

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Chemie und Geowissenschaften

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Oliver Piestert

aus Frankfurt am Main

Tag der mündlichen Prüfung: 24.6.2005

Studium der Konformationsdynamik von Hairpin-
Oligonukleotiden durch
Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Zusammenfassung

Die Molekularbiologie ist ein stark wachsender Bereich, in dem noch vieles unerforscht ist. Gerade die Konformation von Proteinen (Enzymen) und Nukleinsäuren hat einen starken Einfluss auf die Reaktivität. Daher besteht ein großer Bedarf an neuen Methoden, um die Dynamik der Konformationsänderungen aufzuklären. Will man die empfindliche Fluoreszenzmikroskopie dazu nutzen, benötigt man Verfahren, die eine Änderung der Konformation bzw. Bindungsbildung wie z. B. Proteinkomplex- oder Substratbindungen durch eine Veränderung messbarer spektroskopischer Parameter anzeigen. Ein Effekt, der dies ermöglicht, ist FRET – Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, eine neue Methode ist PET – Photoinduzierter Elektronen Transfer.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FRET und PET zwei komplementäre Techniken zur Verfolgung der Konformationsdynamik von Biopolymeren sind. Es konnten DNA-Hairpins synthetisiert werden und deren Konformationsdynamik zwischen geschlossener und geöffneter Form mit Hilfe der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie direkt verfolgt werden.

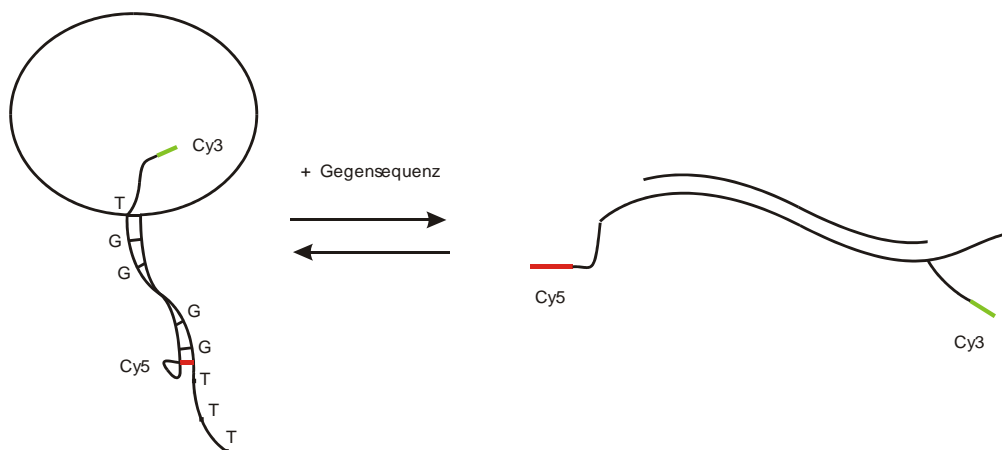


Abbildung 1: Struktur eines FRET- DNA – Hairpin in geschlossener (links) und geöffneter Form (rechts) nach Hybridisierung an die komplementäre Gegensequenz. Erniedrigt man die Stabilität des Hairpins durch eine Verringerung der Salzkonzentration, so beobachtet man ein stetiges Öffnen und Schließen des Hairpins.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten DNA-Hairpins sind einzelsträngige DNA-Sequenzen, die eine Komplementarität an beiden Enden der Sequenz aufweisen. Dadurch kommt es zur intramolekularen Hybridisierung, d.h. es bildet sich

eine Stamm/Schleife-Struktur. Die komplementären Basen bilden den Stamm des Hairpins, die restlichen Basen bilden den Loop.

Die DNA-Hairpins wurden unter unterschiedlichen Bedingungen vermessen, die dazu führen, dass die geöffnete oder geschlossene Konformation stabil ist, oder dass es zu thermisch induzierten Fluktuationen der Konformation kommt. Unter Hochsalzbedingungen (200 mM KCl) ist der DNA-Hairpin in der geschlossenen Form stabilisiert, unter Niedrigsalzbedingungen kommt es zu einer Destabilisierung des doppelsträngigen Stammes und damit verbunden zu Konformationsfluktuationen. In Gegenwart von Gegensequenz wird der DNA-Hairpin durch Hybridisierung mit der komplementären Sequenz dauerhaft geöffnet.

Ziel der Arbeit war die direkte Verfolgung der Konformationsdynamik einzelner DNA – Hairpins im Laserfokus. Spezielles Interesse galt hierbei der Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten unter Berücksichtigung des PET als neue Methode zur Bestimmung von konformativen Änderungen. Als Standardmethode zur Bestimmung von konformativen Änderungen wurde FRET verwendet. FRET ist eine Dipol-Dipol-Interaktion zweier Farbstoffe. Ein Farbstoff, der Donor, wird durch eine Lichtquelle angeregt. Durch die Interaktion wird der zweite Farbstoff, der Akzeptor, durch den Donor angeregt, der gleichzeitig wieder in den Grundzustand zurückfällt. Da diese Interaktion unter anderem abstandsabhängig ($1/r^6$) ist, können Konformationsänderungen angezeigt werden.

In Abbildung 2 sind deutlich die Unterschiede zwischen den einzelnen Konformationen eines FRET-DNA-Hairpins zu sehen. Bei diesem Hairpin wurden sowohl der Donor-, als auch der Akzeptorfarbstoff an den beiden Enden des Hairpins angebracht, so dass im geschlossenen Zustand eine hohe Energietransfer-Effizienz resultiert. Im geöffneten Zustand ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor so groß, dass nur noch wenig Energie vom Donor auf den Akzeptor transferiert wird.

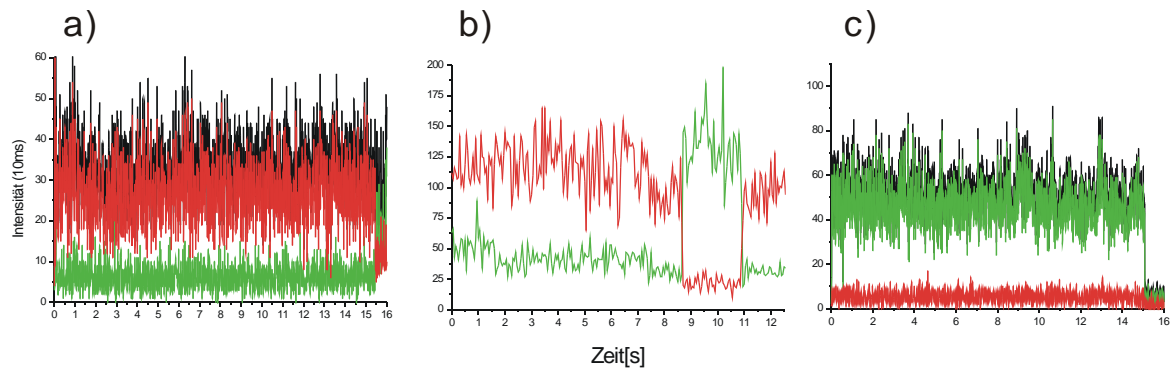


Abbildung 2: Fluoreszenzspuren einzelner FRET-DNA-Hairpins in unterschiedlichen Konformationen auf BSA - Streptavidin - Oberflächen immobilisiert: a) FRET-Hairpin geschlossen mittels Salz (200mM KCl) stabilisierter Hairpin-Stamm, b) FRET-Hairpin mit destabilisiertem Stamm (ohne Salz) wodurch es zum Öffnen des Hairpins nach 8,5 Sekunden kommt. Der Zustand des Random Coil dauert 3,5 Sekunden an, danach schließt sich der Hairpin. c) FRET-Hairpin, der durch Zugabe komplementärer DNA dauerhaft offengehalten wird und einen DNA-Doppelstrang bildet. Anregung: 532 nm, Detektion: grün von 540 nm bis 600 nm, rot von 650 nm bis 700 nm.

Unter Hochsalzbedingungen ist der Hairpin geschlossen und der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist optimal für einen effektiven Energieübertrag (Abb. 2a). Erniedrigt man die Salzkonzentration, sieht man immer wieder Wechsel in der FRET-Effizienz der Fluoreszenz – teilweise erhält man hauptsächlich Akzeptorfluoreszenz, die anzeigt, dass der Hairpin geschlossen ist, andererseits erhält man donordominierte Fluoreszenz, die anzeigt, dass der Hairpin geöffnet ist (Abb. 2b). Durch Zugabe von Gegensequenz wird der Hairpin dauerhaft geöffnet (Abb. 2c). Bestimmt man die Zeiten, in denen der DNA-Hairpin offen ist, d.h. kein FRET zwischen dem hier verwendeten Donor Cy3 und Akzeptor Cy5 stattfindet, kann die Kinetik des Prozesses bestimmt und dadurch die Geschwindigkeitskonstante der Öffnung des Hairpins berechnet werden.

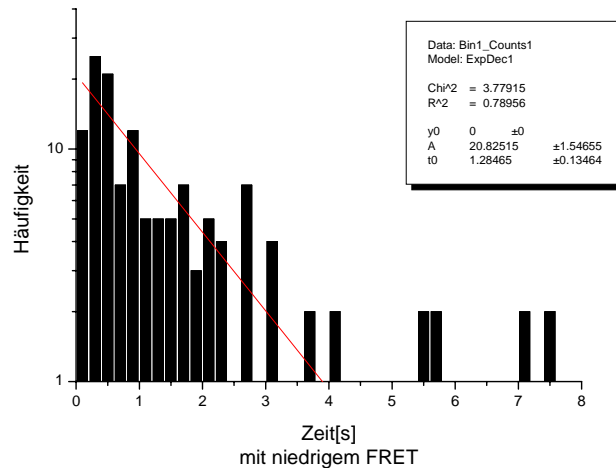


Abbildung 3: Kinetik des Schließens des Hairpins. Histogrammiert wurden die Zeiten aus den Spuren, in denen der Hairpin geöffnet ist also einen niedrigen FRET – Anteil aufweist (390 Spuren). Das Ergebnis wurde anschließend an ein monoexponentielles, mathematisches Modell angenähert.

