition berechnet. Als Endposition wurde die mittlere Position der letzten 50 Simulationsschritte verwendet, um eventuelle Fluktuationen einzubeziehen. Die ermittelten Distanzen der mutierten Nucleosomen wurden anschließend durch die jeweilige Distanz des Wildtyp-Nucleosoms geteilt. Hierdurch können Bereiche identifiziert werden, die im Verhältnis zum Wildtyp-Nucleosom mehr oder weniger weit von der Ausgangsposition entfernt sind. Der relative Unterschied wurde in Abbildung 50 gegen die Reihenfolge der AS-Kugeln aufgetragen (vgl. PDB 1KX5, [30]).

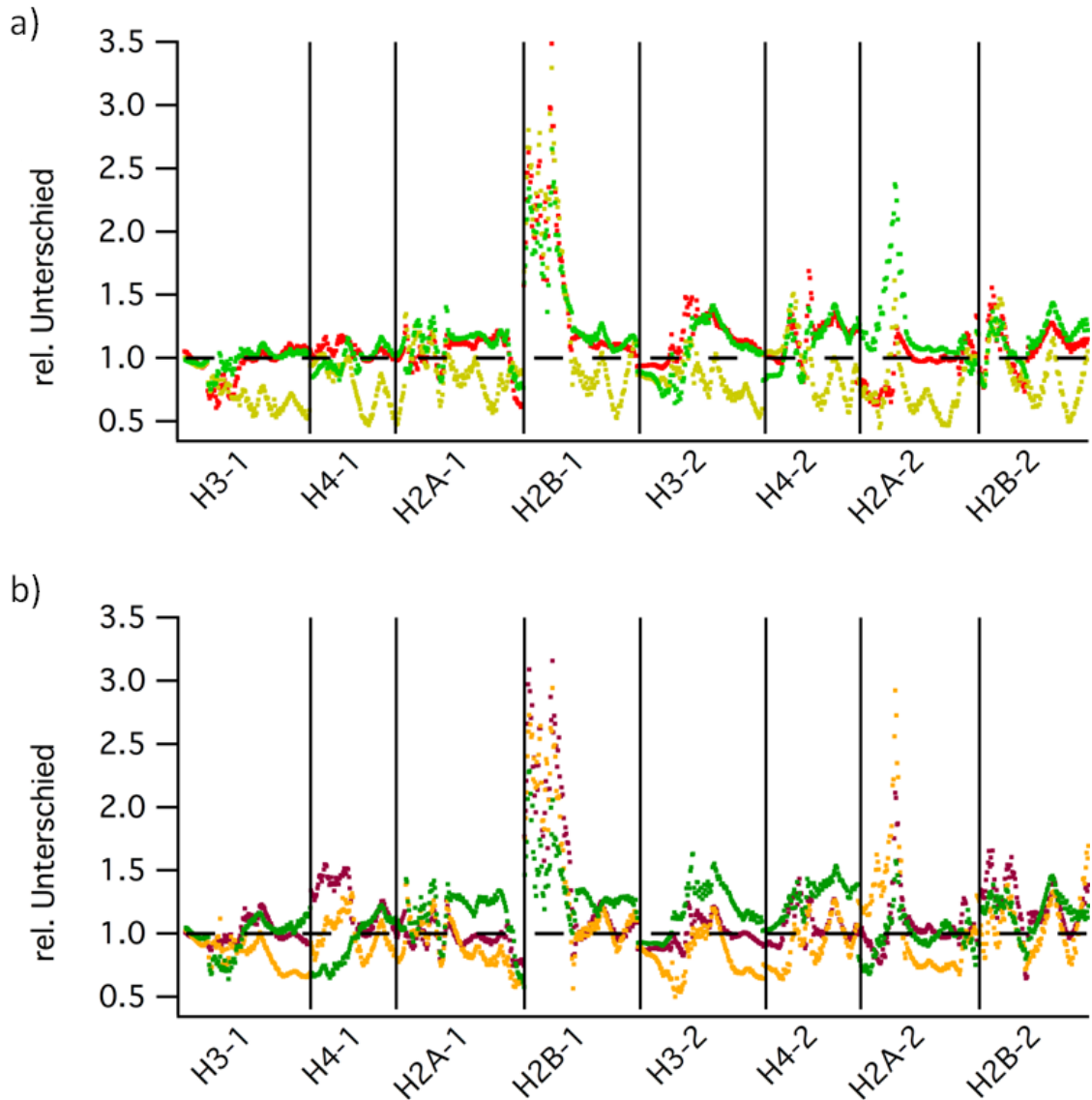


Abbildung 50: Relative Distanzveränderungen bezogen auf den Wildtyp. A) Grün: H2AR88A-Nucleosom; Rot: H2AR81A-Nucleosom; Gelb: H2AR81AR88A-Nucleosom., B) Dunkelgrün: H2AR88E-Nucleosom; Bordeaux: H2AR81E-Nucleosom; Orange: H2AR81ER88E-Nucleosom.

Der Vergleich der relativen Unterschiede zeigt, dass bei dieser Art von Simulationen alle Mutationen hauptsächlich das Verhalten des c-terminalen Bereichs von H2B-1 und H2A-2 beeinflussen. Die übrigen Bereiche zeigen eine dem Wildtyp-Nucleosom entsprechende Positionsänderung der AS-Kugeln. Allerdings kann durch diese Art der Simulationen kein Rückschluss über den Einfluss der Mutationen auf das Öffnungsverhalten des Nucleosoms gezogen werden. Hierfür müsste auch die Bewegung der DNA-Kugeln berücksichtigt werden, welche im Rahmen der hier durchgeführten Simulationen am jeweiligen Ausgangspunkt fixiert vorliegen.

Mit Hilfe der Simulationen konnte also gezeigt werden, dass der kleinste Abstand zwischen dem H3-Histonschwanz und der DNA im Bereich von ± 15 bp bis ± 25 bp von der

Dyadenachse auftritt. Für die Charakterisierung potentieller Interaktionen und Dynamiken des H3-Histonschwanzes mittels FRET ist die Distanz zwischen diesem Bereich und der Position H3K4 bzw. H3K9 mit 2 – 3 nm jedoch relativ klein, da in den Simulationen nur der Abstand zwischen dem α -C-Atom und dem Phosphat-Rückgrat der DNA berechnet wurde. Für FRET-Experimente wird dieser Abstand durch die Linker (ca. 1 nm) zwischen Farbstoff und Protein bzw. DNA auf 4 -5 nm vergrößert und gestaltet sich somit für FRET-basierte Messungen als ideal (siehe 2.2).

5.2.6. **Intranukleosomale Interaktion von H3K9C**

Für die Analyse der intranukleosomalen Interaktionen des H3-Histonschwanzes wurden in diesem Fall die Position K9C mit dem Donorfluorophor und verschiedene Positionen auf der DNA mit dem Akzeptorfluorophor markiert. Da durch FRET-Messungen lediglich Distanzen zwischen verschiedenen Positionen bestimmt werden, können Interaktionen im eigentlichen Sinne mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Allerdings lassen andere Studien vermuten, dass es intranukleosomale Interaktionen gibt [52][53], weshalb im Weiteren von Interaktionen und Wechselwirkungen gesprochen wird. Die ausgewählten Positionen basieren zum einen auf Molekulardynamik-Simulationsergebnissen, die von Ruihan Zhang während ihrer Doktorarbeit erzielt wurden. Zum anderen wurden die unter 5.2.5 beschriebenen grobkörnige Simulationen berücksichtigt. Abbildung 51 enthält die Ergebnisse von spFRET-Messungen bei denen die DNA an Position +15 bp bzw. -15 bp im Bezug auf das Zentrum der DNA-Sequenz oder am Ende eines DNA-Arms markiert wurde.

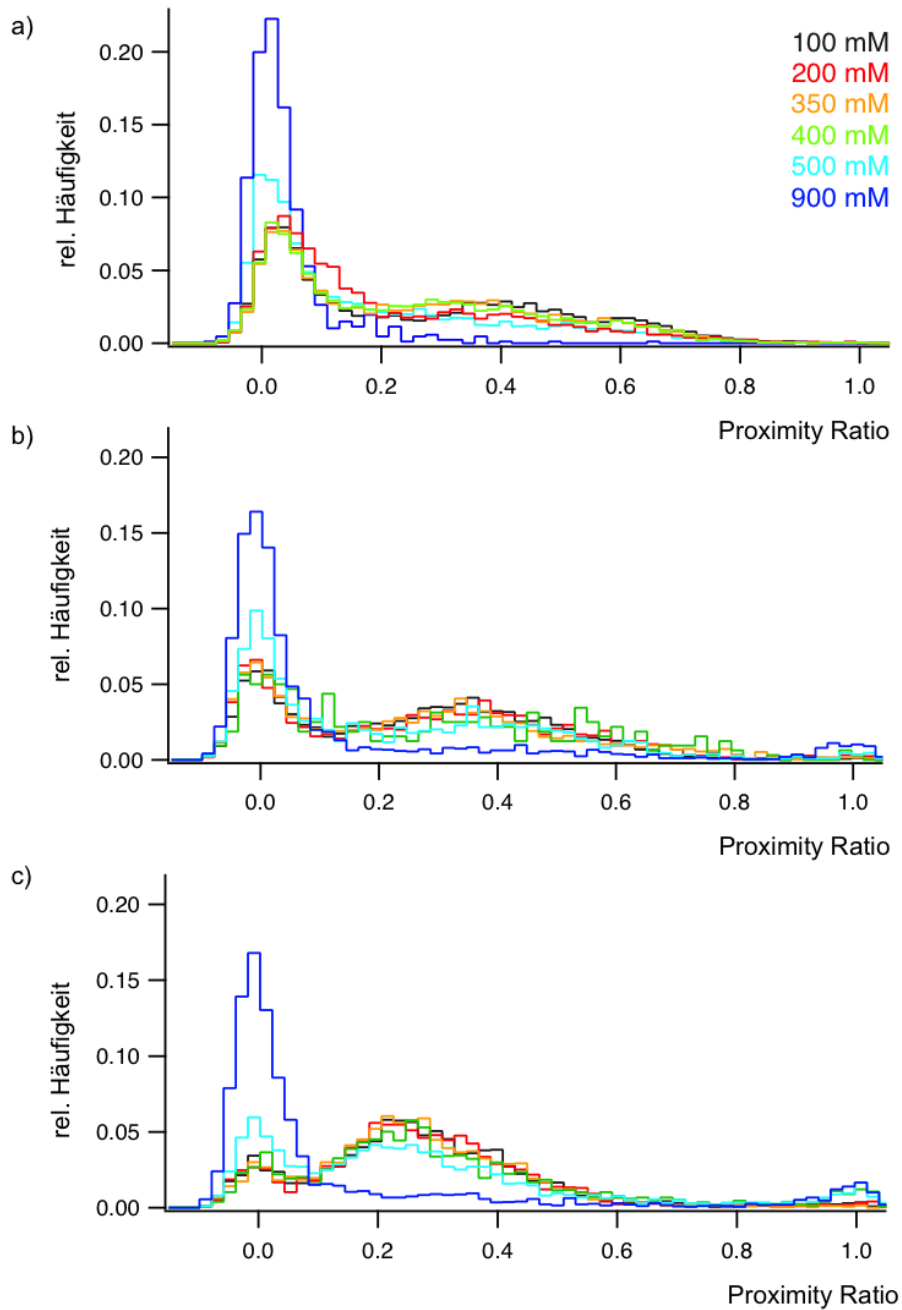


Abbildung 51: spFRET-Histogramme von H3K9C-Alexa488 markierten Nucleosomen. a) DNA mit Alexa 594 am Ende b) DNA mit Alexa 594 an Position - 15 bp c) DNA mit Alexa 594 an Position + 15 bp. Für die verschiedenen Konstrukte wurden Messungen von 100 - 900 mM NaCl durchgeführt.

Aus Abbildung 51 lässt sich entnehmen, dass für alle betrachteten Konstrukte ein FRET-Signal detektiert werden kann. Befindet sich der Akzeptorfluorophor am Ende eines DNA-Arms (a), können zwei Populationen unterschieden werden. Zum einen weist eine Vielzahl von Molekülen eine mittlere $PR \approx 0$ auf, bei denen kein FRET-Übertrag stattfindet. Die zweite Population zeigte eine sehr breite Verteilung, die keinen eindeutigen Peak erkennen lässt. Dies könnte für einen dynamischen Zustand mit unterschiedlichen Abständen

zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor sprechen. Ist die interne Dynamik schneller ($<ms$) als die zeitliche Auflösung der Detektion, kann eine solche breite Verteilung entstehen. Befindet sich der Akzeptorfluorophor hingegen an Position -15 bp (b), lässt sich ein deutlicher Peak im Bereich von $PR \approx 0,38$ detektieren. Außerdem ist der Peak bei $PR \approx 0$ weniger stark vorhanden als bei dem endmarkierten Konstrukt. Anhand von Gaußfits lässt sich der Anteil an freiem Histonschwanz auf $22 \pm 7 \%$ bestimmen. Für das letzte Konstrukt, bei dem sich der Akzeptorfluorophor an Position +15 bp (c) entfernt befindet, verringert sich der Anteil an freiem Histonschwanz weiter auf $7 \pm 7 \%$. Außerdem lässt sich hier ein klar definierter Peak mit einer mittleren $PR \approx 0,22$ detektieren. Da durch die hier verwendete Markierungsstrategie ($\sim 15\%$ Alexa488) statistisch gesehen lediglich einer der beiden H3-Histonschwänze markiert ist, könnten die beiden spiegelbildlichen DNA-Konstrukte auf ein unterschiedliches Verhalten der beiden H3-Histonschwänze hindeuten. Dies gilt jedoch nur unter der Annahme, dass die Dyadenachse den Mittelpunkt des DNA-Fragments widerspiegelt.

5.2.7. Intranukleosomale Interaktion von H3K4C

Nachdem im Abschnitt 5.2.6 bereits der Abstand zwischen H3K9C und verschiedenen Bereichen der DNA betrachtet werden konnten, wurde die gleiche Analyse für H3K4C und der DNA durchgeführt. Für H3K4C wurden jedoch nur die beiden DNAs mit Markierung an Position +15 bp und -15 bp verwendet. Die Ergebnisse der Messungen Einzelmolekülmessungen im Bereich von 100 mM – 900 mM NaCl sind in Abbildung 52 dargestellt.