Für das Schließen des Hairpins konnte hierbei eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 1,3 \pm 0,13 \text{ } ^1/\text{s}$ bei 22°C bestimmt werden. Die Öffnungskinetik ist wesentlich langsamer und konnte deshalb nur indirekt bestimmt werden, da diese von der Photozerstörung überlagert ist. Die Geschwindigkeitskonstante der Öffnung des Hairpins wurde deshalb über die Gleichgewichtskonstante aus der Schmelzkurve des Hairpins im Ensemble errechnet. Sie beträgt $k^* = 10,8 \pm 2 \text{ } ^1/\text{s}$. Vergleicht man dies mit der Proteinfaltung, so verlaufen Konformationsänderungen an DNA-Hairpins um einige Größenordnungen langsamer, was mit der Aufgabe der DNA als Informationsspeicher zu dienen und der dafür notwendigen größeren Starrheit erklärbar ist.

DNA–Hairpins auf Basis des Photoinduzierten Elektronen Transfer (PET) zeigen ein wesentlich komplexeres Verhalten (Abb. 4).

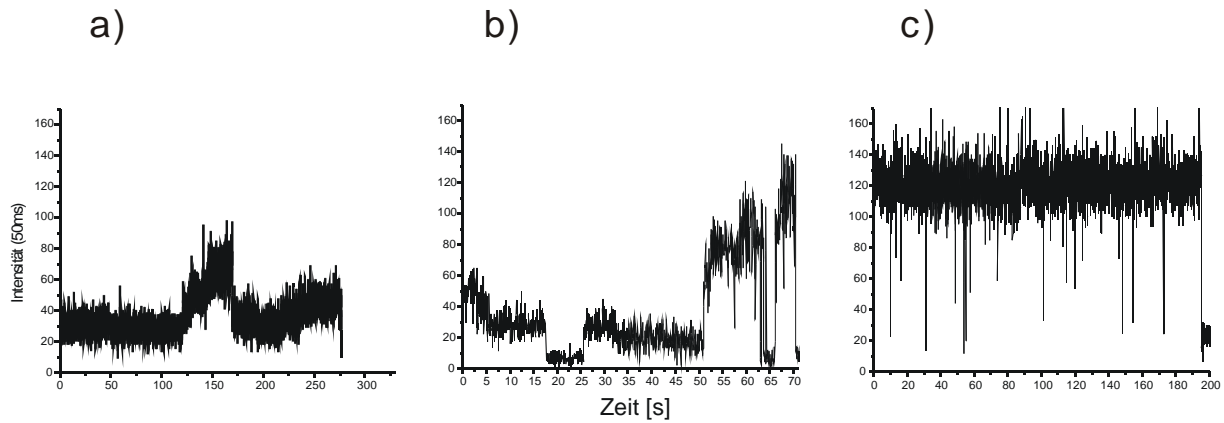


Abbildung 4: Fluoreszenzspuren einzelner, immobilisierter PET-Hairpins unter verschiedenen Bedingungen. a) Unter Hochsalz (200 mM KCl) und der damit verbundenen Stabilisierung des Stammes des Hairpins. Deutlich sind verschiedene Konformationen zu sehen, die aufgrund von geringsten Abstandsänderungen zustande kommen und unterschiedliche Interaktionsarten wie Endcapping, Interkalation und Furchenbindung repräsentieren b) Der PET-Hairpin in reinem Tris – Puffer ohne Salz zur Destabilisierung des Hairpinstammes. Deutlich sind wesentlich mehr Intensitätslevel zu sehen. Nach 50 s steigt die Fluoreszenzintensität stark an, was ein Öffnen des Hairpins anzeigt. c) Fluoreszenzspur einer mit zum Loop komplementären DNA – Sequenz, was zum Öffnen des PET – Hairpins führt. Deutlich ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität um das 4 fache im Vergleich zum geschlossenen Hairpin (Abb. 4a) zu erkennen.

Aufgrund der wesentlich stärkeren Abstandsabhängigkeit bei PET als FRET, sieht man kleinste Änderungen der Konformation, wie z.B. Interkalation und Furchenbindung. Dadurch ändert sich der Betrag des Überlappungsintegrals und das Quencherverhalten des Farbstoffes ändert sich. Autokorrelationen der Fluoreszenzintensität zeigen, dass der Farbstoff nur für Millisekunden bis Mikrosekunden einen Komplex mit dem Quencher bildet und dann wieder dissoziiert. Frühere Studien haben diese Fluktuationen als Öffnungs- und Schließungskinetik interpretiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Einblicke in die Funktionsweise von DNA-Hairpin-Farbstoffkonstrukten gewonnen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Technik ebenso erfolgreich für diagnostische Anwendungen verwendet werden kann. So konnten bestimmte DNA – Sequenzen spezifisch bis zu einer Konzentration von 10^{-13} M mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie durch Einschränkung der Konformationsdynamik nach erfolgreicher Hybridisierung nachgewiesen werden (Abb. 5).

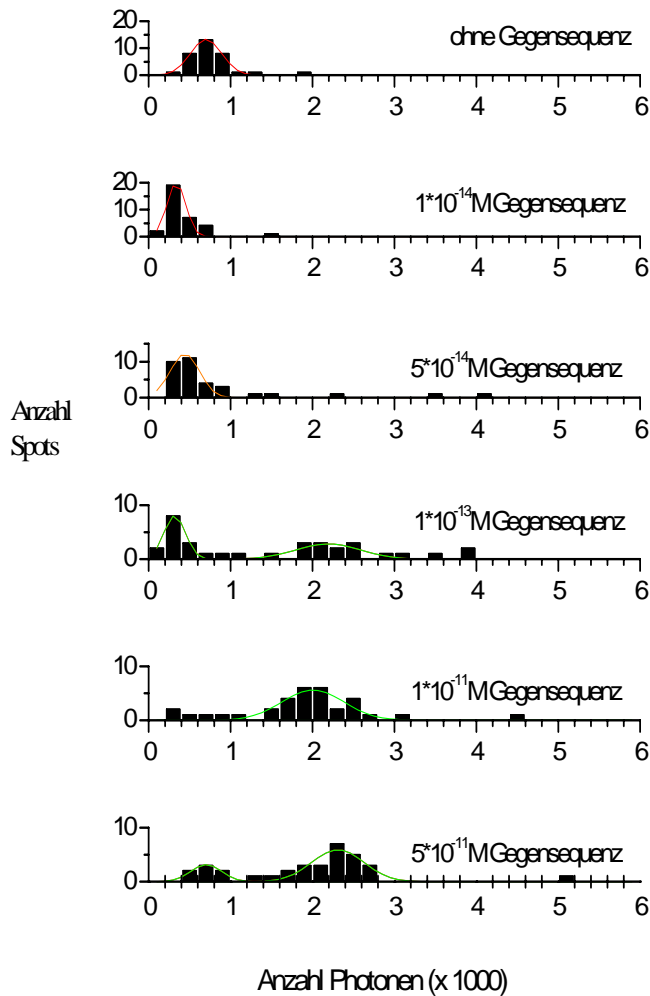


Abbildung 5: Titration einzelner immobilisierter PET-DNA-Hairpins mit Gegensequenz. Es wurde eine Oberfläche für 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen der DNA – Gegensequenz inkubiert und anschließend die Oberfläche abgescannt. Die auf der Oberfläche erhaltenen fluoreszierenden Spots wurden analysiert und das Fluoreszenzintensitätshistogramm dargestellt. Bei $1 \cdot 10^{-14}$ M und $5 \cdot 10^{-14}$ M erhält man nur einen Peak mit einer Intensität von 0,75 kHz, der die geschlossenen DNA-Hairpins repräsentiert. Erhöht man die Konzentration der DNA taucht ein weiterer Peak bei 2,25 kHz auf. Dieser zeigt die Anzahl geöffneter DNA – Hairpins an.

Durch die Bestimmung der Konformation (geöffnet oder geschlossen) auf Einzelmolekülebene konnten erstmals bestimmte Zielsequenzen im subpikomolaren Bereich nachgewiesen werden. Die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens ist für die Behandlung von Patienten außerordentlich wichtig, da hierdurch der Nachweis erbacht werden kann, ob es sich beispielsweise um einen Virus oder um ein Bakterium handelt. PET-Hairpins erlauben aber nicht nur die Unterscheidung dieser beiden Arten, sondern ermöglichen die genaue Bestimmung der Spezies. Durch die

Identifikation bestimmter Gene mit Hilfe dieser Hairpins ist es sogar möglich, Resistenzen gegenüber Antibiotika in kürzester Zeit zu detektieren und dadurch die Behandlungsstrategie zu ändern. In letzter Zeit häufen sich die Fälle bei denen Antibiotika ihren Dienst versagen. Oft ist es dann aber schon zu spät, um die Medikation anzupassen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit nach neuen Methoden zur Diagnose.

Aber es können nicht nur Krankheitserreger samt ihrer Eigenschaften nachgewiesen, sondern auch genetisch bedingte Krankheiten erfasst werden, wie z.B. eine Veranlagung zu Darmkrebs, wobei die Krankheit selbst noch nicht ausgebrochen sein muss. Durch diesen Wissensvorsprung können geeignete Maßnahmen zur Behandlung ergriffen werden.