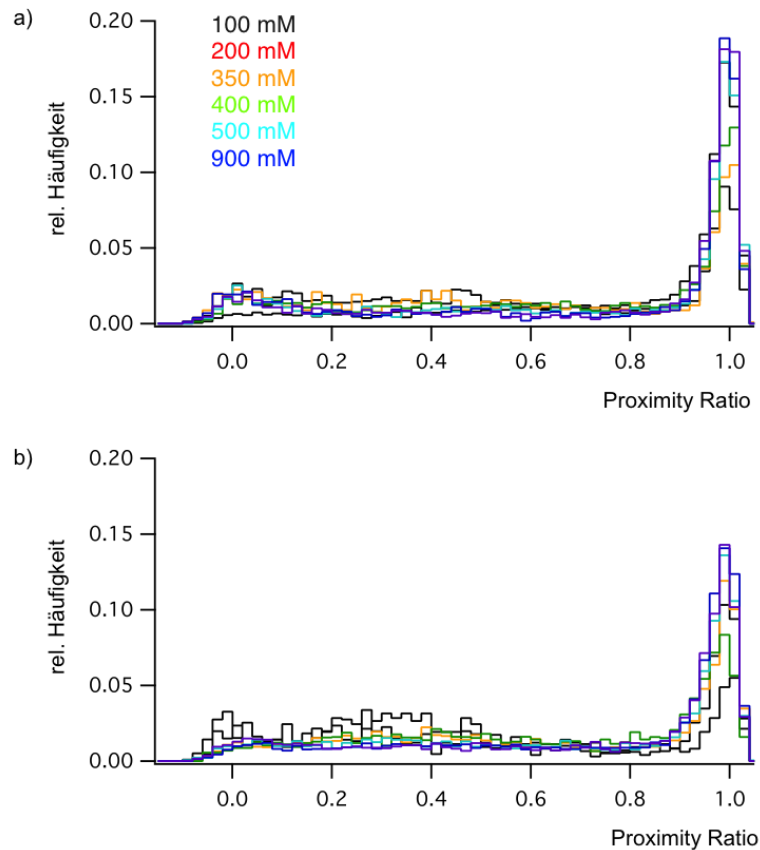


Abbildung 52: spFRET-Histogramme von H3K4C-Alexa488 markierten Nukleosomen. A) DNA mit Alexa 594 an Position - 15 bp b) DNA mit Alexa 594 an Position + 15 bp. Für die verschiedenen Konstrukte wurden Messungen von 100 -900 mM NaCl durchgeführt.

Aus den dargestellten PR-Histogrammen lassen sich im Bereich von $PR = 0 - 0,9$ keine klar definierten Populationen entnehmen. Für beide Konstrukte ist lediglich ein annähernd gleichmäßig verteiltes FRET-Signal detektierbar. Außerdem ist für beide Konstrukte eine Population mit $PR \approx 1$ vorhanden, welche durch direkte Anregung des Akzeptorfluorophors zustande kommt. Obwohl während der Oktamerrekonstitution sowohl für die H3K4C-488 Oktamere als auch für die H3K9C-488 Oktamere 15 % Alexa488-markierte H3-Histonproteine zugefügt wurden, scheinen die beiden Konstrukte eine unterschiedliche Konzentration an Alexa488 aufzuweisen. Aus diesem Grund befinden sich für die H3K4C-Nukleosomen während der Messung mehr akzeptormarkierte Nukleosomen in der Lösung als für H3K9C-Nukleosomen. Um das FRET-Signal von doppeltmarkierten Nukleosomen selektiv betrachten zu können wurden ALEX-Messungen an den H3K4C-Konstrukten durchgeführt. Die *Bursts* wurden nach der Messung bezüglich der Stöchiometrie gefiltert. Abbildung 53 zeigt die Verteilung der *Bursts* mit einer Stöchiometrie von $S > 0,2$ bis $S < 0,8$.

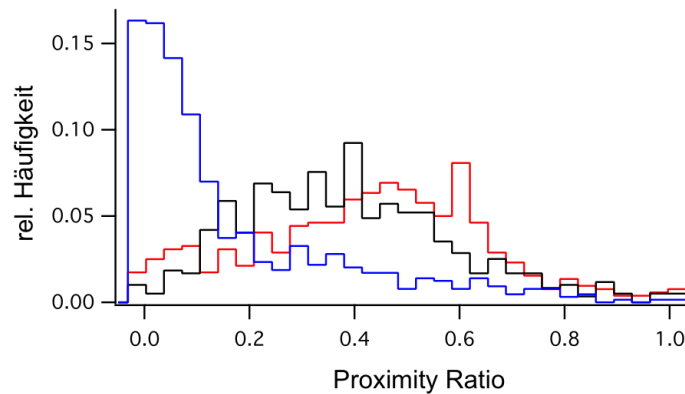


Abbildung 53: Selektive ALEX-PR-Histogramme von H3K4C-Alexa488 markierten Nukleosomen. Nukleosomen mit Alexa594-Markierung am Ende der DNA in Blau, mit Alexa 594 an Position -15 bp in Schwarz und mit Alexa 594 an Position +15 bp in Rot dargestellt. Für die verschiedenen Konstrukte wurden Messungen bei 5 mM NaCl durchgeführt.

Durch die Vorselektion bezüglich der Stöchiometrie können die einzelnen Konstrukte wesentlich besser bezüglich der Verteilung der *PR* verglichen werden. Es fällt auf, dass die zuvor beschriebene Subpopulation mit einer *PR* von $PR \approx 1$ herausgefiltert werden konnte. Diese Population geht somit vollständig auf Nukleosomen zurück, die lediglich mit dem Akzeptor markiert sind. Die beiden spiegelbildlichen Konstrukte mit +15 bp (*dyad*) und -15 bp (*inverse*) Markierung lassen vermuten, dass auch für H3K4C intranukleosomale Wechselwirkungen im Bereich der Dyadenachse stattfinden. Das *dyad*-Konstrukt weist eine Population mit $PR \approx 0,38$ auf, während die mittlere *PR* für das inverse Konstrukt $PR \approx 0,47$ beträgt. Für das endmarkierte Konstrukt ist eine Population mit $PR \approx 0$ erkennbar und ein sehr geringer Anteil an Bursts mit größerer *PR*.

Der in ALEX-Messungen betrachtete Abstand von ca. 5 – 7 nm lässt Wechselwirkung zwischen dem H3-Histonschwanz an Position K4 und der DNA im Bereich der Dyadenachse vermuten. Allerdings kommt es unter den hier gewählten Bedingungen zu einem Akzeptorüberschuss, welcher eine eindeutige Interpretation der spFRET-Daten erschwert. Die durchgeführte Vorselektion der mittels ALEX erhaltenen Daten, bezüglich der Stöchiometrie der detektierten *Bursts*, hilft dieses Problem zu beheben.

Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der hier verwendeten, donormarkierten H3-Histonproteine der Abstand zwischen dem H3-Histonschwanz und verschiedenen akzeptormarkierten Bereichen der DNA messbar ist. Im intakten Nukleosom weisen die Messungen auf Interaktionspartner im Umkreis der Dyadenachse hin. Die dargestellten Ergebnisse legen darüber hinaus die Vermutung nahe, dass der H3-Histonschwanz eine schnelle Dynamik (<ms) aufweist, die mit der hier verwendeten Methode nicht auflösbar ist.

5.2.8. Analyse des Einflusses der H2AR81AR88A-Mutation auf die intranukleosomalen Interaktionen des H3-Histonschwanzes (H3K9C)

Nachdem im Abschnitt 5.2.6 und 5.2.7 gezeigt wurde, dass durch FRET-Messungen mit dem gewählten Markierungsschema unterschiedliche Distanzen nachweisbar sind, wird nun der Einfluss der H2AR81AR88A-Mutation auf den H3-Histonschwanz betrachtet. Es handelt sich hierbei um Einzelmessungen die lediglich einen ersten Hinweis auf einen möglichen Einfluss der Mutationen auf die H3-Histonschwanz-Interaktionen und deren Dynamik geben können. Bei dem im Folgenden betrachteten Konstrukt ist der H3-Histonschwanz an K9C mit dem Donorfluorophor und die DNA an Position -15 bp (dyad) mit dem Akzeptorfluorophor markiert. Die Ergebnisse dieser Einzelmolekülmessungen sind in Abbildung 54 dargestellt. Es wurden lediglich Messungen bei niedrigen NaCl-Konzentrationen (5 mM, 100 mM und 300 mM) durchgeführt, da der Einfluss der H2A-Mutationen am eindeutigsten nachweisbar ist, solange beide (H2A-H2B)-Dimere im Nukleosom enthalten sind. Unter 5.1.5 konnte bereits gezeigt werden, dass bei höheren NaCl-Konzentrationen keine Interaktion zwischen den (H2A-H2B)-Dimeren und der DNA mehr nachweisbar ist und somit die Vermutung nahe liegt, dass die Dimere den Komplex verlassen haben. Das Verhalten des übrigen Tetramer-DNA-Komplexes sollte nach Verlust der (H2A-H2B)-Dimere nicht weiter beeinflusst werden.

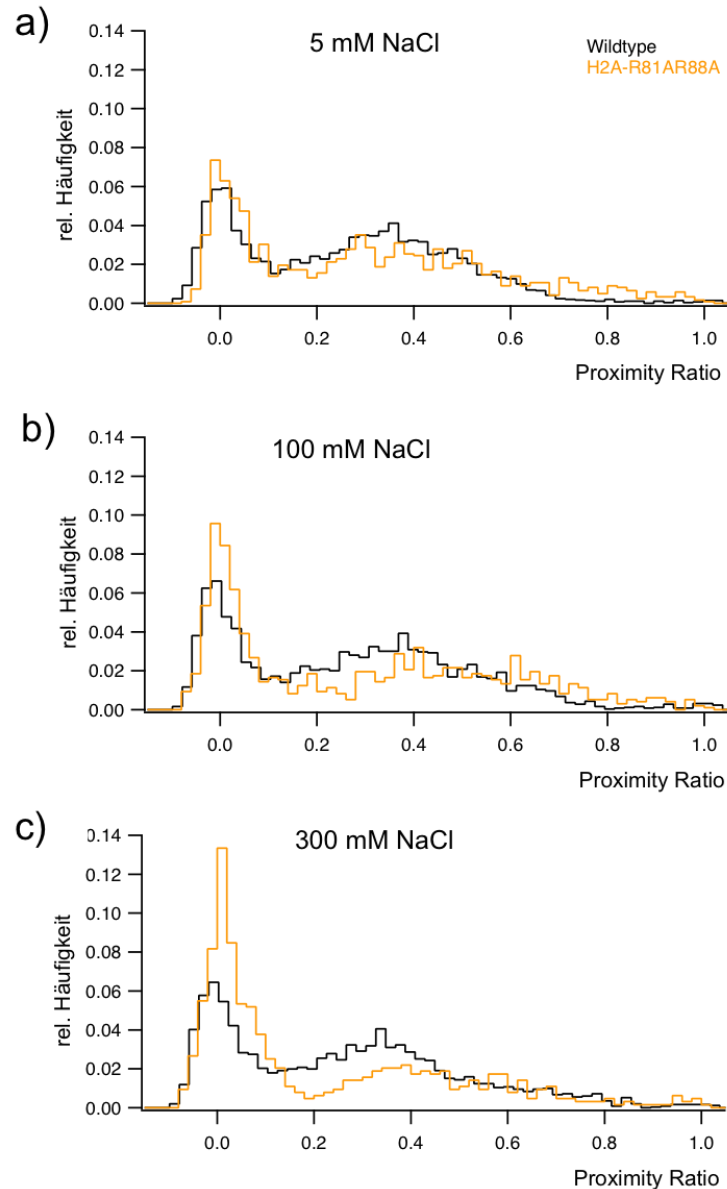


Abbildung 54: spFRET-Histogramme bezüglich des Einflusses der H2AR81AR88A-Mutation auf den H3-Histonschwanz. Schwarz: Wildtyp-Nukleosom, Gelb: H2AR81AR88A-Mutante. Es sind die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen bei 5 mM (a), 100 mM (b) und 300 mM NaCl dargestellt.

Abbildung 54 zeigt, dass die PR-Histogramme bei 5 mM NaCl kongruent sind. Es lassen sich somit bei sehr niedrigen NaCl-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verteilung der Heterogenität der H2AR81AR88A-Nukleosomen und den Wildtyp-Nukleosomen feststellen. Dies bedeutet, dass die H3-Histonschwänze bei 5 mM NaCl in beiden Fällen eine Konformation mit vergleichbarem Abstand zum Akzeptorfluorophor aufweisen. Bei höheren NaCl-Konzentrationen lassen sich hingegen eindeutige Unterschiede feststellen. Bereits bei 100 mM NaCl weisen H2AR81AR88A-Nukleosomen eine größere Population mit $PR \approx 0$ auf, welche den freien Histonschwanz widerspiegelt. Darüber hinaus ändert sich bei diesem Konstrukt auch die mittlere PR der zweiten Population. Auffällig ist, dass sich diese zuvor klar definierte Subpopulation nun über einen Bereich von $PR \approx 0,2$ bis

$PR \approx 0,8$ annähernd gleichmäßig verteilt. Diese breite Population könnte ein Zeichen für eine höhere Dynamik des H3-Histonschwanzes in Nucleosomen mit H2AR81AR88A-Mutation darstellen. Bei weiterer Erhöhung der NaCl-Konzentration wächst die Subpopulation des freien Histonschwanzes für H2AR81AR88A-Nucleosomen weiter an. Die PR Verteilung der Wildtyp-Nucleosomen zeigt hingegen über alle betrachteten NaCl-Konzentrationen keine signifikante Veränderung.