Abstract / Summary

The molecular biology is a strong growing field in which a lot is still unexplored. Especially the conformation of proteins (enzymes) and nucleic acids has a strong influence on their reactivity. Thus, there exists a high demand for new methods for the observation of conformational dynamics. In fluorescence spectroscopy, new methods are needed that monitor the changes of conformation and reactions like complex formation of proteins or substrate binding by a change of measurable spectroscopic parameters. An effect that enables this and that is already used in biology, is FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer. A new method is PET – Photo-induced Electron Transfer.

In the context of this work, it could be shown that FRET and PET are two complementary techniques for the determination of conformational changes of biopolymers. DNA hairpins were synthesised and their conformation dynamics between closed and open form could be shown by single molecule spectroscopy.

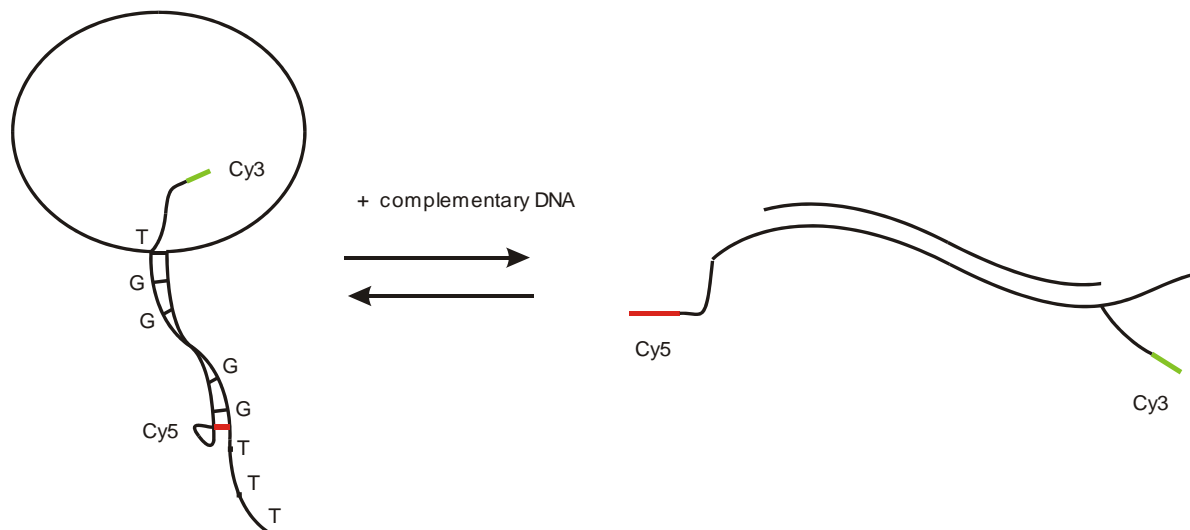


Figure 1: Structure of a FRET DNA hairpin, closed (left) and open (right), after hybridisation to the complementary sequence. If the stability of the hairpin is reduced by reduction of salt, a continuous opening and closing of the hairpin is observed.

DNA hairpins are single stranded DNA sequences that have a complementarity ends of the sequence. Due to the resulting intra-molecular hybridisation the tribe of the hairpin forms. The complementary bases form the stem and the remaining base pairs form the loop of the hairpin.

The hairpins were analysed under different conditions. The different conditions caused a stable open or closed conformation or thermally induced fluctuations of the conformation. Under high-salt conditions (200 mM KCl) the DNA hairpin is stabilised in the closed form. Under low-salt conditions the double stranded tribe is destabilised and conformational fluctuations can be seen. In the presence of complementary sequence the DNA hairpin is permanently open due to the hybridisation with the complementary sequence.

The intention of the work was the direct tracing of the conformation dynamics of single DNA hairpins in the laser focus. A particular interest lay on the determination of the association and dissociation rates in consideration of the newly developed method PET (Photo-induced Electron Transfer) for the determination of conformational changes.

For the determination of the conformational changes, the standard method FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer – was used. FRET is a dipole-dipole interaction between two dyes. One dye, the donor, is stimulated by a luminous source. Due to the interaction, the second dye, the acceptor, is excited by the donor that simultaneously falls back in its ground state. Since this interaction is dependent of the distance ($1/r^6$) amongst others, changes in the conformation can be shown.

In figure 2, the differences between the conformations of the FRET hairpins are significant. The donor and the acceptor were coupled to the opposite ends of the hairpin so that in the closed state a high energy transfer efficiency was achieved. In the open state the distance between the donor and acceptor is significantly increased so that the energy transfer is eliminated.

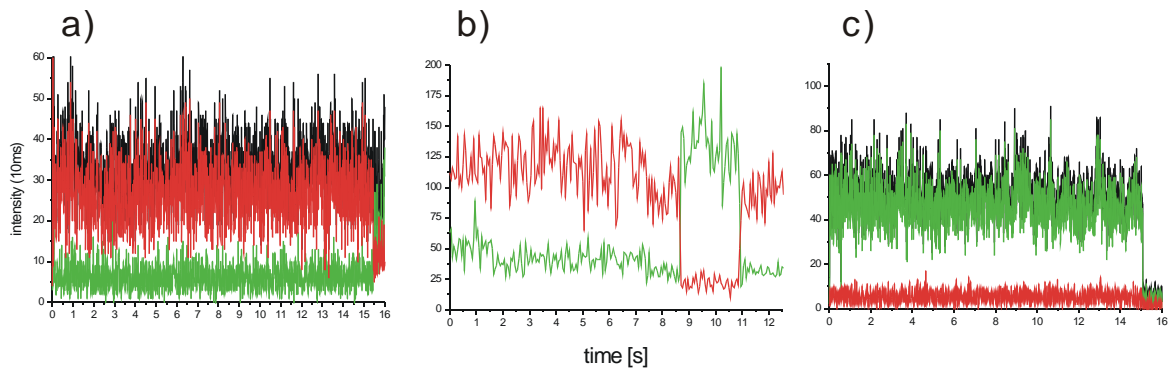


Figure 2: Fluorescence traces of single DNA hairpins in three states, immobilised on BSA-Streptavidine-surfaces. a) FRET hairpins closed, with salt-stabilised (200 mM KCl) hairpin tribe. b) FRET hairpin with destabilised tribe (without salt) whereby the hairpin opens after 8.5 seconds. The state of random coil lasts 3.5 seconds, afterwards the hairpin closes again. c) FRET hairpin that is permanently opened by DNA which is complementary to the DNA loop and forms a double-stranded DNA. Stimulation: 531 nm, detection: green from 540 nm to 600 nm, red from 650 nm to 700 nm.

Under high-salt conditions, the hairpin is closed and the distance between donor and acceptor is ideal for an effective energy transfer (Fig. 2a). A decrease in the salt concentration leads to changes in the FRET efficiency of the fluorescence again and again – once there is mainly acceptor fluorescence which indicates that the hairpin is closed, once there is donor dominated fluorescence which indicates that the hairpin is open (Fig. 2b). By addition of complementary DNA the hairpin is permanently open (Fig. 2c).

By determination of the times in which the DNA hairpin is open, i.e. no FRET occurs between the donor Cy3 and the acceptor Cy5, the kinetics of these processes can be determined and with it the rate constant of the opening of the hairpin.

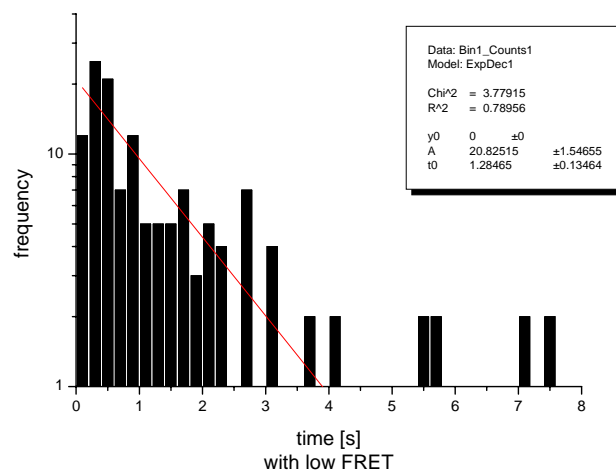


Figure 3: Kinetic of the closing of the hairpin. The histogram shows the time in which the Hairpin is open (390 traces). The result is fitted by a mono exponential decay.

For the closing of the hairpin the rate constant of $k = 1.3 \pm 0.13$ 1/s at 22°C could be determined. The opening kinetics is considerably slower and therefore could be determined only indirectly because it is superposed by the photo destruction. The rate constant of the opening of the hairpin is therefore calculated via the equilibrium constant of the melting curve of the hairpin. It is $k^* = 10.8 \pm 2$ 1/s. In comparison with protein folding, changes in the conformation of DNA hairpins are much slower which is associated with its function of storing genetic information which requires greater rigidity.

DNA hairpins on PET (Photo-induced Electron Transfer) show a significantly more complex behaviour (Fig. 4).

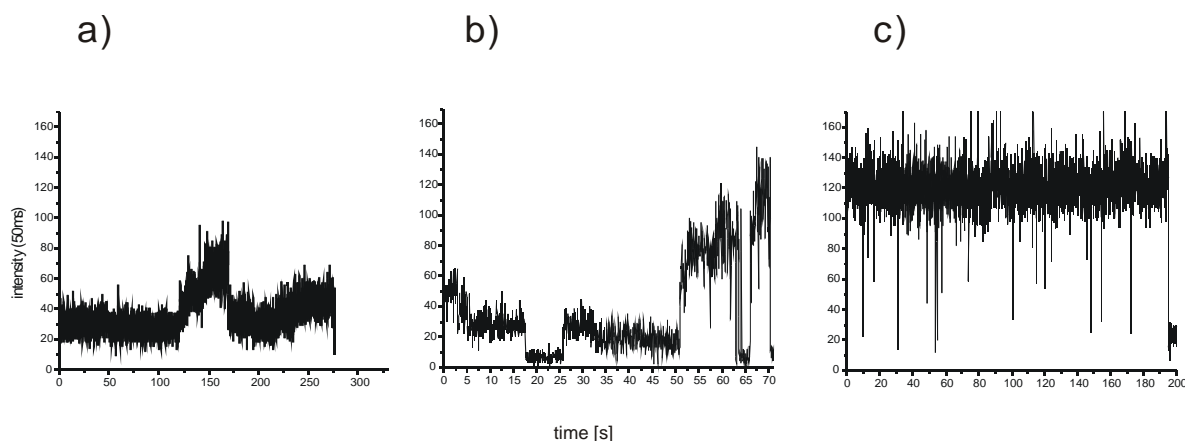


Figure 4: Fluorescence traces of single, immobilized PET hairpins under diverse conditions. a) Stabilisation of the tribe of the hairpin under high-salt conditions (200 mM KCl) different conformations can be seen. They are caused by slight changes in the distance and represent different kinds of interactions like end capping, intercalation and groove binding. b) Destabilisation of the hairpin tribe in pure Tris buffer without salt. There are several more intensity levels. After 50 seconds the intensity of the fluorescence increases strongly that indicates an opening of the hairpin. c) Fluorescence trace of an open PET hairpin bound to a DNA sequence complementary to the loop. The 4-fold increase of the fluorescence intensity in comparison to the closed hairpin (Fig. 4a) is evident.

Thereby that PET has an intrinsic lower distance dependency compared to FRET, also small changes in the conformation, like intercalation and groove binding, can be detected. Thus, the value of the overlap integral of the quencher and the dye change. Auto correlations of the fluorescence intensity show that the dye builds a complex just for ms to μ s, and then dissociates again. Former studies have taken these fluctuations as opening and closing kinetics.

In line with this work, insights in the functionality of DNA-hairpin-dye constructs could

be gained for the first time. Further it could be shown that this technique can be used for diagnostic applications. Certain DNA sequences could be detected specifically up to a concentration of 10^{-13} M by using single molecule spectroscopy (Fig. 5).

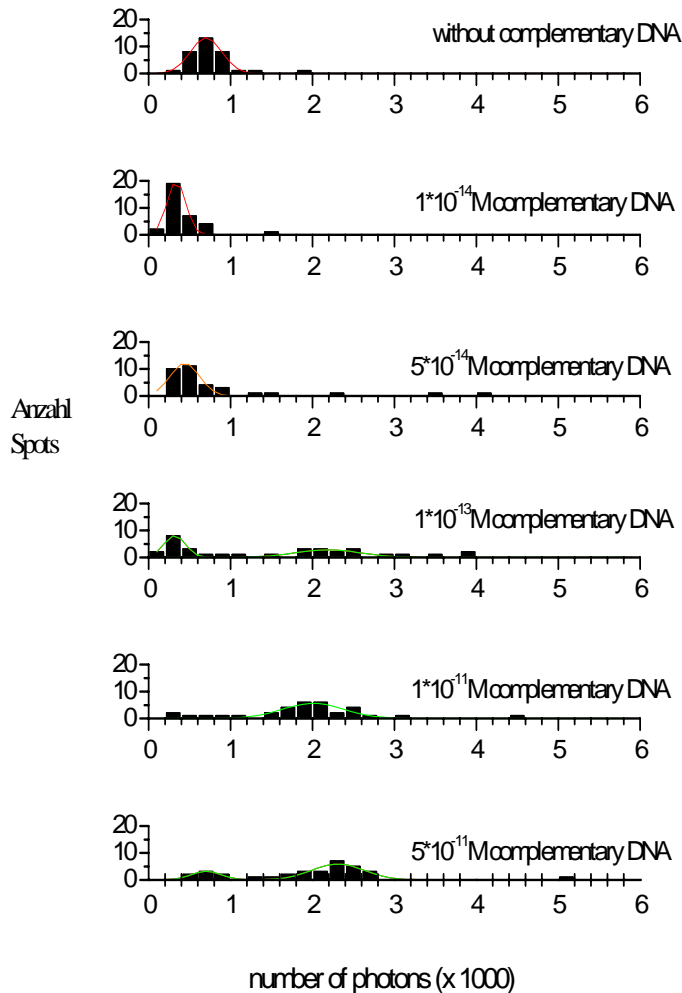


Figure 5: Titration of immobilised PET DNA hairpins with complementary sequence. A surface was incubated for 5 minutes with different concentrations of complementary DNA and afterwards was scanned. The spots got on the surface were analysed and the bar chart/histogram of the fluorescence intensities was charted. At $1 \cdot 10^{-14}$ and $5 \cdot 10^{-14}$ there is just one peak at 0.75 kHz which represent the closed DNA Hairpins. With an increase of the DNA concentration a additional peak at 2.25 kHz appears. This peak indicates that the DNA hairpin was opened.

With determination of the conformation (open / closed) on the single molecule level, for the first time it is possible to detect specific genes on a sub pico molar level. The high sensitivity can be exploited for diagnosis of infections in patients. The cause of infections (bacterial or viral) can be determined. PET hairpins allow not only the differentiation between bacterial and viral infection, but can also be used to identify the species. By identification of certain genes with help of these hairpins, it is even

possible to detect resistance against antibiotics fast and consequently change treatment. Lately, more and more antibiotics show no effect. Often then it is too late to try another medication. This highlights the necessity of new methods of diagnosis. But not only pathogens and their characteristics can be detected, but also hereditary diseases can be detected, like e.g. a disposition for bowel cancer, thereby the illness must not have come to term yet. By this head start in terms of knowledge suitable measures can be taken for the medical treatment.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	6
2.1 Spektroskopie	6
2.1.1 Absorption	6
2.1.2 Emission	8
2.1.3 Quantenausbeute	10
2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer	11
2.1.5 Fluoreszenzlöschung	12
2.1.5.1 Photoinduzierter Elektronen Transfer (PET)	14
2.1.6 FRET	16
2.1.7 Einzelmolekülspektroskopie	18
2.2 Nukleotide und Nucleinsäuren	23
2.3 Glukoseoxidase	26
2.4 Fluoreszenz – Korrelations – Spektroskopie (FCS)	29
2.4.1 Theoretische Grundlagen der Korrelation	29
2.5 Kinetik	31
2.5.1 Reaktionen erster Ordnung	31
2.5.2 Reaktionen zweiter Ordnung	32
2.5.3 Arrheniusgleichung	32
2.5.4 Michaelis Menten Kinetik	33

3. Material und Methoden	35
3.1 Farbstoffe – Proben	35
3.2 Fluoreszenzspektrometer /Absorptionsspektrometer	42
3.2.1 Einzelmolekülspektroskopie	42
3.3 Oberflächen	45
3.4 Photostabilität	47
3.5 Kontrollsystem	51
3.6 FCS	51
4. Ergebnisse und Diskussion	53
4.1 FRET – PET	53
4.2 Die intrinsische Fluoreszenz der Glucoseoxidase aus Apergillus Niger	58
4.3 Untersuchung des FRET-Hairpins auf Einzelmolekülebene	70
4.4 PET – Hairpin	88
4.5 Vergleich des PET-Hairpins mit bekannten Strukturen	107
4.6 Fluktuationen des FRET-Systems	110
5. Ausblick	115
6. Literatur	119

Anhang

FRET-Hairpin in Tris-Puffer 200 mM KCl	I
FRET-Hairpin in Tris-Puffer 0 mM KCl	VI
FRET – Hairpin mit Gegensequenz geöffnet	XIII
PET-Hairpin in Tris-Puffer 200 mM KCl	XIV
PET-Hairpin in Tris-Puffer 0 mM KCl	XIX
PET-Hairpin mit Gegensequenz geöffnet	XXIV
FRET-Doppelstrang	XXVII
Stern – Volmer Plot von Flavin-Adenosin Dinucleotid	XXX

1. Einleitung

DNA wird oft als ein statisches Molekül betrachtet, dessen Aufgabe die Informationsspeicherung ist. Jedoch muss die DNA an einer Reihe von funktionellen Prozessen teilnehmen, wie Transkription, Replikation und Reparatur. Ein elementarer Schritt bei all diesen Prozessen ist die Trennung der beiden DNA-Stränge. Obwohl dieser Prozess so elementar ist, ist er bisher kaum untersucht worden. Dies liegt vor allem an der Komplexität und der synthetisch schweren Fassbarkeit solcher Systeme.

DNA-Hairpins stellen ein Modellsystem zur Untersuchung von DNA – Oligonukleotiden dar.

Hairpins sind einzelsträngige Oligonukleotide, die aufgrund ihrer teilweisen Komplementarität an den Enden hybridisieren und so einen Stamm ausbilden. Die ungepaarten Nukleotide bilden den Loop. Gibt man zu einem solchen System Gegensequenz hinzu oder destabilisiert man den Hairpin durch Verringerung der Salzkonzentration, so öffnet sich dieser.