In diesem Abschnitt konnte durch Einzelmessungen gezeigt werden, dass ein Einfluss der Mutationen in der α -3 Region des H2A-Histonproteins Auswirkungen auf den H3-Histonschwanz haben. Die dezidierte Analyse dieses Effekts wird von Anja Riedel im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

5.2.9. **smMFD-Messungen der Dynamik des H3-Histonschwanzes**

Mit Hilfe von smMFD-Messungen (4.11.5) sollte die Dynamik des H3-Histonschwanzes bestimmt werden. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Seidel (Molekulare physikalische Chemie – Universität Düsseldorf) durchgeführt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Dynamik des Histonschwanzes von der Gesamtkonzentration der Nucleosomen abhängig ist, wurde diese im ersten Schritt bei fester NaCl-Konzentration (100 mM) zwischen 100 pM und 2 nM variiert. Es zeigte sich, dass vor allem der Anteil der *Bursts* mit $S = 0,5$ mit steigender Gesamtkonzentration zunimmt. Da für die anschließende Analyse ausreichend viele *Bursts* detektiert werden müssen, wurden die folgenden Messungen bei einer Gesamtkonzentration von 2 nM (40 pM markierte und 1960 pM unmarkierte Nucleosomen) durchgeführt. Abbildung 55 zeigt die Ergebnisse einer Messung des Wildtyp-H3K9C-Konstrukt mit Akzeptormarkierung an Position +15 bp von der Mitte der DNA (*inverse*). Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5,5 h bei einer NaCl-Konzentration von 100 mM.

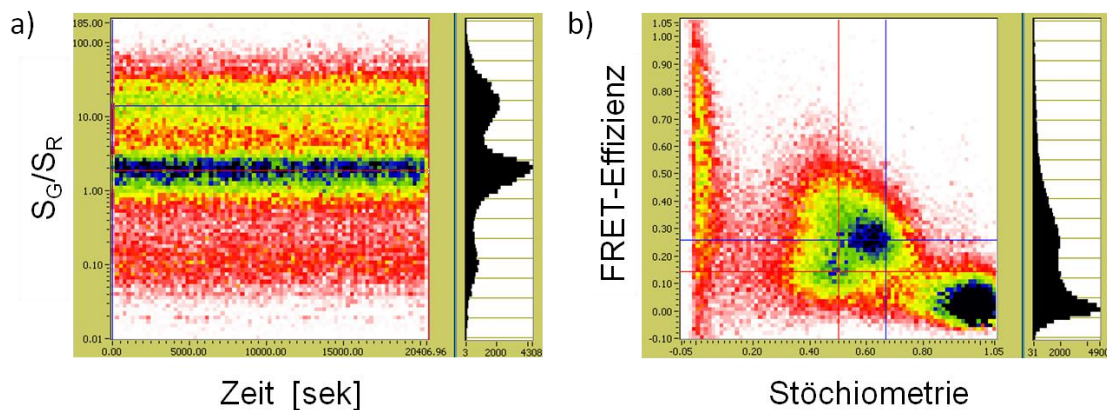


Abbildung 55: Multiparameter spFRET-Messung zur Dynamik des H3-Histonschwanzes. A) Verhältnis von detektierten grünen und roten Photonen über die Messzeit. B) Ermittelte FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Stöchiometrie.

Aus dem linken Teil der Abbildung 55 geht hervor, dass für Wildtyp-Nukleosomen (mit Donormarkierung an H3K9C) drei Populationen mit unterschiedlichem Verhältnis von grünen zu roten Photonen (unterschiedlichem FRET) existieren. Wichtig ist auch, dass sich das detektierte Signal über einen Zeitraum von 5,5 h nicht verändert und die Probe somit über den gesamten Zeitraum stabil ist. Betrachtet man im rechten Teil der Abbildung 55 die FRET-Effizienz der Probe in Abhängigkeit der Stöchiometrie, lässt sich wie bei ALEX-Messungen (4.11.4) eine Population mit $S = 0$ (Akzeptor), $S = 1$ (Donor) und $S \sim 0,5$ (Doppeltmarkierte Nukleosomen) detektieren. Da für die Auswertung der H3-Histonschwanzdynamik das Signal aus der Donor- und Akzeptorpopulation irrelevant ist, können diese beiden Populationen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Für die somit herausgefilterten doppeltmarkierten Nukleosomen lassen sich wieder drei Subpopulationen beschreiben. Zwei dieser Subpopulationen weisen eine mittlere Stöchiometrie von $S = 0,5$ auf und gehen somit auf Nukleosomen zurück, bei denen genau ein H3-Histonprotein mit einem Donor und die DNA mit einem Akzeptor markiert ist. Die zugehörigen FRET-Effizienzen von $E = 0,14$ und $E = 0,38$ zeigen wiederum, dass die beiden H3-Histonschwänze unterschiedliche Distanzen zu dem Akzeptorfluorophor aufweisen. Die dritte Subpopulation mit einer mittleren Stöchiometrie von $S = 0,62$ auf zweifach donormarkierte Nukleosomen zurückgeht. Es sind in diesem Fall beide H3-Histonproteine mit dem Donor markiert. Die zugehörige mittlere FRET-Effizienz liegt bei $E = 0,26$. Die Unterscheidung zwischen einer dynamischen und einer statischen Subpopulationen erfolgt unter Berücksichtigung der jeweiligen Lebensdauer des Donorfluorophors. Hierfür wurden die *Bursts* der einzelnen Subpopulationen selektiert und deren FRET-Effizienz gegen die Lebensdauer aufgetragen (Abbildung 56).

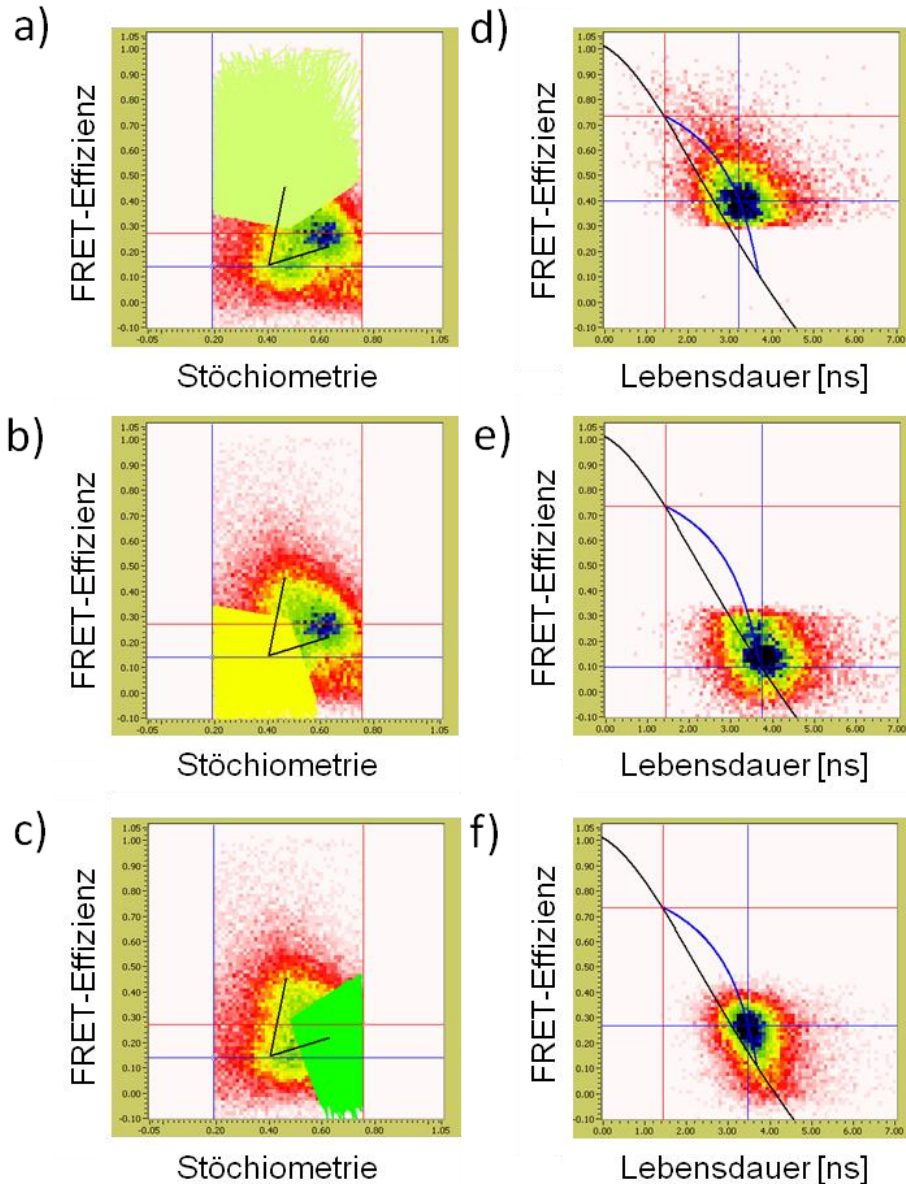


Abbildung 56: Selektive Analyse einzelner Subpopulationen bezüglich der H3-Histonschwanzdynamik. Einteilung der Burst in Subpopulation (a,b,c); Dynamik der einzelnen Subpopulation (d,e,f), schwarze Linie: Relation von Lebensdauer und FRET-Effizienz einer statischen Populationen, blau Linie: Relation Lebensdauer und FRET-Effizienz einer dynamischen Populationen.

Der linke Teil der Abbildung 56 zeigt die Unterteilung der *Bursts* in die drei zuvor erwähnten Subpopulationen. Die FRET-Effizienz der farblich unterlegten *Bursts* wurde im rechten Teil der Abbildung 56 gegen die Lebensdauer aufgetragen. Da sich die Relation zwischen der Lebensdauer und der FRET-Effizienz zwischen statischen (schwarze Linie) und dynamischen Prozessen (blaue Linie) unterscheiden, kann hierüber jede Population in statisch oder dynamisch unterteilt werden [54]. Die erste und die dritte Population (Abbildung 56, b und f) liegen eindeutig auf der blauen Linie und beschreiben somit dynamische Prozesse. Die zweite Population befindet sich aufgrund der niedrigen FRET-Effizienz am Schnittpunkt der

beiden Kurvenverläufe. Es ist daher nicht möglich eine valide Aussage über die zugrundeliegende Dynamik dieser Population zu treffen.

Ist diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Markierung der Position H3K9C die Betrachtung der Dynamik des H3-Histonschwanzes ermöglicht. Aufgrund des Markierungsgrades (~50%) kann sowohl die FRET-Effizienz von jedem der beiden H3-Histonschwänze einzeln, als auch die FRET-Effizienz bei Doppelmarkierung betrachtet werden. Es konnten darüber hinaus zwei unterschiedliche Abstände (5 – 7 nm) zu der auf der DNA markierten Position beschrieben werden, die durch die beiden Kopien der H3-Histonschwänze bedingt sind. Außerdem wurde für den H3-Histonschwanz mit kleinerem Abstand gezeigt, dass dieser eine intranukleosomale Dynamik aufweist.

5.2.10. Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Interaktionen des H3-Histonschwanzes

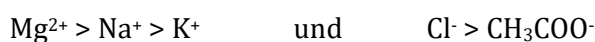
Es konnte gezeigt werden, dass die donormarkierten Histonproteine H3K4C- bzw. H3K9C geeignete Konstrukte für die Analyse der intranukleosomalen H3-Histonschwanz-Interaktionen darstellen. Die relevanten Ergebnisse lassen sich in sechs Punkten zusammenfassen:

- 1) Die eingeführten Mutationen führen sowohl in Ensemblemessungen als auch in spFRET-Messungen lediglich zu einer geringen, statistisch nicht relevanten Destabilisierung der Nukleosomen.
- 2) Nach Optimierung der Markierungsstrategie konnten die H3-Proteine zu annähernd 100% mit Alexa488 markiert werden.
- 3) Aus grobkörnigen Simulationen lassen sich Interaktionen des H3-Histonschwanzes im Bereich der Dyadenachse vermuten.
- 4) spFRET und ALEX-Messungen weisen auf Interaktionen in der Nähe der markierten Positionen (-15 bp und +15 bp von der Mitte der DNA-Sequenz) hin.
- 5) Erste Multiparameter-spFRET-Messungen lassen vermuten, dass der H3-Histonschwanz eine Dynamik im Submillisekunden Bereich besitzt.
- 6) Erste Messungen lassen einen Einfluss der betrachteten H2A-Mutanten auf die intranukleosomalen Interaktionen des H3-Histonschwanzes vermuten.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Mutationen in der $\alpha 3$ -Region des H2A-Histonproteins auf die Stabilität von Mononukleosomen untersucht. Wie bereits unter (1.6) erläutert, wurden die für diese Arbeit relevanten Aminosäuren anhand von Simulationen von Nukleosomen mit entferntem H3-Histonschwanz identifiziert. Durch das Entfernen der H3-Histonschwänze kommt es zu einer Konformationsänderung im Bereich der $\alpha 3$ -Region, die eine Veränderung der lokalen elektrostatischen Umgebung bedingt. Da experimentell gezeigt werden konnte, dass Nukleosomen ohne H3-Histonschwanz eine niedrigere Stabilität aufweisen, stellte sich die Frage, ob die Veränderung der lokalen elektrostatischen Umgebung ohne Entfernung der H3-Histonschwänze ebenfalls zu einer Destabilisierung der Nukleosomen führt.