Aus der Möglichkeit verschiedene Konformationen durch Zugabe komplementärer DNA zu erhalten, wurde das Konzept der „Molecular Beacons“ von Tyagi *et al.* entwickelt [Tyagi 1996]. Tyagi *et al.* verwendeten an einem Ende des Oligonukleotids eine Vielzahl von verschiedenen Farbstoffe und am anderen den Quencher 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL). Im geschlossenen Zustand wird der Farbstoff durch den Quencher gelöscht. Wird der Gegenstrang des Stammes durch Öffnung des Hairpins entfernt, so leuchtet der Farbstoff wieder. Diese Proben erkennen Zielsequenzen mit hoher Spezifität. Die Schmelzkurven zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen Zielsequenz und einer Sequenz, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden. Des Weiteren wurden „Molecular Beacons“ zur Real-time Messung der *in vitro* Transkription genutzt. Dabei wird durch eine RNA-Polymerase RNA synthetisiert, die dann sofort detektiert wurde. Dadurch konnten Einblicke in die Funktionsweise von Transkriptionsfaktoren gewonnen werden, die die RNA-Polymerase stimulieren [Lodish 2004].

Spezifische Gene zu detektieren und die Expression von RNA in Zellen zu lokalisieren und in Lösungen zu quantifizieren, bietet die Möglichkeit für Fortschritte in der Molekularbiologie, der Parasitologie, dem Medikamenten Screening und der

medizinischen Diagnose. Antibiotikaresistenzen fordern im zunehmenden Maße neue Strategien in der Behandlung von Bakterienerkrankungen, besonders im Bereich der Früherkennung.

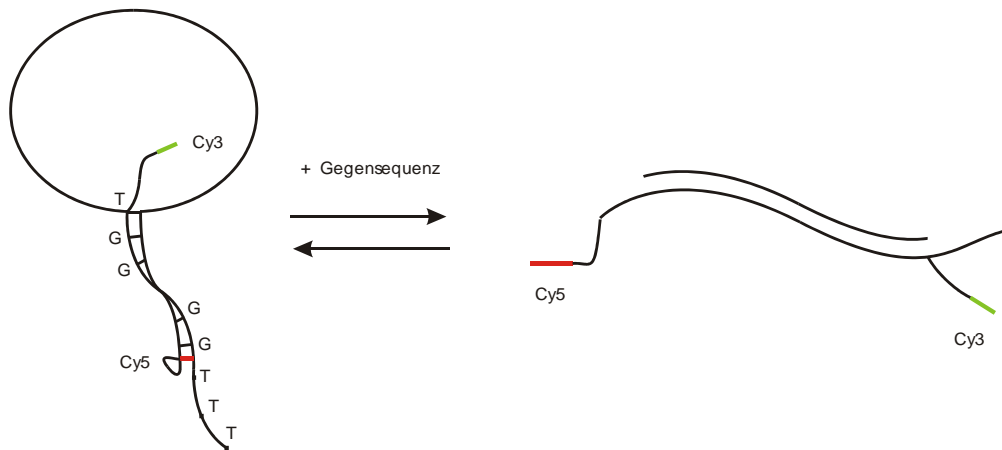


Abbildung 1: Struktur eines FRET-DNA-Hairpins in geschlossener (links) und geöffneter Form (rechts) nach Hybridisierung an die komplementäre Gegensequenz. Erniedrigt man die Stabilität des Hairpins durch eine Verringerung der Salzkonzentration, so beobachtet man ein stetiges Öffnen und Schließen des Hairpins.

Deshalb ist es wichtig, die Funktionsweise von DNA-Hairpins zu verstehen. Durch Einzelmolekülstudien müssen nicht die dynamischen Eigenschaften eines Hairpin synchronisiert werden, sondern jedes Molekül wird individuell untersucht. Dadurch ist es möglich, Konformationsänderungen unter Gleichgewichtsbedingungen zu verfolgen und die Eigenschaften einzelner Moleküle zu bestimmen, um Informationen über Inhomogenitäten zu erhalten.

Um Konformationsänderungen überhaupt detektieren zu können, wird in vielen Studien FRET – Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer – verwendet. FRET ist eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Farbstoffen. Ein Farbstoff, der Donor, wird angeregt. Durch die spektrale Überlappung der Fluoreszenz des Donors mit dem Absorptionsspektrum des 2. Farbstoffes, dem Akzeptor, kommt es durch das elektrische Feld zum Energieübertrag. Der Akzeptor wird dadurch angeregt und der Donor relaxiert. Diese Energieübertragung – FRET – ist stark abstandsabhängig ($\sim 1/\text{Abstand}^6$).

Eine andere Methode zur Bestimmung von Abstandesänderung ist PET – Photoinduzierter Elektronentransfer. Bei PET wird der Farbstoff angeregt. Dabei entstehen zwei SOMO – Orbitale. Durch einen Quencher kommt es zu einem Elektronentransfer vom HOMO – Orbital des Quenchers zum niedrigsten SOMO –

Orbital des Farbstoffes. Der Farbstoff wird reduziert und der Quencher oxidiert. Es kommt zu einer Löschung der Fluoreszenz. Damit das Elektron vom Quencher auf den Farbstoff übertragen werden kann, müssen die Orbitale miteinander überlappen. Dadurch ergibt sich eine sehr starke Abstandsabhängigkeit.

Erste Untersuchungen über Kinetiken des Öffnens und Schließens von Hairpins wurden von Wallace *et al.* [Wallace 2001] mithilfe der FCS - Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie - durchgeführt. FCS ist eine Methode zur Ermittlung schneller Änderungen der Fluoreszenzintensität. Dabei wird die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t_1 , $I(t_1)$, mit der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t_2 , $I(t_2)$, multipliziert. Durch Summation aller gleichen Zeitdifferenzen $t_1 - t_2$ lassen sich Aussagen über die Kinetik der Änderung der Fluoreszenzintensität machen. FCS Lösungsmessungen zeigten eine sehr schnelle Öffnungs- und Schließungskinetik im Mikrosekundenbereich. Ein Nachteil von FCS ist die geringe Beobachtungszeit von wenigen Millisekunden. Fluktuationen im Sekundenbereich werden nicht erfasst.

Um langsamere Änderungen messen zu können, müssen die Proben auf geeigneten Oberflächen immobilisiert werden. Dabei muss jede Art von Wechselwirkung des Hairpins mit der Oberfläche minimiert werden. Es hat sich gezeigt, dass BSA (bovine serum albumin) Oberflächen besonders zur Minimierung von Wechselwirkungen mit DNA geeignet sind. Durch Biotinylierung einzelner BSA-Moleküle hat man die Möglichkeit über Streptavidin weitere biotinylierte DNA – Proben zu immobilisieren [Ha 1999].

Die Einzelmolekülspektroskopie bietet die Möglichkeit, Informationen über Individuen, Verteilungen und zeitliche Veränderungen von Eigenschaften zu erhalten, die anderenfalls verborgen bleiben. 1976 gelang es T. Hirschfeld als Erstem einzelne Antikörper zu detektieren, die mit 80 –100 Fluoresceinfarbstoffen markiert waren [Hirschfeld 1976]. R. Keller entwickelte anschließend die grundlegenden Methoden zur Detektion einzelner fluoreszierender Moleküle. Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung gelang ihm schließlich 1990 die Detektion einzelner Rhodaminfarbstoffe in wässriger Lösung [Dovichi 1983]. Es zeigte sich schnell, dass die Möglichkeit, ein einzelnes fluoreszierendes Molekül zu detektieren, weniger von der empfindlichen Detektion als von der effizienten Unterdrückung des Hintergrundsignals abhängt. Durch den Einsatz geeigneter Bandfilter wird die elastische Rayleigh-Streuung effizient unterdrückt. Die inelastische Raman-Streuung wird durch ein geringes Detektionsvolumen von wenigen Femtolitern auf ein

Minimum reduziert, gleichzeitig wird die Anzahl von autofluoreszenten Molekülen im Detektionsvolumen minimiert.

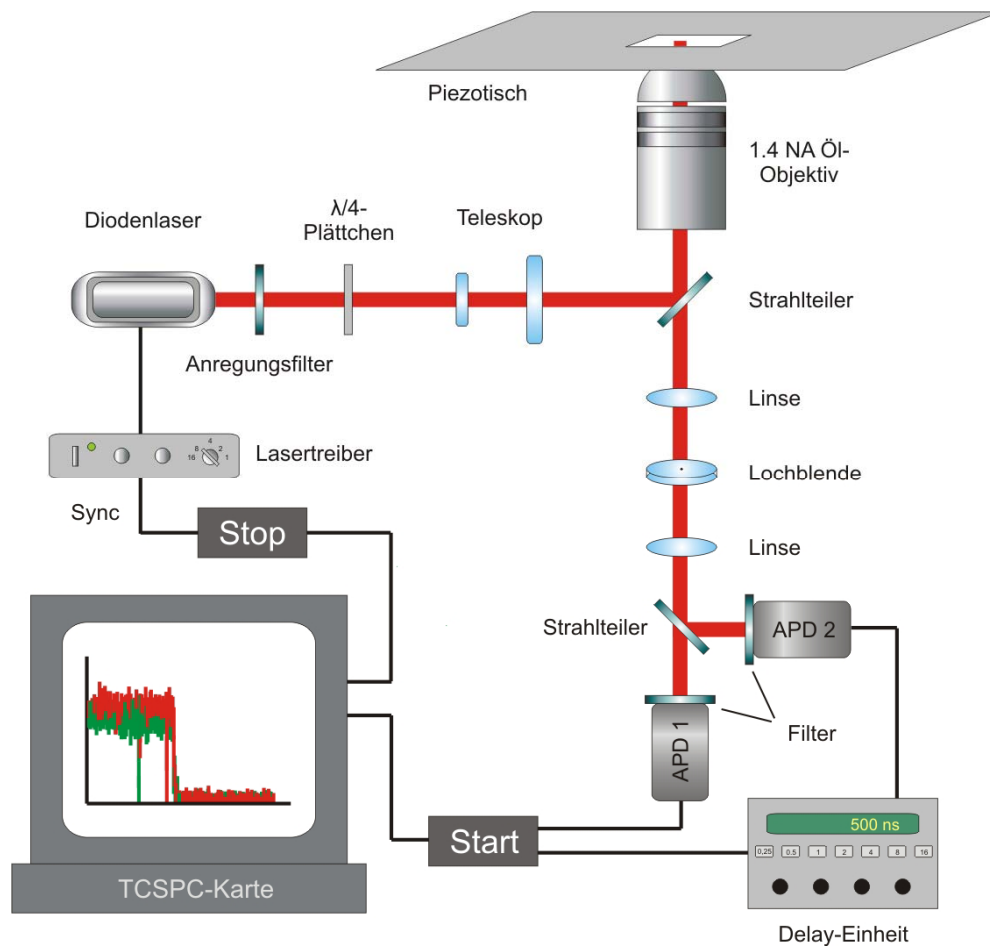


Abbildung 2: Anlage zur Messung einzelnen Molekülen auf Oberflächen.