In dieser Arbeit wurden zur Beantwortung dieser Frage die Arginine an zwei Positionen - R81 und R88 - gegen Alanine oder gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Insgesamt wurden sechs mutierte H2A-Histonproteine hergestellt, bei denen entweder eine oder beide Positionen mutiert wurden. Nach erfolgreicher Proteinaufreinigung konnten unter Verwendung der H2A-Mutanten in allen Fällen Mononukleosomen *in vitro* rekonstituiert werden. Der Erfolg der Rekonstitutionen wurde mit Hilfe von PAA-Gelen überprüft. Die Laufweite von Nukleosomen mit Mutation an Position R88 entsprach der von Wildtyp-Nukleosomen, während Nukleosomen mit R81- und Doppelmutation eine geringere Laufweite aufwiesen. Die geringere Laufweite spricht für eine offenere Konformation dieser Nukleosomen. Dies wurde experimentell über die Zugänglichkeit intrinsischer Restriktionsschnittstellen der verwendeten DNA gezeigt. Für die Analyse der Ergebnisse der durchgeführten Restriktionsanalyse muss berücksichtigt werden, dass die verwendeten Enzyme unterschiedliche Pufferkonditionen benötigen. Für das Restriktionsenzym *Hinfl* werden 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl und 0,1 mg/ml BSA benötigt. Für *PmlI* beinhaltet der Puffer 33 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat und 0,1 mg/ml BSA. Außerdem ist bereits bekannt, dass sich die Stabilität des (H2A-H2B)-Dimers unter verschiedenen Pufferbedingungen ändert und sich dieser Einfluss bezüglich der verwendeten Salze nach der Hofmeister Serie beschreiben lässt [55]. Die Hofmeister Serie teilt Salze bezüglich ihrer chaotropen Wirkung auf Makromoleküle ein [56]. Für die verwendeten Restriktionspuffer kann daher folgender Einfluss der Salze auf die Stabilität der Nukleosomen nicht ausgeschlossen werden:



Aus diesem Grund ist es nicht möglich, über die erhöhte Zugänglichkeit einer Restriktionsschnittstelle Rückschlüsse über eine potentielle Asymmetrie der Nukleosomen zu ziehen. Es können jedoch relative Änderungen zwischen den mutierten und dem Wildtyp-Nukleosom unter den verwendeten Bedingungen betrachtet werden. Die Ergebnisse lassen sich bezüglich der Position und der Ladung der eingebrachten Mutation in zwei Kategorien unterteilen:

- 1) Die Zugänglichkeit der Restriktionsschnittstellen hängt von der Position der Mutation ab: $8A < R81A < R81AR88A$
- 2) Das Einbringen von negativer Ladung hat einen größeren Einfluss als das Einbringen von neutraler Ladung: $RA < RE$

Da die zu untersuchenden Nukleosomen unterschiedliche Stabilitäten besitzen (siehe 5.1.4), können die unterschiedlichen Pufferbedingungen dazu führen, dass die verschiedenen Nukleosomen während der Restriktionsanalyse unterschiedliche Konformationszustände aufweisen.

Die geringere Stabilität der mutierten Nukleosomen konnte durch Ensemblemessungen gezeigt werden. Bei dem von Alexander Gansen etablierten Assay [57] können pro Messung verschiedene Pufferbedingungen sowie verschiedene Proben gleichzeitig analysiert werden. Hierbei wird die *Proximity Ratio* als Maß für den salzinduzierten Zerfall der Nukleosomen bestimmt. Für intern doppeltmarkierte Nukleosomen ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, dessen Wendepunkt ($c_{1/2}$ – Wert) ein Maß für die Stabilität der Nukleosomen darstellt. Vergleicht man die gemittelten $c_{1/2}$ – Werte der zu betrachtenden RA-Mutanten, so lässt sich die Stabilität der Nukleosomen folgendermaßen zusammenfassen:

$$S_{Wt} > S_{R88A} > S_{R81A} > S_{R81AR88A}$$

Für die ebenfalls hergestellten RE-Mutanten zeigt sich, dass jede dieser Mutanten weniger stabil ist als die instabilste RA-Mutante (H2AR81AR88A), aber zwischen den RE-Mutanten kein signifikanter Unterschiede mehr feststellbar ist. Für den Vergleich der Stabilitäten der mutierten Nukleosomen bezüglich der eingebrachten Ladung lässt sich somit folgender Zusammenhang festhalten:

$$S_{Wt} > S_{RA} > S_{RE}$$

Außerdem lässt sich der Zerfall der RE-Mutanten nur noch schwer durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf beschrieben, da diese Mutanten im Bereich von etwa 200 - 400 mM einen

starken Anstieg des FRET-Signals aufweisen. Der Grund für die erschwerte Interpretation der Ensemblemessungen liegt in der Heterogenität der Probe, welche über spFRET-Messungen untersucht werden kann. Diese Messungen liefern Informationen über die vorhandenen Subpopulationen und deren Verteilung.

Durch Einzelmolekülmessungen konnte festgestellt werden, dass alle hier betrachteten Nukleosomen die gleichen Subpopulationen – L-FRET, M-FRET, H-FRET (siehe 5.1.4) - während der salzinduzierten Öffnung aufweisen wie die Wildtype-Nukleosomen. Allerdings kommt es durch die eingebrachten Mutationen zu einer veränderten Verteilung der Populationen. So konnte ein gradueller Anstieg des H-FRET-Zustandes (teilweise zerfallenes Nukleosom) detektiert werden, welcher sich über den zuvor beschriebenen Trend bezüglich der Position (1) und der Ladung (2) der eingebrachten Mutation beschreiben lässt.

1) Wt < 88 < 81 < 81/88

2) RA < RE

Da dem H-FRET-Zustand eine höhere FRET-Effizienz zugrunde liegt, führt die Erhöhung dieses Zustandes zu der in Ensemblemessungen beschriebenen „Schulter“ im Bereich von 200 – 400 mM NaCl. Außerdem wird durch Einzelmolekülmessungen deutlich, dass die Doppelmutation sowohl bei RA- als auch bei RE-Mutation einen synergistischen Effekt der einzelnen Mutationen aufweist.

Die H2AR81A-Mutante wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Seidel vom Lehrstuhl für „Molekulare Physikalische Chemie“ der Universität Düsseldorf verwendet um diesen Zustand genauer zu charakterisieren und das folgende Schema (Abbildung 57) für den Zerfall aufzustellen.

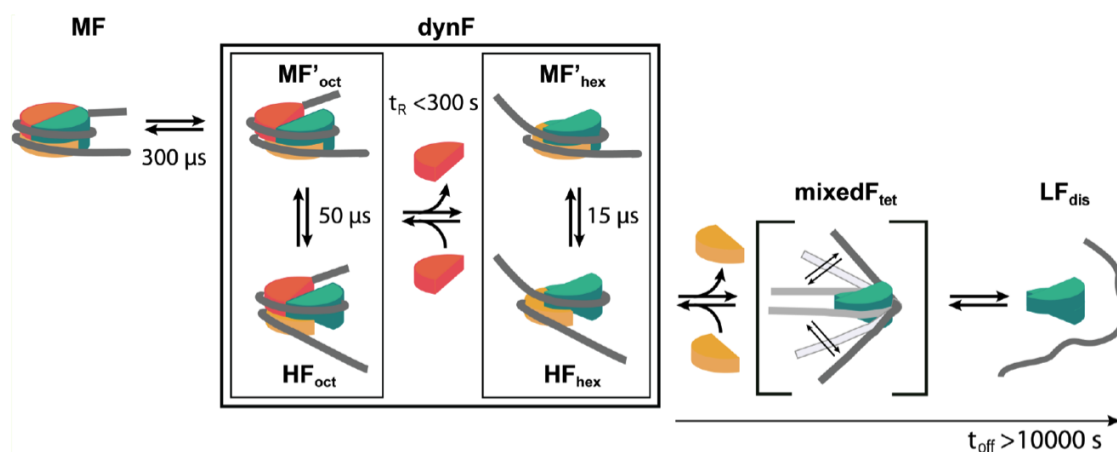


Abbildung 57: Schematische Darstellung des salzinduzierten Zerfalls von Mononukleosomen. Türkis: (H3-H4)₂-Tetramer, Rot: (H2A-H2B)-Dimer, Geld: (H2A-H2B)-Dimer, Grau: DNA. [Gansen et al. – noch nicht publiziert].

Die schematische Darstellung zeigt, dass der salzinduzierte Zerfall der Nukleosomen über mehrere zuvor nicht bekannte Zwischenschritte erfolgt. Im Vergleich zum zuvor aufgestellten Schema (1.4, Abbildung 8) kann hier der H-FRET Zustand genau definiert werden. Es handelt sich hierbei um einen heterogenen Zustand, der zwei Konformationen (HF_{Oct} , HF_{hex}) aufweist. In beiden Konformationen ist die Interaktion zwischen den (H2A-H2B)-Dimeren und dem (H3-H4)₂-Tetramer geschwächt. Da bei allen hier hergestellten H2A-Mutanten ein verstärkter H-FRET-Zustand detektiert wurde, konnte die zu Beginn aufgestellte Theorie (1.7), dass die Ladungsänderung an den mutierten Positionen die Interaktion an der Dimer:Tetramer-Grenzfläche schwächt, dadurch validiert werden [Gansen et al. -*voraussichtlich* 2016].

Ein weiterer Beweis für diese Theorie findet sich unter Verwendung des H2B-markierten Konstrukts, mit dem der Abstand der Dimere zu verschiedenen Positionen auf der DNA betrachtet werden kann. Im Wildtyp-Nukleosom weisen beide (H2A-H2B)-Dimere den gleichen Abstand zur inneren Windung der DNA (Position +53 bp) auf, weshalb lediglich eine Population mit $PR \sim 0,56$ detektiert wird. Für Nukleosomen mit H2A-Mutation tritt jedoch bei 5 mM NaCl eine weitere Population mit niedriger *Proximity Ratio* auf, deren Anteil sich über den zuvor angeführten Trend bezüglich der Position (1) und der Ladung (2) der eingebrachten Mutation beschreiben lässt.

$$1) \quad Wt < 88 < 81 < 81/88$$

$$2) \quad RA < RE$$

Da diese Population in ALEX-Messungen $S = 0,5$ aufweist und somit auf Nukleosomen mit 1:1-Stöchiometrie zurückgeht, könnte sie auf einen vergrößerten Abstand zwischen einem der (H2A-H2B)-Dimere und der DNA zurückzuführen sein. Allerdings ist der Abstand zwischen dem (H2A-H2B)-Dimer und der DNA in der Nähe der Dyadenachse (-15 bp) davon nicht beeinflusst, da hier keine zusätzliche Population detektiert wurde. Dies bedeutet wiederum, dass die Positionierung der Nukleosomen durch die Mutation nicht verändert ist.

Falls die eingebrachten Mutationen auch die Interaktion zwischen den beiden (H2A-H2B)-Dimeren abschwächen, könnte der vergrößerte Abstand zwischen einem der Dimere und der inneren Windung der DNA auch über das sogenannte Nukleosomen „gaping“ erklärt werden. Hierbei soll der innere Bereich des Nukleosoms muschelartig aufklappen, wodurch sich lediglich der Abstand zwischen den beiden inneren DNA-Windungen, sowie zwischen den beiden Dimeren ändert (Abbildung 58)[58].

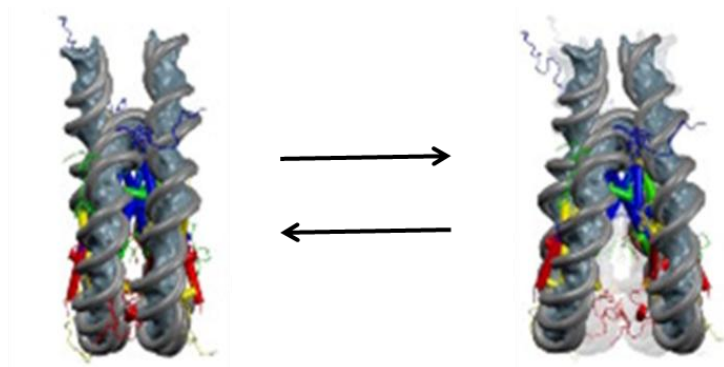


Abbildung 58: Schematische Darstellung des Nukleosoms „gaping“. Muschelartiges Aufklappen des inneren Bereichs des Nukleosoms. Abbildung angelehnt an[58].

Gaping wurde zuerst als theoretisches Modell für die Kompaktierung der 30 nm Struktur aufgestellt. Eine FRET-basierte Studie an Mononukleosomen scheint diese Aufklappbewegung zu belegen [20]. Der Wechsel zwischen den beiden Zuständen soll im Zeitraum von 1 – 10 ns stattfinden und zu Distanzveränderungen von 0,5 – 1 nm führen. Obwohl eine solche Bewegung die veränderte Dimer-DNA-Distanz erklären würde, lässt sich bei den anderen Markierungsstrategien kein Hinweis darauf finden. So sollte sich bei dieser Bewegung auch die Distanz des intern doppelmarkierten DNA-Konstrukts verändern. Da dies jedoch bei keiner der betrachteten H2A-Mutanten der Fall ist, handelt es sich bei der beschriebenen Distanzveränderung zwischen einem der Dimere und der DNA vermutlich um einen anderen Effekt.

Eine weitere Möglichkeit für diese größere Distanz könnte negative Abstoßung aufgrund der eingeführten Ladungsänderung sein. So könnten die Mutationen einen starken Interaktionspunkt in der Region ± 40 bp von der Dyadenachse [5] beeinflussen. Diese Vermutung scheint sich wiederum durch hier durchgeführte grobkörnige Simulationen zu bestätigen. Obwohl bei dieser Art von Simulation nicht alle Atome berücksichtigt werden, können hiermit sehr schnell Aussagen über das grobe Verhalten eines Makromoleküls getroffen werden. Der Vergleich der Positionen der einzelnen Aminosäuren zwischen Anfangs- und Endkonformation zeigte eine hohe Flexibilität des N-terminalen Endes des Histonproteins H2B (5.2.5). Bei der Aminosäure mit der größten Flexibilität handelt es sich um H2BK31, welche wiederum in direkter Interaktion mit der DNA steht (Abbildung 59).

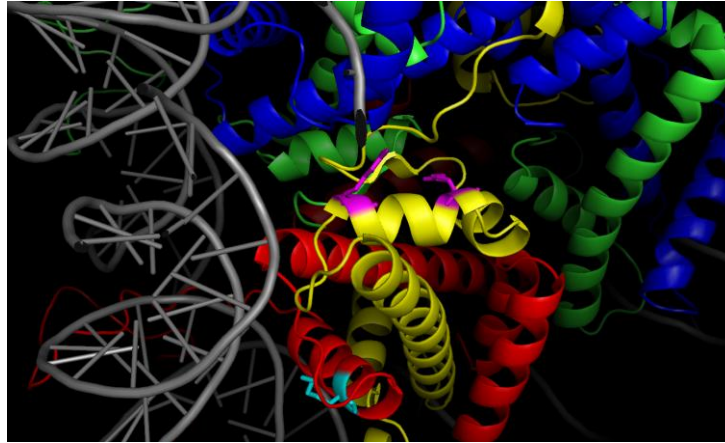


Abbildung 59: Durch H2A-Mutation beeinflusster Bereich des H2B-Proteins. Blau: H3, Grün: H4, Gelb: H2A, Rot: H2B, Grau: DNA, Magenta: An Position R81 und R88 eingebrachte H2A-Mutationen, Türkis: Durch Mutationen am stärksten beeinflusste Aminosäure – H2BK31.