Zur Steigerung des Signal-zu-Rausch (S/R) Verhältnisses etablierten Rigler und Mitarbeiter Anfang der 90iger Jahre die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion einzelner, frei diffundierender Moleküle in Lösung. Bei diesem Verfahren wird ein Laserstrahl beugungsbegrenzt über ein Mikroskopobjektiv mit hoher numerischer Apertur in die Probe fokussiert (Abb. 2). Typischerweise werden hierbei Anregungsleistungen im Bereich von $< 1 \text{ kW/cm}^2$ (bei immobilisierten Molekülen) bis zu einigen 100 kW/cm^2 (bei frei diffundierenden Molekülen) verwendet. Das Fluoreszenzlicht der Probe wird mit dem gleichen Objektiv gesammelt, räumlich mit

Hilfe einer Lochblende und spektral durch einen Bandpassfilter gefiltert und auf einen hochempfindlichen Halbleiterdetektor abgebildet. Das resultierende Beobachtungsvolumen liegt im Bereich von einem Femtoliter (10^{-15} L) [Rigler 1990]. Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten der Einzelmolekülspektroskopie zu nutzen, um die Kinetik von Hairpins zu verstehen. Gleichzeitig sollte der Photoinduzierte Elektronentransfer (PET) als neue Methode zur Bestimmung von Abstandsänderungen evaluiert und durch Vergleiche mit FRET als neue Methode etabliert werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Spektroskopie

In der optischen Spektroskopie wird die Lichtaussendung elektronisch angeregter Atome und Moleküle allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Unter den vielfältigen Anregungsmöglichkeiten führt die Anregung mittels Lichtbestrahlung zu der sogenannten Photolumineszenz. Form und Lage der zugehörigen Absorptions- und Emissionsspektren sind spezifisch für die untersuchten Atome und Moleküle und geben Auskunft über deren Schwingungs- und Rotationszustände. Im Folgenden sind die wichtigsten Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie zusammengefasst [Lakowicz 1999].

2.1.1 Absorption

Absorption ist ein Ausdruck der Wechselwirkung zwischen dem π -System des Farbstoffes und der elektromagnetischen Welle. Der Wechselwirkung liegt das Resonanzverhalten der Oszillatoren in der Materie zugrunde. Quantenmechanisch kann ein Elektron bei der Absorption von Licht der Wellenlänge λ unter Aufnahme der Energie ΔE aus dem elektronischen Singulettzustand S_0 auf einen energetisch höher gelegenen elektronischen Singulettzustand S_n , meist S_1 , übergehen. Die Energie des Photons muss die Bohr'sche Resonanzbedingung erfüllen:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

[Gleichung 2.1.1.1]

wobei ν ist die Frequenz der Welle, h das Planck'sche Wirkungsquantum ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js) ist. Für den sichtbaren Wellenlängenbereich von etwa 400 - 800 nm entspricht das einer Energie von 1,5 bis 3 eV. Damit es zu einer Absorption kommt, muss das Dipolmoment des Farbstoffes parallel zum Vektor des elektrischen Feldes ausgerichtet sein. Im Gegensatz zu Atomspektren sind bei Molekülen neben elektronischen Übergängen zusätzlich Rotations- und Schwingungsübergänge zu beobachten. Das führt dazu, dass man eine starke Verbreiterung der Spektrallinien erhält. Ein Maß für die Stärke der Lichtabsorption durch ein Farbstoffmolekül ist der Extinktionskoeffizient ε . Das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz gibt den Zusammenhang zwischen Extinktionskoeffizient (ε), Absorption (Optische Dichte (OD)), Schichtdicke (d) und Konzentration (c) wieder.

$$OD = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * d \quad \text{[Gleichung 2.1.1.2]}$$

Dieses Gesetz gilt für monochromatisches, kollimiertes Licht und verdünnte Lösungen. Die Schichtdicke wird, im Gegensatz zur SI Einheit m, in cm angegeben. Der Extinktionskoeffizient ε ist proportional zur Übergangswahrscheinlichkeit P . Sie gibt an, welcher Anteil aller absorbierten Lichtquanten zur elektronischen Anregung führt und ist proportional zum Quadrat des Übergangsmomentes. Bei $P = 1$ bewirkt jedes absorbierte Quant einen Übergang. ε ist auch proportional zum Einfangquerschnitt a , der die Flächenausdehnung des chromophoren Systems angibt:

$$a P \propto \varepsilon \quad \text{[Gleichung 2.1.1.3]}$$

Der maximale Extinktionskoeffizient eines Farbstoffes kann über $\varepsilon_{\max} = 9 \cdot 10^{19} \cdot P \cdot a$ abgeschätzt werden. Mit $P = 1$ und $a = 10 \text{ nm}^2$ (typischer Wert für Rhodamine) ergibt sich ε zu $100000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Für die meisten Rhodamine liegt der Wert für ε_{\max} tatsächlich um 100000. Einige Cyaninfarbstoffe mit hohem Einfangquerschnitt erreichen sogar Werte bis $250000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.1.2 Emission

Moleküle in elektronisch angeregten Zuständen können unter Emission von Photonen, d.h. Fluoreszenz in den energetisch günstigsten Zustand, den Grundzustand S_0 , übergehen. Innerhalb von 10^{-15} s wird ein Molekül in ein höheres Schwingungsniveau der elektronisch angeregten Zustände angeregt. Weil die elektronische Anregung schneller erfolgt als eine Schwingung dauert (10^{-12} s), bleiben die Kernabstände bei der Anregung gleich (Franck Condon-Prinzip). Meist geschieht die Anregung in den ersten elektronisch angeregten Singulettzustand S_1 . Selten finden auch Anregungen in höhere elektronische Singulettzustände (S_2, S_3, \dots) statt, die jedoch in Lösungen innerhalb von 10^{-12} s strahlungslos unter Abgabe von Schwingungsenergie an Lösungsmittelmoleküle in die Boltzmann-Verteilung der Schwingungszustände des S_1 -Zustandes übergehen. Von hier aus gibt es verschiedene Möglichkeiten für das Molekül, wieder in den Grundzustand S_0 überzugehen. Das Jablonski-Diagramm verdeutlicht diese Übergänge.

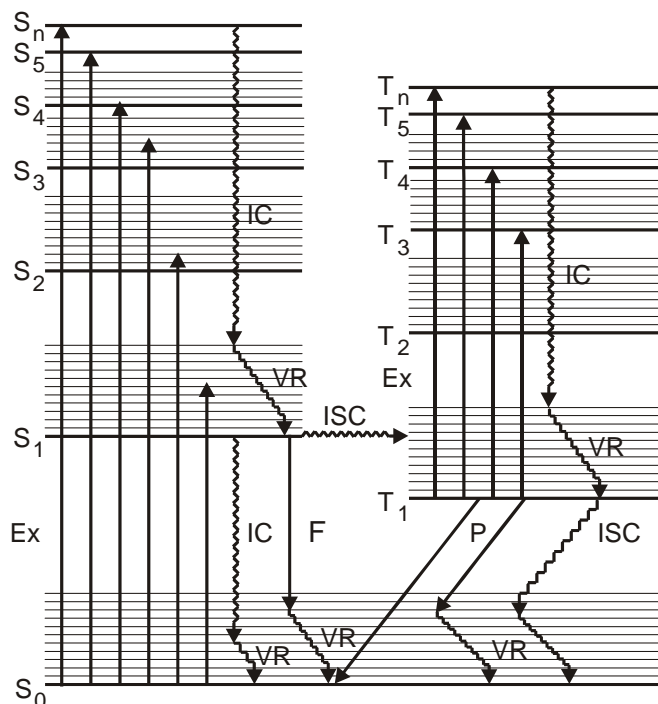


Abbildung 2.1.2.1: Jablonski-Diagramm

Die strahlungslose Desaktivierung (Internal Conversion) des S_1 -Zustandes verläuft analog zur obigen $S_n \rightarrow S_1$ -Relaxation als isoenergetischer Übergang in Rotations-Schwingungsniveaus von S_0 . Die Schwingungsenergie wird wiederum über Wechselwirkung mit der Umgebung in Form von Wärme abgegeben.