Aus Abbildung 59 geht hervor, dass die Positionen R81 und R88 an denen die Mutationen eingebracht wurden, keine direkte Interaktion mit der Position H2BK31 aufweisen. Um den zuvor beobachteten Effekt zu erklären müsste es sich hier deshalb um eine indirekte, trans-Histon Wechselwirkung handeln. Solche trans-Histon Wechselwirkungen sind bereits für andere Mutationen und Modifikationen beschrieben worden [59]. Ein experimenteller Hinweis auf eine solche Abstoßungsreaktion könnten die für das dyad- und int-Konstrukt vergleichbaren $c_{1/2}$ – Werte der RE-Mutanten sein. Beim Wildtyp-Nukleosom erfolgt eine schrittweise Öffnung, die zuerst zu einem Verlust des FRET-Signals zwischen Dimer und Dyadenachse und anschließend zum Verlust des FRET-Signals zwischen Dimer und dem DNA-Arm führt. Bei den hier betrachteten RE-Mutanten erfolgen diese beiden Öffnungsschritte jedoch bei vergleichbaren NaCl-Konzentrationen. Dies könnte wiederum im Zusammenhang mit dem Einfluss der H2A-Mutationen auf den zeitbestimmende Schritt der Nukleosomenöffnung – dem Verlust eines Dimers (vgl. Abbildung 57) – zusammenhängen.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde für beide Positionen bereits ein Einfluss der Mutation *in vivo* beobachtet. Obwohl eine H2AR81A-Mutation in ersten Experimenten in *Saccharomyces Cerevisiae* sogar letal zu sein schien [60], konnte eine spätere Studie zeigen, dass eine H2AR81A-Mutation einen bestimmten Phänotyp hervorruft [61]. Der H2AR81A-Phänotyp zeigt Defekte in der Initiation der Transkription [62], der DNA Replikation [63], sowie im DNA-Reparaturmechanismus [64]. Die Position R81 ist darüber hinaus in einer der humanen H2A-Histonvarianten - H2A.Bbd - gegen Lysin mutiert [65]. Es wird davon ausgegangen, dass diese Variante zur Ausbildung bestimmter Chromatinstrukturen beiträgt und somit die DNA-Transkription und Initiation der mRNA-Prozessierung vereinfacht [66]. Auch die R88A-Mutation kommt, neben diversen anderen Mutationen, in einer der humanen H2A-

Histonvarianten, dem macroH2A1.2 vor [65]. Diese Variante spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription, der Gen-Stillegung und der X-Chromosom-Inaktivierung [67].

Da die elektrostatische Umgebung von bestimmten Bereichen der (H2A-H2B)-Dimere eine besondere Bedeutung für die Stabilität der Nukleosomen zu spielen scheinen, könnte dieser Effekt durch weitere Punktmutationen genauer analysiert werden. Hierfür würden sich unter anderem die Positionen R71 und R77 des H2A Histonproteins anbieten, da diese ebenfalls Teil der Region sind, die für die Bindung der DNA verantwortlich ist [68]. Ebenso interessant könnte eine Mutation der Position R42 sein. Das Arginin an dieser Position interagiert ebenfalls mit der DNA, führt jedoch *in vivo* zu einem weniger stark ausgeprägten Phänotyp [60][69]. Mit Hilfe dieser weiteren Mutationen könnte der Zusammenhang zwischen der Stabilität der Nukleosomen und der Ladung bzw. Position einzelner Aminosäuren weiter untersucht werden.

Auch für die Krebsforschung spielt eine detaillierte Analyse einzelner H2A-Mutationen eine entscheidende Rolle, da es bei bestimmten Krebsarten zu einem vermehrten Einbau von bestimmten H2A-Varianten [70] bzw. einem vermehrten Vorkommen von bestimmten Mutationen kommt. So wird unter anderem ein vermehrtes Vorkommen des macroH2A1.2, welches die hier betrachtete R88A Mutation trägt, mit der Progression von Krebszellen in Verbindung gebracht [70]. Ebenso wichtig ist die Analyse der verschiedenen H2A-Varianten für das Verständnis der Regulation des Zellzyklus, da auch hier unterschiedliche Expressionslevel für die einzelnen Varianten beobachtet werden können [71].

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Konstrukt entwickelt mit dem sich die intranukleosomale Dynamik des H3-Histonschwanzes nachverfolgen lässt. Obwohl der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen (1.3) des H3-Histonschwanzes bereits ausgiebig untersucht wurde [72][73], ist bisher wenig über dessen Dynamik bekannt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Entfernen des H3-Histonschwanzes zu einer Verstärkung des DNA-breathing (siehe 5.1.3) im Bereich der Austrittsstelle führt [74][28]. Diese Studien beschäftigen sich allerdings vor allem mit den strukturellen Veränderungen, die durch das Abschneiden des H3-Histonschwanzes verursacht werden. Bezüglich der Konformation und Dynamik des H3-Histonschwanzes wurden bis heute hauptsächlich Simulationen durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse zweier Simulationen, bei denen alle Atome beweglich sind, ergibt allerdings kein einheitliches Bild. Abbildung 60 zeigt mögliche Konformationen des H3-Histonschwanzes von zwei verschiedenen Simulationsergebnissen.

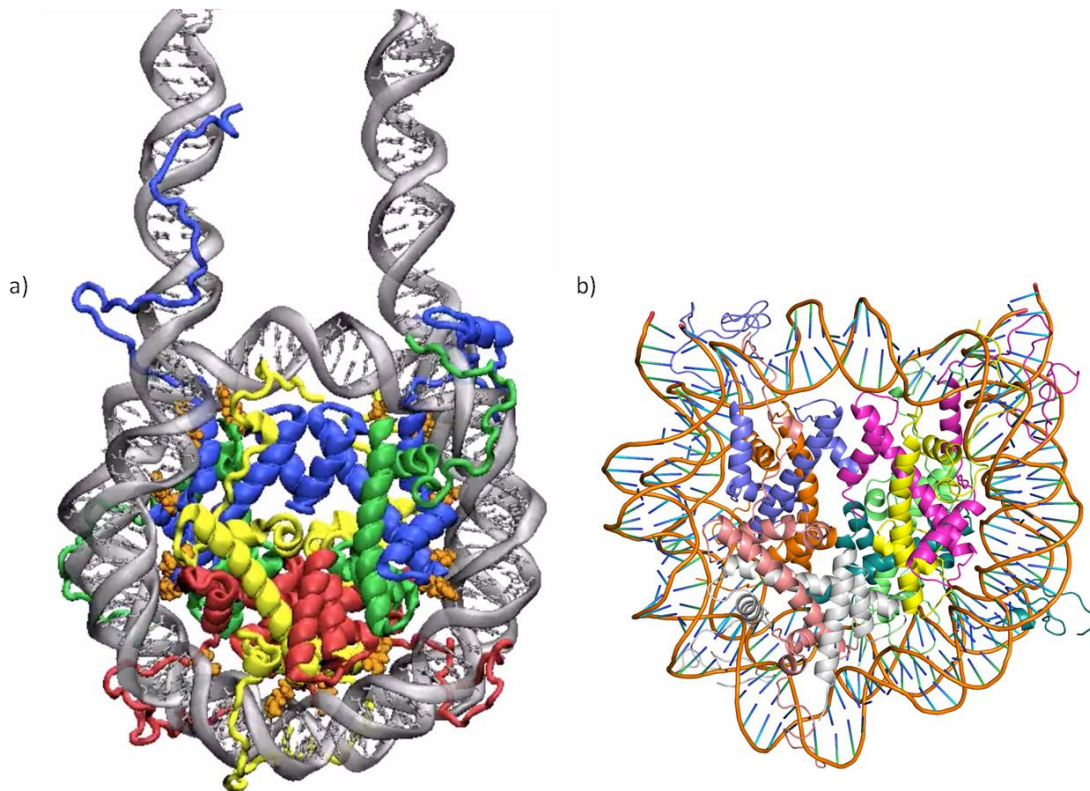


Abbildung 60: Simulationsergebnisse für die H3-Histonschwanzkonformation. A) Molekular Dynamik-Simulationen mit 20 bp Linker an jedem DNA-Arm, Abbildung übernommen aus [75]; **B)** Molekular Dynamik-Simulationen basierend auf der Kristallstruktur (PDB: 1KX5 [30]), Abbildung zur Verfügung gestellt von Ruihan Zhang (nicht publiziert).

Während der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnte weder für die Position H3K9 noch für die Position H3K4 eine definierte Wechselwirkung mit dem Ende des DNA-Arms bestätigt werden (5.2.6, 5.2.7). Allerdings muss bei diesem Konstrukt berücksichtigt werden, dass die DNA-Arme eine gewisse Dynamik aufweisen und höchstwahrscheinlich auch der H3-Histonschwanz dynamische Konformationsänderungen durchläuft. Käme es zu einer dauerhaften Interaktion des H3-Histonschwanzes mit dem DNA-Arm, sollte diese in Einzelmolekülmessungen durch eine klar definierte Population dargestellt werden. Da die FRET-Messungen lediglich eine breite, gleichmäßige *PR*-Verteilung zeigen, die auf einen dynamischen Prozess im submillisekunden Bereich schließen lässt, kann eine Interaktion zwischen DNA-Arm und H3-Histonschwanz als unwahrscheinlich angesehen werden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Shaytan et al. [75] (Abbildung 60, links), da dort eindeutig eine Interaktion mit dem DNA-Arm beschrieben wird. Allerdings ist auffällig, dass in dieser Simulation lediglich der H3-Histonschwanz mit dem DNA-Arm interagiert, der bereits in der Kristallstruktur eine ausgestreckte Konformation aufweist (siehe 1.1, Abbildung1). Es könnte sich daher um ein Artefakt handeln, dass durch die Startkonformation hervorgerufen wird.

Die Ergebnisse von Ruihan Zhang (rechter Teil der Abbildung 60) weisen auf eine kompaktere Konformation der beiden H3-Histonschwänze hin. Es scheinen hauptsächlich Wechselwirkungen zwischen dem H3-Histonschwanz und dem Bereich der Dyadenachse und der Austrittsstelle der DNA stattzufinden. Daher wurden für die hier durchgeführten spFRET-Messungen jeweils die Positionen ± 15 bp von der Mitte der DNA und die Position H3K9 fluoreszenzmarkiert. Für beide Positionen kann eine klar definierte Population mit mittlerer PR = 0,22 bzw. PR = 0,4 beschrieben werden. Dies stimmt darüber hinaus mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten, grobkörnigen Simulationen (5.2.5) überein, die ebenfalls auf eine Interaktion im Bereich der Dyadenachse schließen lassen. Da bei dieser Art von Simulation lediglich die Bewegung der Histonproteine berücksichtigt wurde, sollten die erhaltenen Ergebnisse hier lediglich zur groben Orientierung verwendet werden.

Um die Simulationsergebnisse mit den Ergebnissen der FRET-Messungen vergleichen zu können, muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Mitte der DNA nicht der Dyadenachse entspricht. Durch die Kristallstruktur des Nukleosoms unter Verwendung der Widom-601 DNA-Sequenz (PDB: 3MVD, [76] und PDB: 3LZ0, [77]) wurde deutlich, dass die Dyadenachse um 6 bp verschoben ist. Dadurch handelt sich bei den markierten Positionen um die Position -9 bp und +21 bp von der Dyadenachse. Dies erklärt wiederum warum bei den hier durchgeführten Messungen für die zuvor als „spiegelbildlich“ angesehenen Konstrukte unterschiedliche Distanzen zu den H3-Histonschwänzen bestimmt wurden. Es wäre daher auch interessant, die jeweils gegenüberliegende Position (+9 bp, -21 bp) zu markieren und auf diese Weise mit Hilfe von Multiparamete-FRET-Messungen eine Interaktionskarte für den H3-Histonschwanz anzufertigen.

Für weitere spFRET und ALEX-Messungen würde sich die Verwendung von einseitig markierten H3-Dimeren anbieten [78]. Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Beat Fierz „Biophysical Chemistry of Macromolecules“ an der „Ecole polytechnique fédérale de Lausanne“ zur Verfügung gestellt. In diesem Fall wurde die Position K16 von einem H3-Histonprotein des H3-Dimers mit Alexa488 markiert. Dieses Konstrukt bietet den Vorteil, dass keine Nukleosomen mit zwei Donorfluorophoren vorhanden sind und somit lediglich zwei FRET-Populationen entstehen. Bei den zuvor beschriebenen Konstrukten wurden hingegen je drei Populationen mit relativ ähnlichen PRs und Stöchiometrien detektiert (5.2.6). Die Unterscheidung dieser drei Populationen gestaltet sich aus diesen Gründen nicht ganz trivial.

Die Kombination der beiden in dieser Arbeit bearbeiteten Projekte lässt darüber hinaus die Vermutung zu, dass Veränderungen der elektrostatischen Umgebung im Inneren des

Nukleosoms zu einer trans-Histon Wechselwirkung führen und darüber die Interaktion und Dynamik des H3-Histonschwanzes ändern können. Um den Einfluss einer geschwächten Dimer:Tetramer-Grenzfläche auf die Dynamik des H3-Histonschwanzes genauer zu charakterisieren können die hier etablierten H2A-Mutanten verwendet werden.

Da die hier etablierten Konstrukte die Analyse des Einflusses diverser Faktoren auf die Dynamik des H3-Histonschwanzes ermöglichen, könnte zum Beispiel auch der Einfluss von spezifischen Modifikationen untersucht werden, die die Dynamik des H3-Histonschwanzes durch Ladungsänderungen beeinflussen. So könnte beispielweise der Einfluss von Phosphorylierungen und Acetylierungen mit Hilfe dieses Konstrukts direkt analysiert werden. Die genaue Charakterisierung der H3-Histonschwanz Dynamik und den damit verbundenen intranukleosomalen Interaktionen würde helfen das Verständnis der Genregulation und Epigenetik zu erweitern.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen Menschen bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski für die freundliche Aufnahme in der Abteilung *Biophysik der Makromoleküle* und die Bereitstellung des interessanten Themas. Die Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und die Möglichkeit zur Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen waren sehr motivierend.

Außerdem vielen Dank an Katalin Toth und Alexander Gansen für die geduldige Unterstützung, die anregenden Diskussionen und Ratschläge während der gesamten Arbeit.