Die für diese Arbeit wichtigste Relaxationsart ist die Fluoreszenz. Der S_1 -Singulettzustand geht innerhalb von Nanosekunden, entsprechend dem Übergangsmoment, in ein Rotations-Schwingungs-Niveau des Grundzustandes S_0 über und sendet die überschüssige Energie als Photon ($h\nu$) aus. Als weiterer Reaktionsweg ist das Intersystem Crossing (ISC) in einen Triplettzustand möglich. Wegen der wegfallenden Paarungsenergie (Pauli-Prinzip) liegt der Triplettzustand meist energetisch knapp unterhalb des entsprechenden Singulettzustandes. Der Übergang ist damit energetisch günstig, allerdings ändert sich die Spinmultiplizität, wodurch der Übergang formal „verboten“ ist. Ist das Molekül erst einmal im Triplettzustand (T_1), verweilt es dort oft sehr lange ($\geq 10^{-6}$ s), weil alle weiteren Reaktionen in den Singulettgrundzustand S_0 führen und die Übergänge wiederum „spinverboten“ sind. Außerdem ist die Energiedifferenz für $T_1 \rightarrow S_0$ wesentlich größer als für $S_1 \rightarrow T_1$, was die Lebenszeit im Triplettzustand weiter verlängert. Es konkurriert die strahlungslose Relaxation (IC), die wiederum Wärme erzeugt, mit der Phosphoreszenz, bei der ein Photon emittiert wird. Das Emissionsspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum rotverschoben, da die angeregten Singulettzustände S_n ($n=1, 2, \dots$) durch strahlungslose Prozesse schnell in die Rotations-Schwingungsenergie-Verteilung des S_1 -Zustandes relaxieren, von welchem dann die Fluoreszenz in höhere Rotations-Schwingungs-Zustände des S_0 erfolgen kann (Kasha-Regel). Daher haben die emittierten Photonen eine geringere Energie als die Absorbierten und sind rotverschoben. Dieses Phänomen wird im Allgemeinen als Stokes-Verschiebung bezeichnet [Park 2003].

2.1.3 Quantenausbeute

Die Quantenausbeute Q beschreibt das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen. Wird ein Farbstoff angeregt, so muss dieser nicht unbedingt nur durch Fluoreszenz abgeregt werden. Durch Internal Conversion können ebenfalls angeregte Moleküle wieder in den Grundzustand gelangen. Die Quantenausbeute beschreibt dieses Verhältnis.

Die einfachste Art und Weise die Quantenausbeute eines Farbstoffes zu bestimmen, ist der Vergleich mit einem Farbstoff bekannter Quantenausbeute. Dazu wird ein Fluoreszenzspektrum sowohl vom zu bestimmenden Farbstoff gemessen, als auch von einem Farbstoff, dessen Quantenausbeute bekannt ist. Danach wird die Fluoreszenzintensität über alle Wellenlängen summiert und konzentrationsgewichtet ins Verhältnis gesetzt.

$$Q = Q_s * \frac{I}{I_s} * \frac{OD_s}{OD} \quad [\text{Formel 2.1.3.1}]$$

Durch Multiplikation mit der Quantenausbeute des Standards (Q_s) erhält man die Quantenausbeute.

Farbstoff	Lösungsmittel	Anregungswel- -lenlänge[nm]	Temperatur [°C]	Quantenausbeute
Quinine Sulfat	0,1M Schwefelsäure	350	22	0,577
		366	22	0,53
β -Carotin	1N Schwefelsäure	350	25	0,6
Fluorescein	0,1M Natronlauge	496	22	0,95
2-Aminopyridin	0,1N Schwefelsäure	285		0,6
Tryptophan	Wasser	280		0,13
Phenol	Wasser	275	23	0,14
Rhodamin 6G	Ethanol	488		0,94
Rodamin 101	Ethanol	450	25	1

Abbildung 2.1.3.2: Quantenausbeuten verschiedener Standards [Lakowicz 1999]

Die Quantenausbeute ist wellenlängenunabhängig. Viel stärker ändert sich die Quantenausbeute mit der Temperatur. Durch Temperaturerhöhung bewegen sich die Teilchen schneller, die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einem Stoß zwischen Farbstoff und Lösungsmittel kommt erhöht sich und damit steigt auch die Stoßdesaktivierung.

2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer ist definiert als die durchschnittliche Zeit, die das Molekül in angeregtem Zustand verbringt.

$$I(t) = I_0 * e^{-t/\tau} \quad [\text{Formel 2.1.4.1}]$$

I_0 ist die Anfangsintensität und τ die Fluoreszenzlebensdauer, die charakteristisch für jeden Farbstoff ist. T beschreibt die Zeit nach dem Laserpuls.

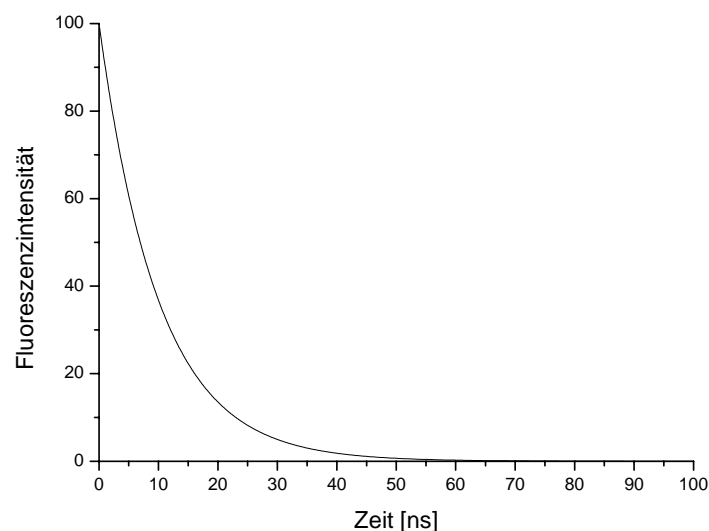


Abbildung 2.1.4.2: Verteilung der Photonen bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 10ns

In Abb. 2.1.4.2 ist ein typischer Verlauf der Funktion gezeigt. In diesem Beispiel wurden 10 ns als Fluoreszenzlebensdauer angenommen.

2.1.5 Fluoreszenzlöschung

Eine Vielzahl von Substanzen löschen die Fluoreszenz. Einer der am besten untersuchten Quencher ist Sauerstoff. Durch Stöße im angeregten Zustand kommt es zum Intersystem Crossing und der Farbstoff geht in den Tripletzustand über.

Eine andere Gruppe von Quenchern sind Amine, die Komplexe mit dem Farbstoff ausbilden. Wird dieser angeregt so kommt es zu einem Elektronen Transfer von dem HOMO (highest occupied molecular orbital) des Amins in das niedrigste SOMO-Orbital (single occupied molecular orbital) des Farbstoffes.

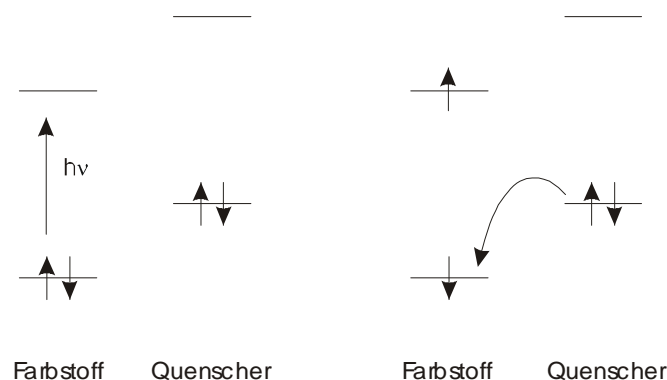


Abbildung 2.1.5.1: Funktionsweise des Quenchens durch Elektronentransfer mit Aminen (Donoren)

Für den Elektronentransfer müssen die Orbitale des Farbstoffes mit den Orbitalen des Quenchers überlappen. Daraus resultiert eine starke Abstandsabhängigkeit. Sind beide Moleküle weiter als 2 Å entfernt, kommt es nahezu keiner Wechselwirkung mehr. Eine Ausnahme bilden die sogenannten „through – bond“ Wechselwirkungen. Die Konzentrationsabhängigkeit des Quenchvorganges wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q] \quad [\text{Formel 2.1.5.2}]$$

F_0 ist die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes in Abwesenheit des Quenchers, F die Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers, $[Q]$ die Konzentration von Quencher und K_D die Komplexbildungskonstante von Quencher und Farbstoff [Lakowicz 1999].

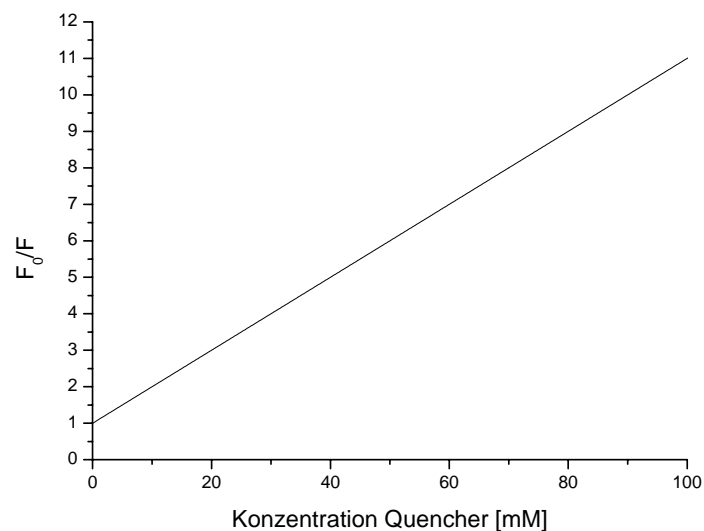


Abbildung 2.1.5.3: Verlauf des Quenchprozesses.