Ein großes Dankeschön auch an Nathalie Schwarz, Maria Mildenberger und Gabrielle Müller für die Unterstützung und gute Atmosphäre im Labor.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme, die vielen Tipps und die durchweg angenehme Atmosphäre. Die Filmabende in der Küche des TP3 werden mir fehlen.

Ein besonderer Dank geht an Franziska und Johannes, die mich die letzten drei Jahre in guten und schlechten Zeiten ertragen haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich auf meinem gesamten bisherigen Lebensweg unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Vielen Dank!

8. Literaturverzeichnis

- [1] A. R. Cutter and J. J. Hayes, "A brief review of nucleosome structure.," *FEBS Lett.*, vol. 589, no. 20 Pt A, pp. 2914–22, Oct. 2015.
- [2] G. Li and D. Reinberg, "Chromatin higher-order structures and gene regulation," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 21, no. 2, pp. 175–186, 2011.
- [3] P. T. Lowary and J. Widom, "Nucleosome packaging and nucleosome positioning of genomic DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 4, pp. 1183–1188, 1997.
- [4] F. Battistini, C. A. Hunter, E. J. Gardiner, and M. J. Packer, "Structural mechanics of DNA wrapping in the nucleosome.," *J. Mol. Biol.*, vol. 396, no. 2, pp. 264–279, 2010.
- [5] M. a Hall, A. Shundrovsky, L. Bai, R. M. Fulbright, J. T. Lis, and M. D. Wang, "High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 124–129, 2009.
- [6] K. Luger and F. Collins, "Nucleosomes: Structure and Function," *Life Sci.*, pp. 1–8, 2001.
- [7] T. J. Richmond, K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, and D. F. Sargent, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution," *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251–260, Sep. 1997.
- [8] G. Li and P. Zhu, "Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus.," *FEBS Lett.*, 2015.
- [9] J. Langowski and H. Schiessel, *Chromatin Structure and Dynamics: State-of-the-Art*, vol. 39. Elsevier, 2004.
- [10] E. Fussner, R. W. Ching, and D. P. Bazett-Jones, "Living without 30nm chromatin fibers," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–6, 2011.
- [11] G. Felsenfeld and M. Groudiner, "Controlling the double helix," *Nature*, vol. 421, pp. 444–8, 2003.
- [12] Q. Bian and A. S. Belmont, "Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, no. 3, pp. 359–366, 2012.
- [13] A. S. Quina, M. Buschbeck, and L. Di Croce, "Chromatin structure and epigenetics.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, no. 11, pp. 1563–9, Nov. 2006.
- [14] T. Chen and S. Y. R. Dent, "Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 2, pp. 93–106, 2014.
- [15] B. D. Strahl and C. D. Allis, "The language of covalent histone modifications.," *Nature*, vol. 403, no. 6765, pp. 41–45, 2000.
- [16] T. Jenuwein and C. D. Allis, "Translating the histone code.," *Science*, vol. 293, no. 5532, pp. 1074–1080, 2001.
- [17] A. Gansen, A. Valeri, F. Hauger, S. Felekyan, S. Kalinin, K. Tóth, J. Langowski, and C. a M.

- Seidel, "Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 36, pp. 15308–15313, 2009.
- [18] V. Böhm, A. R. Hieb, A. J. Andrews, A. Gansen, A. Rocker, K. Tóth, K. Luger, and J. Langowski, "Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 3093–3102, 2011.
- [19] V. Böhm, "Untersuchungen der Dynamik von Nucleosomen mittels Einzelmolekülfluoreszenz," University of Heidelberg, 2011.
- [20] T. T. M. Ngo and T. Ha, "Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 8, pp. 3964–3971, 2015.
- [21] K. Luger and T. J. Richmond, "The histone tails of the nucleosome," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 8, no. 2, pp. 140–146, 1998.
- [22] J. V Chodaparambil, R. S. Edayathumangalam, Y. Bao, Y. J. Park, and K. Luger, "Nucleosome structure and function.," *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, no. 57, pp. 29–46, 2006.
- [23] C. L. Peterson and M.-A. Laniel, "Histones and histone modifications.," *Curr. Biol.*, vol. 14, pp. R546–R551, 2004.
- [24] P. Zhou, E. Wu, H. B. Alam, and Y. Li, "Histone cleavage as a mechanism for epigenetic regulation: current insights and perspectives.," *Curr. Mol. Med.*, vol. 14, no. 9, pp. 1164–72, 2014.
- [25] M. a Adams-Cioaba, J. C. Krupa, C. Xu, J. S. Mort, and J. Min, "Structural basis for the recognition and cleavage of histone H3 by cathepsin L.," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 197, 2011.
- [26] P. Mandal, G. K. Azad, and R. S. Tomar, "Identification of a novel histone H3 specific protease activity in nuclei of chicken liver," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 421, no. 2, pp. 261–267, 2012.
- [27] J.-A. Kim, J.-Y. Hsu, M. M. Smith, and C. D. Allis, "Mutagenesis of pairwise combinations of histone amino-terminal tails reveals functional redundancy in budding yeast.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 15, pp. 5779–84, 2012.
- [28] W. Iwasaki, Y. Miya, N. Horikoshi, A. Osakabe, H. Taguchi, H. Tachiwana, T. Shibata, W. Kagawa, and H. Kurumizaka, "Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes," *FEBS Open Bio*, vol. 3, pp. 363–369, 2013.
- [29] H. Ferreira, J. Somers, R. Webster, A. Flaus, and T. Owen-Hughes, "Histone tails and the H3 alphaN helix regulate nucleosome mobility and stability.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 11, pp. 4037–4048, 2007.
- [30] C. A. Davey, D. F. Sargent, K. Luger, A. W. Maeder, and T. J. Richmond, "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution.," *J. Mol. Biol.*, vol. 319, no. 5, pp. 1097–1113, Jun. 2002.

- [31] M. Biswas, K. Voltz, J. C. Smith, and J. Langowski, "Role of histone tails in structural stability of the nucleosome," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 12, pp. 2–13, 2011.
- [32] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Stryer Biochemie*. 2007.
- [33] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006.
- [34] K. Wilson and J. Walker, *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 7. 2010.
- [35] IUPAC, *Goldbook - Compendium of Chemical Terminology*. 2012.
- [36] D. Shrestha, A. Jenei, P. Nagy, G. Vereb, and J. Szöllösi, *Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies.*, vol. 16, no. 4. 2015.
- [37] C. Charges, P. Nitrogen, J. Hine, and H. Jaffk, "Unusually Weak Electronic Interaction between Two Aromatic Chromophores Less Than 10 Å Apart in a Rigid Model Molecule," vol. 84, no. May 1969, pp. 1–6, 1972.
- [38] A. A. Deniz, T. A. Laurence, M. Dahan, D. S. Chemla, P. G. Schultz, and S. Weiss, "Ratiometric Single-Molecule Studies of Freely Diffusing Biomolecules," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 52, pp. 233–253, 2001.
- [39] E. Nir, X. Michalet, K. M. Hamadani, T. A. Laurence, D. Neuhauser, Y. Kovchegov, and S. Weiss, "Shot-noise limited single-molecule FRET histograms: comparison between theory and experiments.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 44, pp. 22103–24, 2006.
- [40] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. a Laurence, S. Doose, E. Margeat, and S. Weiss, "Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 24, pp. 8936–8941, 2004.
- [41] G. Krainer, A. Hartmann, and M. Schlierf, "FarFRET: Extending the Range in Single-Molecule FRET Experiments beyond 10 nm," *Nano Lett.*, vol. 15, no. 9, pp. 5826–5829, 2015.
- [42] P. T. Lowary and J. Widom, "New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning.," *J. Mol. Biol.*, vol. 276, no. 1, pp. 19–42, 1998.
- [43] A. Gansen, "Chromatin at the Nanolevel - Development of a single molecule FRET experiment and analysis of the structure and stability of individual nucleosomes.," pp. 1 – 178, 2008.
- [44] S. Isbaner, "Einzelmolekülspektroskopie mit alternierender Laseranregung," Universität Heidelberg, 2014.
- [45] K. Luger, T. J. Rechsteiner, and T. J. Richmond, "Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 119, no. 4, pp. 1–16, 1999.
- [46] P. N. Dyer, R. S. Edayathumangalam, C. L. White, Y. Bao, S. Chakravarthy, U. M.

- Muthurajan, and K. Luger, "Reconstitution of Nucleosome Core Particles from Recombinant Histones and DNA," *Methods Enzymol.*, vol. 375, no. 970, pp. 23–44, 2004.
- [47] P. Atkins and J. De Paula, "Atkins' physical chemistry," in *Chemistry*, 2009, pp. 783–827.
- [48] M. Cristóvão, E. Sisamakís, M. M. Hingorani, A. D. Marx, C. P. Jung, P. J. Rothwell, C. A. M. Seidel, and P. Friedhoff, "Single-molecule multiparameter fluorescence spectroscopy reveals directional MutS binding to mismatched bases in DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 12, pp. 5448–5464, 2012.
- [49] M. Antonik, S. Felekyan, A. Gaiduk, and C. A. M. Seidel, "Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 13, pp. 6970–6978, 2006.
- [50] T. Hagai, A. Azia, E. Trizac, and Y. Levy, "Modulation of folding kinetics of repeat proteins: Interplay between intra- and interdomain interactions," *Biophys. J.*, vol. 103, no. 7, pp. 1555–1565, 2012.
- [51] V. Böhm, "Untersuchungen der Dynamik von Nucleosomen mittels Einzelmolekülfluoreszenz," 2011.
- [52] N. P. Nurse, I. Jimenez-Useche, I. T. Smith, and C. Yuan, "Clipping of flexible tails of histones H3 and H4 affects the structure and dynamics of the nucleosome," *Biophys. J.*, vol. 104, no. 5, pp. 1081–1088, 2013.
- [53] P. Y. Kan, X. Lu, J. C. Hansen, and J. J. Hayes, "The H3 tail domain participates in multiple interactions during folding and self-association of nucleosome arrays," *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 6, pp. 2084–2091, 2007.
- [54] E. Sisamakís, A. Valeri, S. Kalinin, P. J. Rothwell, and C. A. M. Seidel, "Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection," *Methods Enzymol.*, vol. 475, no. C, pp. 455–514, 2010.
- [55] L. M. Gloss and B. J. Placek, "The Effect of Salts on the Stability of the H2A–H2B Histone Dimer," *Biochemistry*, vol. 41, no. 50, pp. 14951–14959, Dec. 2002.
- [56] Y. Zhang and P. S. Cremer, "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 10, no. 6, pp. 658–663, 2006.
- [57] A. Gansen, A. R. Hieb, V. Böhm, K. Tsch, and J. Langowski, "Closing the Gap between Single Molecule and Bulk FRET Analysis of Nucleosomes," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [58] J. Mozziconacci and J. M. Victor, "Nucleosome gaping supports a functional structure for the 30 nm chromatin fiber," *J. Struct. Biol.*, vol. 143, no. 1, pp. 72–76, 2003.
- [59] I. M. Fingerman, H.-N. Du, and S. D. Briggs, "Controlling histone methylation via trans-

- histone pathways," *Epigenetics*, vol. 3, no. 5, pp. 237–242, Sep. 2008.
- [60] K. Matsubara, N. Sano, T. Umehara, and M. Horikoshi, "Global analysis of functional surfaces of core histones with comprehensive point mutants," *Genes to Cells*, vol. 12, no. 1, pp. 13–33, 2007.
- [61] M. Sakamoto, S. Noguchi, S. Kawashima, Y. Okada, T. Enomoto, M. Seki, and M. Horikoshi, "Global analysis of mutual interaction surfaces of nucleosomes with comprehensive point mutants," *Genes to Cells*, vol. 14, no. 11, pp. 1271–1330, 2009.
- [62] S. J. Silverman and G. R. Fink, "Effects of Ty insertions on HIS4 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 1246–1251, 1984.
- [63] A. A. Duina and F. Winston, "Analysis of a mutant histone H3 that perturbs the association of Swi/Snf with chromatin," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 2, pp. 561–72, 2004.
- [64] S. L. Harvey, A. Charlet, W. Haas, S. P. Gygi, and D. R. Kellogg, "Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1," *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 407–420, 2005.
- [65] C. Bönisch and S. B. Hake, "Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: More or less stable?," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 21, pp. 10719–10741, 2012.
- [66] M. Y. Tolstorukov, J. A. Goldman, C. Gilbert, V. Ogryzko, R. E. Kingston, and P. J. Park, "Histone Variant H2A.Bbd Is Associated with Active Transcription and mRNA Processing in Human Cells," *Mol. Cell*, vol. 47, no. 4, pp. 596–607, 2012.
- [67] W. Han, X. Li, and X. Fu, "The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications," *Mutat. Res.*, vol. 727, no. 3, pp. 86–103, 2011.
- [68] K. Luger and T. J. Richmond, "DNA binding within the nucleosome core," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 8, no. 1, pp. 33–40, 1998.
- [69] a. J. Hodges, I. J. Gallegos, M. F. Laughery, R. Meas, L. Tran, and J. J. Wyrick, "Histone Sprocket Arginine Residues Are Important for Gene Expression, DNA Repair, and Cell Viability in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 200, no. 3, pp. 795–806, 2015.
- [70] F. L. Monteiro, T. Baptista, F. Amado, R. Vitorino, C. Jerónimo, and L. A. Helguero, "Expression and functionality of histone H2A variants in cancer," *Oncotarget*, vol. 5, no. 11, pp. 3428–43, 2014.
- [71] A. K. Shaytan, D. Landsman, and A. R. Panchenko, "Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 32, pp. 48–57, 2015.
- [72] A. Gansen, K. Tóth, N. Schwarz, and J. Langowski, "Opposing roles of H3- and H4-acetylation in the regulation of nucleosome structure - A FRET study," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 1433–1443, 2015.
- [73] G. E. Zentner and S. Henikoff, "Regulation of nucleosome dynamics by histone

- modifications.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 259–66, 2013.
- [74] L. Bintu, T. Ishibashi, M. Dangkulwanich, Y. Y. Wu, L. Lubkowska, M. Kashlev, and C. Bustamante, "Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription," *Cell*, vol. 151, no. 4, pp. 738–749, 2012.
- [75] A. K. Shaytan, G. A. Armeev, A. Goncarencu, V. B. Zhurkin, D. Landsman, and A. R. Panchenko, "Coupling between Histone Conformations and DNA Geometry in Nucleosomes on a Microsecond Timescale: Atomistic Insights into Nucleosome Functions," *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 1, pp. 221–237, 2016.
- [76] R. D. Makde, J. R. England, H. P. Yennawar, and S. Tan, "Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle," *Nature*, vol. 467, no. 7315, pp. 562–566, 2010.
- [77] D. Vasudevan, E. Y. D. Chua, and C. A. Davey, "Crystal Structures of Nucleosome Core Particles Containing the '601' Strong Positioning Sequence," *J. Mol. Biol.*, vol. 403, no. 1, pp. 1–10, 2010.
- [78] C. C. Lechner, N. D. Agashe, and B. Fierz, "Traceless Synthesis of Asymmetrically Modified Bivalent Nucleosomes," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 55, no. 8, pp. 2903–2906, 2016.
- [79] R. K. McGinty and S. Tan, "Nucleosome Structure and Function," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 6, pp. 2255–2273, 2015.
- [80] C. a. Davey, D. F. Sargent, K. Luger, A. W. Maeder, and T. J. Richmond, "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9?? resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 319, no. 5, pp. 1097–1113, 2002.

9. Anhang

9.1. Typhoon Eval

Das folgende Skript wurde für die Auswertung der Typhoon-Daten verwendet.

"This Macro evaluates a typhoon experiment on salt series of nucleosomes"
 "Start the Macro 'Typhoon Evaluation' in the 'Macro' menu. "

```

Menu "Macros"
  "Typhoon Evaluation", TyEvalUser()
End
Menu "Macros"
  "Typhoon MultiPlot", typhoonMultiPlot()
End
Menu "Macros"
  "Typhoon Fit Sigmoid", typhoonFit()
End

Menu "Macros"
  "Typhoon Fit Sigmoid Normalize", typhoonFitNorm()
End

Menu "Macros"
  "Typhoon Fit double Sigmoid", typhoonFit2()
End

Function twosigmoid(w,x) : FitFunc
  Wave w
  Variable x

  //CurveFitDialog/ These comments were created by the Curve Fitting dialog. Altering them
will
  //CurveFitDialog/ make the function less convenient to work with in the Curve Fitting dialog.
  //CurveFitDialog/ Equation:
  //CurveFitDialog/ End of Equation
  //CurveFitDialog/ Independent Variables 1
  //CurveFitDialog/ x
  //CurveFitDialog/ Coefficients 7
  //CurveFitDialog/ w[0] = base
  //CurveFitDialog/ w[1] = max1
  //CurveFitDialog/ w[2] = half1
  //CurveFitDialog/ w[3] = width1
  //CurveFitDialog/ w[4] = max2
  //CurveFitDialog/ w[5] = half2
  //CurveFitDialog/ w[6] = width2

  return w[0]+(w[1]-w[4])/(1+exp((x-w[2])/w[3]))+ w[4]/(1+exp((x-w[5])/w[6]))
End

Function typhoonMultiPlot()

  String savDF = GetDataFolder(1)
  NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation

```

```

String ProxMeanStr, saltStr, ProxSigmaStr, y=""
String/G name
String ProxMeanNameStr="ProxMean_";
String ProxSigmaNameStr="ProxSigma_";

Prompt ProxMeanStr, "Proximity", popup WaveList("*"+ProxMeanNameStr+"*", ";", "")
Prompt saltStr, "salt concentration", popup WaveList("*salt*", ";", "") // FIXME
DoPrompt "Plot of a nucleosome salt series", ProxMeanStr, saltStr
if (V_Flag)
    return -1
endif
name=ProxMeanStr[strlen(ProxMeanNameStr),strlen(ProxMeanStr)]
ProxSigmaStr=ProxSigmaNameStr+name;

Wave x=$saltStr;
Wave test=$ProxSigmaStr;
if ( WaveExists(test) )
    Display $ProxMeanStr vs x
    ModifyGraph mode($ProxMeanStr)=3
    ErrorBars $ProxMeanStr, Y,wave=($ProxSigmaStr,$ProxSigmaStr)
else
    Display $ProxMeanStr
    print ProxMeanStr
    ModifyGraph mode($ProxMeanStr)=0
endif
SetAxis/A/N=1 left
SetAxis/A/N=1 bottom
Label left "\\Z12 bulk P";DelayUpdate
Label bottom "\\Z12 [NaCl]"

do
    Prompt ProxMeanStr, "Proximity", popup WaveList("*"+ProxMeanNameStr+"*", ";",
"" )
    Prompt saltStr, "salt concentration", popup WaveList("*salt*", ";", "") // FIXME
    DoPrompt "Plot of a nucleosome salt series", ProxMeanStr, saltStr
    if (V_Flag)
        break //return -1
    endif
    name=ProxMeanStr[strlen(ProxMeanNameStr),strlen(ProxMeanStr)]
    ProxSigmaStr=ProxSigmaNameStr+name;
    //if (!CmpStr(ProxMeanStr[0,2],"fit") )
    Wave test=$ProxSigmaStr;
    if ( WaveExists(test) )
        AppendToGraph $ProxMeanStr vs x
        ModifyGraph mode($ProxMeanStr)=3
        ErrorBars $ProxMeanStr, Y,wave=($ProxSigmaStr,$ProxSigmaStr)
    else
        AppendToGraph $ProxMeanStr
        print ProxMeanStr
        ModifyGraph mode($ProxMeanStr)=0
    endif
while(1)

Legend/C/N=text0/A=RT

SetDataFolder savDF

```

End

Function typhoonFitNorm()

```

String savDF = GetDataFolder(1)
NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation

String ProxMeanStr,ProxSigmaStr
String saltStr="salt"
String ProxMeanPreStr="ProxMean_";
String ProxSigmaPreStr="ProxSigma_";
String/G name

Prompt ProxMeanStr, "Proximity Ratio", popup WaveList(ProxMeanPreStr+"*", ";", "")
Prompt saltStr, "salt concentration", popup WaveList("*salt*", ";", "") // FIXME
DoPrompt "Sigmoid fit and normalize to fit", ProxMeanStr, saltStr
if (V_Flag)
    return -1
endif
name=ProxMeanStr[strlen(ProxMeanPreStr),strlen(ProxMeanStr)]
ProxSigmaStr=ProxSigmaPreStr+name;

//Make/D/N=4/O W_coef
//W_coef[0] = {0.0,0.4,700,80}

Variable V_FitError=0;
CurveFit Sigmoid $ProxMeanStr[pcsr(A),pcsr(B)] /X=$saltStr /D /I=1 /W=$ProxSigmaStr
if (V_FitError)
    return -1
endif

Variable rangeA=pcsr(A)
Variable rangeB=pcsr(B)
// normalize
Wave W_coef
Variable base=W_coef[0]
Variable maxP=W_coef[1]
print base, maxP
String ProxMeanNormName= ProxMeanStr+"_norm"
String ProxSigmaNormName= ProxSigmaStr+"_norm"
//print ProxMeanNormName, ProxMeanStr
Duplicate /O $ProxMeanStr, $ProxMeanNormName; Duplicate /O $ProxSigmaStr,
$ProxSigmaNormName;
Wave ProxMeanNorm=$ProxMeanNormName;
ProxMeanNorm=(ProxMeanNorm - (base+maxP) )/(-maxP)
Wave ProxSigmaNorm=$ProxSigmaNormName;
ProxSigmaNorm=(ProxSigmaNorm)/(-maxP)

Wave x=$saltStr;
String normName=name+"_norm"
Display $ProxMeanNormName vs x as normName
ModifyGraph mode=3
SetAxis/A/N=1 left
SetAxis/A/N=1 bottom
Label left "\\Z12 bulk P";DelayUpdate
Label bottom "\\Z12 [NaCl]"
ErrorBars $ProxMeanNormName, Y,wave=($ProxSigmaNormName,$ProxSigmaNormName)

```

```
CurveFit Sigmoid $ProxMeanNormName[rangeA,rangeB] /X=$saltStr /D /I=1
/W=$ProxSigmaNormName
```

```
Legend/C/N=text0/A=RT
SetDataFolder savDF
```

End

Function typhoonFit()

```
String savDF = GetDataFolder(1)
NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation

String ProxMeanStr,ProxSigmaStr
String saltStr="salt"
String ProxMeanPreStr="ProxMean_";
String ProxSigmaPreStr="ProxSigma_";
String/G name

do
    Prompt ProxMeanStr, "Proximity Ratio", popup WaveList(ProxMeanPreStr+"*", ";", "")
    Prompt saltStr, "salt concentration", popup WaveList("*salt*", ";", "") // FIXME
    DoPrompt "Sigmoid fit", ProxMeanStr, saltStr
    if (V_Flag)
        break //return -1
    endif
    name=ProxMeanStr[strlen(ProxMeanPreStr),strlen(ProxMeanStr)]
    ProxSigmaStr=ProxSigmaPreStr+name;
    CurveFit Sigmoid $ProxMeanStr /X=$saltStr /D
while(1)

//Make/D/N=4/O W_coef
//W_coef[0] = {0.0,0.4,700,80}
//CurveFit Sigmoid $ProxMeanStr[pcsr(A),pcsr(B)] /X=$saltStr /D

Legend/C/N=text0/A=RT
SetDataFolder savDF
```

End

```
// Fits two sigmoids to the data
// initial values are specified directly in this function and can only be changed here. Alternatively, use
the curve fitting dialog.
```

Function typhoonFit2()

```
String savDF = GetDataFolder(1)
NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation

String ProxMeanStr,ProxSigmaStr
String saltStr="salt"
String ProxMeanNameStr="ProxMean_";
String ProxSigmaNameStr="ProxSigma_";

String/G name
ProxMeanStr=ProxMeanNameStr+name
ProxSigmaStr=ProxSigmaNameStr+name;

Make/D/N=7/O W_coef
```



```
W_coef[0] = {0.0,0.4,750,80,0.2,950,80} // initial values
FuncFit twosigmoid W_coef $ProxMeanStr[pcsr(A),pcsr(B)] /X=$saltStr /D
```

```
Legend/C/N=text0/A=RT
SetDataFolder savDF
```

End

Function TyEvalUser() // Typhoon Evaluation user interface

```
String savDF = GetDataFolder(1)
NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation
Variable/G N = 0 // number of salt concentration
Variable/G N_R = 3 ; // number of replicas
Variable/G N_Rb =1; // number of buffer replicas
String/G name = "WT"
String/G tableName = "Table0"

//String source // name of wave that we want to analyze FIXME
Variable/G N_S =1; // number of samples FIXME not used

NewPanel/W=(50, 50, 400, 800 ) as "Typhoon Evaluation"

TitleBox tb pos={10,10},size={100,40},title="Parameters for the evaluation of a typhoon salt
series\r"
//TitleBox tb2 pos={110,10},size={400,40},variable=source

//      ListBox lb,mode=2,listWave=WaveList("*", ";", ""),pos={10,180}, size={200,100}

// user input for variables
SetVariable nameControl pos={10, 40},size={300,20},title="Name of sample";DelayUpdate
SetVariable nameControl value= name //, format="%s"
SetVariable tableControl pos={10, 80},size={300,20},title="in table";DelayUpdate
SetVariable tableControl value= tableName //, format="%s"
SetVariable N_SControl format="%d",pos={10,120},size={300,20},title="Number of samples";
DelayUpdate // FIXME
SetVariable N_SControl value= N_S, limits={1,1,1 } //FIXME
SetVariable N_RControl format="%d",pos={10,160},size={300,20},title="Number of replicas
per salt concentration"; DelayUpdate
SetVariable N_RControl value= N_R, limits={0,9,1 }
SetVariable N_RbControl format="%d",pos={10,200},size={300,20},title="Number of buffer
replicas"; DelayUpdate
SetVariable N_RbControl value= N_Rb, limits={0,9,1 }
Button startButton,pos={10,240}, title="Start evaluation", proc=typhoonEval, size={300,20}

String/G titleStr="For the typhoon data evaluation four waves are needed:\rtransfer channel
wave\rdonor channel wave\racceptor channel wave\rsalt concentration values\r\rThe first three
waves must have the following structure:"

TitleBox tbtitle pos={10,300},size={100,60},variable=titleStr, frame=2
TitleBox tbSample pos={10,410},size={20,20},title="\tSample\t\t\t\t\r\r", frame=4
TitleBox tbBuffer pos={10,470},size={100,40},title="\tBuffer\t\t\t\t\t\r", frame=4
TitleBox tbControlD pos={10,505},size={100,20},title="\tControl D-Only\t ", frame=4
TitleBox tbControlA pos={10,525},size={100,20},title="\tControl A-Only\t ", frame=4
TitleBox tbControlDA pos={10,545},size={100,20},title="\tControl DA\t\t\t ", frame=4

String/G titleStr2="Explanation of above parameters:\r'Name of sample' is an identifier of the
evaluation."
```

```
titleStr2+="The resulting Proximity Ratio\rcan be found in the wave 'ProxMean_name' in the
data folder\r'TyphoonEvaluation'.\r"
```

```
titleStr2+="The table must contain the raw data waves as specified above."
```

```
titleStr2+="\r"
```

```
TitleBox tbtitle2 pos={10,600},size={100,60},variable=titleStr2, frame=2
```

```
SetDataFolder savDF
```

```
End
```

```
// Opens a user dialog to select the raw data waves.
```

```
// The transfer, donor and acceptor channel must contain the letter 'T', 'D', and 'A', respectively
```

```
Function typhoonEval(ctrlName) : ButtonControl
```

```
String ctrlName // not used, needed for ButtonControl
```

```
String savDF = GetDataFolder(1)
```

```
NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation
```

```
String/G name, tableName
```

```
String tableWinName="WIN:"+tableName
```

```
String sourceTStr,sourceDStr,sourceAStr, saltStr
```

```
SetDataFolder savDF
```

```
print "typhoon Evaluation started for table", tableName," and name ", name
```

```
Prompt sourceTStr, "Transfer channel", popup WaveList("*T*", ";", tableWinName)
```

```
Prompt sourceDStr, "Donor channel", popup WaveList("*D*", ";", tableWinName)
```

```
Prompt sourceAStr, "Acceptor channel", popup WaveList("*A*", ";", tableWinName)
```

```
Prompt saltStr, "salt concentration", popup WaveList("*", ";", tableWinName)
```

```
DoPrompt "Evaluation of a nucleosome salt series with a Typhoon Scanner",
sourceTStr,sourceDStr,sourceAStr, saltStr//,name //, N_R,N_Rb
```

```
if (V_Flag)
```

```
return 0
```

```
endif
```

```
Wave sourceT=$sourceTStr;
```

```
Wave sourceD=$sourceDStr;
```

```
Wave sourceA=$sourceAStr;
```

```
Wave saltOriginal=$saltStr;
```

```
savDF = GetDataFolder(1)
```

```
NewDataFolder/O/S root:TyphoonEvaluation
```

```
Variable N = 0; // number of salt concentrations
```

```
Variable/G N_R; // number of replicas
```

```
Variable/G N_Rb; // number of buffer replicas
```

```
N=numpts(saltOriginal)
```

```
print "N =", N, " N_R =", N_R, " N_Rb =", N_Rb, "name =", name
```

```
// sort the raw data waves and split into sample, buffer and control components
```

```
Make/O/N=(N)/D salt=saltOriginal
```

```
print "import transfer channel";
```

```
Make/O/N=(N*N_R)/D sampleT
```

```
Make/O/N=(N_R)/D control_Donly_T
```

```
Make/O/N=(N_R)/D control_Aonly_T
```

```
Make/O/N=(N_R)/D control_DA_T
```

```
sortSource(sourceT,N,N_R,N_Rb)
```

```

Wave sample, control_Donly,control_Aonly,control_DA
sampleT=sample
control_Donly_T=control_Donly
control_Aonly_T=control_Aonly
control_DA_T=control_DA

print "import donor channel";
Make/O/N=(N*N_R)/D sampleD
Make/O/N=(N_R)/D control_Donly_D
Make/O/N=(N_R)/D control_Aonly_D
Make/O/N=(N_R)/D control_DA_D
sortSource(sourceD,N,N_R,N_Rb)
sampleD=sample
control_Donly_D=control_Donly
control_Aonly_D=control_Aonly
control_DA_D=control_DA

print "import acceptor channel";
Make/O/N=(N*N_R)/D sampleA
Make/O/N=(N_R)/D control_Donly_A
Make/O/N=(N_R)/D control_Aonly_A
Make/O/N=(N_R)/D control_DA_A
sortSource(sourceA,N,N_R,N_Rb)
sampleA=sample
control_Donly_A=control_Donly
control_Aonly_A=control_Aonly
control_DA_A=control_DA

// determine crosstalk correction factor
Variable alpha_DT
Make/O/N=(N_R)/D control_alpha_DT=control_Donly_T/control_Donly_D
alpha_DT=mean(control_alpha_DT,0,INF)
print "alpha_DT = ", alpha_DT

// determine direct excitation correction factor
Variable alpha_dir
Make/O/N=(N_R)/D control_alpha_dir=control_Aonly_T/control_Aonly_A
alpha_dir=mean(control_alpha_dir,0,INF)
print "alpha_dir = ", alpha_dir

// calculate Proximity Ratio
Make/O/N=(N*N_R)/D Prox
Make/O/N=(N*N_R)/D EE // enhanced emission
EE = (sampleT - alpha_DT*sampleD - alpha_dir*sampleA)
// CopyToSegments(salt,3)
Prox =EE/(EE + sampleD)

// calculate mean and standard deviation and save under a unique name (name identifier
specified in dialog)
String ProxStr = SegmentMeans(Prox, N_R)
String ProxSigmaStr = SegmentSTDs(Prox, N_R)
Wave ProxMean=$ProxStr
Wave ProxSigma=$ProxSigmaStr

String proxName= "ProxMean_"+name
Make/N=(N)/D/O $proxName
Wave proxNameWave=$proxName
proxNameWave=ProxMean

```

```

String proxSigmaName= "ProxSigma_"+name
Make/N=(N)/D/O $proxSigmaName
Wave proxSigmaNameWave=$proxSigmaName
proxSigmaNameWave=ProxSigma

// plot the result
Display $proxName vs salt as name
SetAxis/A/N=1 left
SetAxis/A/N=1 bottom
ModifyGraph mode=3
Label left "\\Z12 bulk P";DelayUpdate
Label bottom "\\Z12 [NaCl]"
ErrorBars $proxName, Y,wave=($proxSigmaName,$proxSigmaName)
ShowInfo

CurveFit Sigmoid $proxName /X=salt /D /I=1 /W=$proxSigmaName
Legend/C/N=text0/A=RT

// Display ProxSigma vs salt as name+" sigma"

// control: free DNA should give p=0
Variable p_control;
Variable control_A=mean(control_DA_A,0,N_R)
Variable control_D=mean(control_DA_D,0, N_R)
Variable control_T=mean(control_DA_T,0,N_R) - alpha_DT*(control_D) -
alpha_dir*(control_A);
p_control=( control_T ) / ( control_T + control_D )
print "control: free DNA should have a Proximity Ratio close to zero.\r\t P =", p_control

SetDataFolder savDF

End

// sorts a raw data wave. For each of the NN points of the sample, there are N_R replicas of the
// measurement.
// i.e. the wave contains: sample1_replica1, sample1_replica2, sample1_replica3, sample2_replica1,
// sample2_replica2, sample2_replica3, sample3_replica1,...
// values in the buffer correspond to one sample value with N_Rb replicates.
// the controls have N_R replicas in the order D-Only, A-Only, double labeled.
Function sortSource(source,NN,N_R,N_Rb)
Wave source
Variable NN, N_R, N_Rb;
// waves to return
Make/O/N=(NN*N_R)/D sample=0
Make/O/N=(NN*N_Rb)/D buffer=0
Make/O/N=(N_R)/D control_Donly=0
Make/O/N=(N_R)/D control_Aonly=0
Make/O/N=(N_R)/D control_DA=0

// read in source wave
Variable idx=0
Variable N = 0
//print "replicas =", N_R, "\tbuffer replicas =", N_Rb
do
    sample[idx]=source[idx+N]; idx+=1;
while (idx<numpts(sample))

```

```

idx=0; N+=numpnts(sample)
do
    // print idx, buffer[idx], source[idx+N]
    buffer[idx]=source[idx+N]; idx+=1;
while (idx<numpnts(buffer) )

if (numpnts(source)<( N ))
    print "Warning: control Donly missing"
endif
idx=0; N+=numpnts(buffer)
do
    control_Donly[idx]=source[idx+N]; idx+=1;

while (idx<N_R )

if (numpnts(source)<(N+N_R))
    print "Warning: control Aonly missing"
endif
idx=0; N+=N_R
do
    control_Aonly[idx]=source[idx+N]; idx+=1;

while (idx<N_R )

if (numpnts(source)<(N+2*N_R))
    print "Warning: control DA missing"
endif
idx=0; N+=N_R
do
    control_DA[idx]=source[idx+N]; idx+=1;

while (idx<N_R )

//print N

// substract background from control
//Variable B = Median(buffer, -INF, +INF)
//print "buffer median", B
// uncomment next two lines to use median background correction
//B = mean(buffer, -INF, +INF)
Variable B=buffer[0];
print "buffer to correct control: buffer[0] ", B," (used)"
control_Donly-=B
control_Aonly-=B
control_DA-=B

// average buffer replicas and match with sample
if (N_Rb>1)
    String newBufferStr
    newBufferStr=SegmentMeans(buffer,N_Rb)
    print "buffer segment mean for ", N_Rb, "segments"
    Wave newBuffer=$newBufferStr
    Redimension/N=(numpnts(newBuffer)) buffer
    buffer=newBuffer
    KillWaves newBuffer
endif
if (N_R>1)
    Duplicate/O buffer, bufferTemp;
    String bufferTempStr;
    bufferTempStr = CopyToSegments(buffer, N_R);

```

```

        Wave bufferTemp=$bufferTempStr;
        Redimension/N=(numpnts(sample)) buffer
        buffer= bufferTemp
        KillWaves bufferTemp
    endif

    // subtract background from sample
    // print "points: sample buffer", numpnts(sample), numpnts(buffer)
    sample=sample-buffer;

    //return GetWavesDataFolder(sample,2)// string is full path to wave

End

// divides the wave source in segments of length n and calculates the average of each segment
// the resulting wave (original wave name + '_m') has numpnts(source)/n elements.
Function/S SegmentMeans(source, n)
    Wave source
    Variable n
    String dest // name of destination wave
    Variable segment, numSegments
    Variable startX, endX, lastX
    dest = NameOfWave(source)+"_m" // derive name of dest from source
    numSegments = trunc(numpnts(source) / n)
    if (numSegments < 1)
        DoAlert 0, "Destination must have at least one point"
        return ""
    endif
    Make/O/N=(numSegments) $dest
    WAVE destw = $dest
    lastX = pnt2x(source, numpnts(source)-1)
    for (segment = 0; segment < numSegments; segment += 1)
        startX = pnt2x(source, segment*n) // start X for segment
        endX = pnt2x(source, (segment+1)*n - 1)// end X for segment
        // this handles case where numpnts(source)/n is not an integer
        endX = min(endX, lastX)
        destw[segment] = mean(source, startX, endX)
    endfor
    return GetWavesDataFolder(destw,2)// string is full path to wave

End

// divides the wave source in segments of length n and calculates the standard deviation of each
segment
Function/S SegmentSTDs(source, n)
    Wave source
    Variable n
    String dest // name of destination wave
    Variable segment, numSegments
    Variable startX, endX, lastX
    dest = NameOfWave(source)+"_std" // derive name of dest from source
    numSegments = trunc(numpnts(source) / n)
    if (numSegments < 1)
        DoAlert 0, "Destination must have at least one point"
        return ""
    endif
    Make/O/N=(numSegments) $dest
    WAVE destw = $dest
    lastX = pnt2x(source, numpnts(source)-1)
    for (segment = 0; segment < numSegments; segment += 1)

```

```

        startX = pnt2x(source, segment*n) // start X for segment
        endX = pnt2x(source, (segment+1)*n - 1) // end X for segment
        // this handles case where numpts(source)/n is not an integer
        endX = min(endX, lastX)
        WaveStats/Q/R=(startX,endX) source
        destw[segment] = V_sdev; // sqrt(variance((source, startX, endX))
    endfor
    return GetWavesDataFolder(destw,2)// string is full path to wave
End

```

```

Function/S CopyToSegments(source, n) // n= identical points per segment
    Wave source
    Variable n
    String dest // name of destination wave
    Variable segment, point, numSegments, numPoints
    Variable startX, endX, lastX
    dest = NameOfWave(source)+"_temp" // derive name of dest from source
    numSegments=numpts(source)
    numPoints = numSegments*n
    if (numPoints < 1)
        DoAlert 0, "Destination must have at least one point"
        return ""
    endif
    Make/O/N=(numPoints) $dest
    WAVE destw = $dest
    lastX = pnt2x(source, numpts(source)-1)
    for (segment = 0; segment < numpts(source); segment += 1)
        for (point= 0; point < n; point += 1)
            destw[point + segment*n] = source[segment]
        endfor
    endfor
    return GetWavesDataFolder(destw,2)// string is full path to wave
End

```

9.2. spFRETEval

Das folgende Skript wurde für die Auswertung der spFRET-Daten verwendet.

```

macro go()
    NewPath /O pfname1 "D:spFRET:16-5-10:" // den Ordner eintragen, wo Dateien liegen
    string filename="R88E_intdl_900mM.txt" //zwischen " " kompletten Dateinamen eingeben
    string filename2=filename[0, strlen(filename)-5]
    loadwave /A /G /P=pfadname1 filename
    Duplicate /O wave0, $("Burst_"+filename2)
    Duplicate /O wave1, $("time_"+filename2)
    Duplicate /O wave2, $("dur_"+filename2)
    Duplicate /O wave3, $("greenph_"+filename2)
    Duplicate /O wave4, $("redph_"+filename2)
    Duplicate /O wave5, $("proxi_"+filename2)
    Duplicate /O wave6, $("rate_"+filename2)
    Duplicate /O wave6, $("mask_"+filename2)
    Duplicate /O wave6, $("greenphsel_"+filename2)
    Duplicate /O wave6, $("redphsel_"+filename2)

    KillWaves /Z wave0, wave1, wave2, wave3, wave4, wave5,wave6

```

```

Make /O/D/N=70 $("hp_"+filename2)
Histogram/B={-0.2,0.02,70} $("proxi_"+filename2),$("hp_"+filename2)
duplicate /O $("hp_"+filename2), $("hp_"+filename2+"_norm")
$("hp_"+filename2+"_norm")=$("hp_"+filename2)/numpts($("proxi_"+filename2))
Display /B=calculated $("hp_"+filename2+"_norm")
ModifyGraph mode=6 //Darstellungsart des Histogramm
SetAxis/A/N=2 left
ModifyGraph freePos(calculated)={0,left}
Label left "rel. Häufigkeit" // Beschriftung y-Achse
Label calculated "Proximity Ratio" //Beschriftung x-Achse
SetAxis left -0,0.14 //Bereich der y-Achse
SetAxis calculated -0.15,1.05 // Bereich der x-Achse
ModifyGraph rgb=(0,0,0) //Farbe des Histogramms
ModifyGraph lblPos(calculated)=37 //Position der x-Achsen-Beschriftung
End

```

9.3. ALEX-3D

Das folgende Skript wurde für die dreidimensionale Darstellung der ALEX-Daten verwendet.

```

dimension=sqrt(size(Dhist,2));
alexplot=transpose(reshape(Dhist,dimension,dimension));
xaxis=linspace(0,1,dimension);
yaxis=linspace(0,1,dimension);

figure; colormap jet; cmap=colormap;
cmap(1,1)=1; cmap(1,2)=1;cmap(1,3)=1;
cmap(2,1)=0.9; cmap(2,2)=0.9;cmap(2,3)=1;
cmap(3,1)=0.8; cmap(3,2)=0.8;cmap(3,3)=1;
cmap(4,1)=0.7; cmap(4,2)=0.7;cmap(4,3)=1; colormap(cmap);
surf(xaxis,yaxis,alexplot);
xlabel('Proximity Ratio'); ylabel('Stoichiometry');
figure; colormap jet; contour(xaxis,yaxis,alexplot,30);
grid on; xlabel('Proximity Ratio'); ylabel('Stoichiometry');

```