Trägt man das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des Quenchers auf, so erhält man eine Gerade, deren Steigung die Komplexbildungskonstante widerspiegelt [Abb. 2.1.5.3]. In diesem Fall ist $K_D = 100$ mol/l.

Farbstoffe werden auch durch Stoßdeaktivierung gelöscht, dynamische Löschung. Dabei wird der Farbstoff im angeregten Zustand durch einen Stoßprozess in den Grundzustand abgeregt. Im Gegensatz zum statischen Quenching ändert sich hierbei die Fluoreszenzlebensdauer. Trägt man in einem Stern-Volmer-Plot das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauer ohne Quenching zur Fluoreszenzlebensdauer mit Quencher gegen die Konzentration des Löschmoleküls auf, so erhält man eine Gerade. (Formel 2.1.5.4)

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad [\text{Formel: 2.1.5.4}]$$

Wobei $k_q [Q]$ die Geschwindigkeit des Quenchprozesses bei der Quencherkonzentration $[Q]$ ist.

Generell kommen immer beide Mechanismen des Quenchings zum Tragen. Jedoch verhalten sich die beiden Mechanismen bei Temperaturerhöhung unterschiedlich: das Stoßquenching wird stärker und damit die Steigung größer, während bei Komplexbildung das Quenching geringer wird.

2.1.5.1 Photoinduzierter Elektronen Transfer (PET)

Die Absorption eines Photons ändert die elektronischen Eigenschaften eines Farbstoffes grundlegend. Ein Elektron wird aus dem HOMO (highest occupied molecular orbital) durch ein Photon der entsprechenden Energie in das LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) angehoben. Dadurch ist der Farbstoff um den Energiebeitrag des Photons $E_{0,0}$ sowohl leichter oxidierbar als auch reduzierbar.

Bildet der Farbstoff einen Komplex mit einem elektronenreichen Quencher und wird der Farbstoff angeregt, so kommt es zu einem Elektronentransfer von dem HOMO des Amins in das niedrigste SOMO des Farbstoffes.

Dabei gibt es zwei verschiedene Kinetiken. Eine ist die Fluoreszenz mit einer Geschwindigkeitskonstante die der der Fluoreszenzlebensdauer entspricht.

$$k_{cs} = 2\pi/h V_{DA}^2 1/(4\pi\lambda k_B T)^{1/2} \exp[-(\Delta G_{cs} + \lambda_s)^2 / 4\lambda_s k_B T] \quad [\text{Formel 2.1.5.1.1}]$$

Die zweite Kinetik beschreibt die Geschwindigkeit des Elektronentransfers k_{cs} . Diese ist abhängig von der Wechselwirkungsmatrix V_{DA} , einer Art Überlappungsintegral der beiden Orbitale. ΔG_{cs} beschreibt den Energiegewinn durch den Elektronentransfer, λ_s die Solvatationsenergie des Biradikals [Rehm 1969].

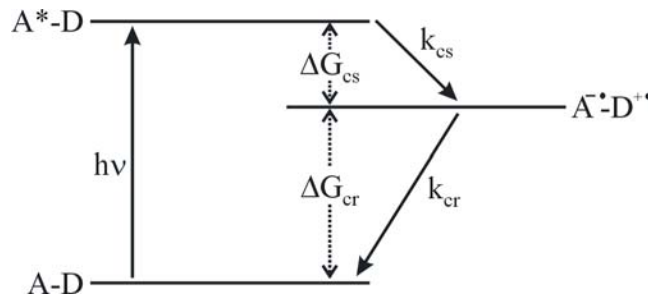


Abbildung 2.1.5.1.2: Reaktionsmechanismus des Quenchprozesses

Bestimmt wird diese Größe, indem man das Redoxpotential beider beteiligten Stoffe bestimmt und die Wellenlänge des Emissionsmaximums.

	E_{red} vs SCE in CH ₃ CN [V]	$E_{0,0}$ [eV]	ΔG_{cs} [eV] mit Guanosin
R6G	-0.95	2.27	-0.07
Cy5	-0.88	1.88	+0.25
MR121	-0.48	1.85	-0.12

Abbildung 2.1.5.1.3: Einige Farbstoffe mit ihren Redoxpotentialen

Werden die Löschungsexperimente im gleichen Lösungsmittel wie die Redoxpotentialmessungen durchgeführt, kann die Solvationsenergie des radikalischen Ionenpaares vernachlässigt werden und die freie Energie der Ladungstrennung ΔG_{cs}^0 setzt sich zusammen aus $E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}$, der Redoxenergie $E_{0,0}$, der Energie des Photons und der Coulombenergie der Ladungstrennung ΔG_{coul}^0 .

2.1.6 FRET

Ein weiterer Prozess der im angeregten Zustand stattfindet ist der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer FRET. Dieser Prozess findet immer dann statt, wenn das Emissionsspektrum eines Farbstoffes (Donor) mit dem Absorptionsspektrum eines zweiten Farbstoffes (Akzeptor) überlappt.

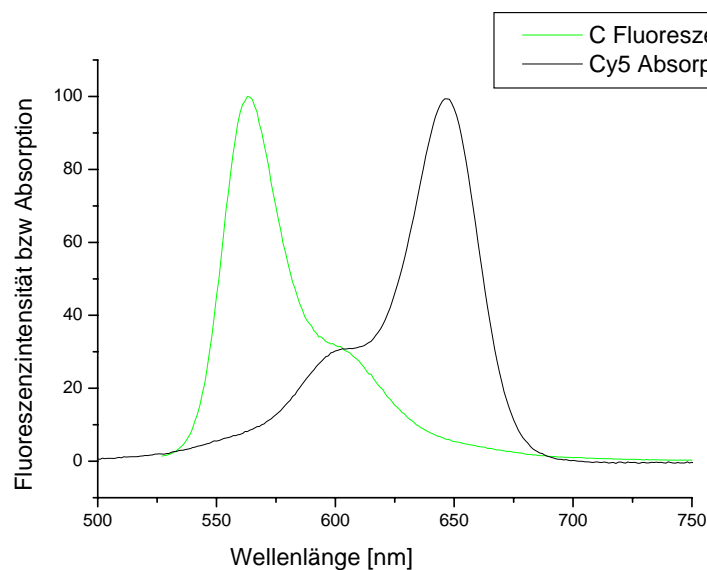


Abbildung 2.1.6.1: Überlappung der Fluoreszenz des Donors (Cy3) mit der Absorption des Akzeptors (Cy5)

FRET ist eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die Störungen der elektronischen Struktur des Donors und Akzeptors hervorruft. Diese Störungen werden über das elektrische Feld des Donors und Akzeptors vermittelt. Dadurch ergibt sich eine Abstandsabhängigkeit:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad [\text{Formel 2.1.6.2}]$$

Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers, die mit der Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz konkurriert, ist abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer des Donors, dem Försterradius R_0 und dem Abstand r

zwischen Donor und Akzeptor. Der Försterradius R_0 ist der Abstand, bei dem die Energietransfereffizienz 50% beträgt. Er spiegelt die spektrale Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, die Orientierung der beiden Dipolmomente zueinander, die Quantenausbeute des Donors und den Brechungsindex des Mediums wider.

$$R_0 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D}{128\pi^5 n^4 N} \int_0^\infty \frac{F_D(\nu)\varepsilon_A(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad [\text{Formel 2.1.6.3}]$$

Φ_D ist die Quantenausbeute des Donors, n der Reflexionsindex des Medium, N die Avogadrozahl, $F_D(\nu)$ ist das Fluoreszenzspektrum des Donors, $\varepsilon_A(\nu)$ ist das Absorptionsspektrum des Akzeptors und κ^2 ist der Orientierungsfaktor der Dipolmoment des Donors und Akzeptors zueinander.

Normalerweise liegt der Försterradius zwischen 30 und 60 Å.

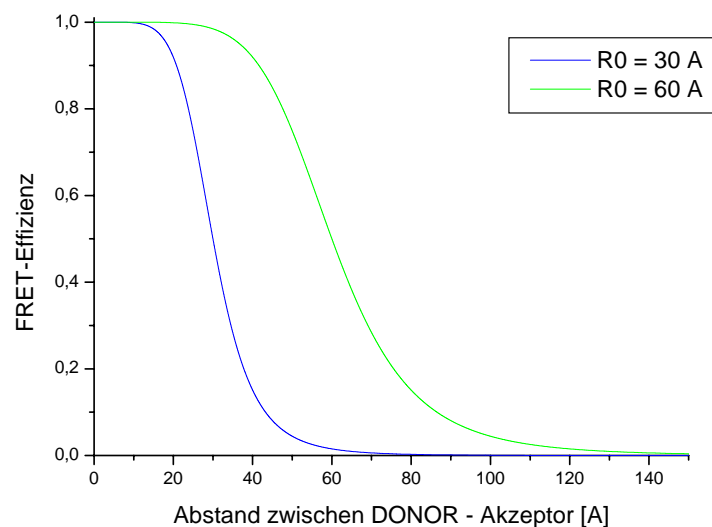


Abbildung 2.1.6.4: Änderung der FRET-Effizienz mit wachsendem Abstand

Abbildung 2.1.6.4 verdeutlicht, dass mit Hilfe von FRET Abstände zwischen 20 und 100 Å zu messen sind.

Die FRET-Effizienz lässt sich mit der folgenden Formel beschreiben.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad [\text{Formel 2.1.6.3}]$$

E ist die FRET - Effizienz, R_0 der Försterabstand und r der Abstand von Donor zu Akzeptor.

2.1.7 Einzelmolekülspektroskopie

Der Vorteil der Einzelmolekülspektroskopie gegenüber der Fluoreszenzspektroskopie im Ensemble ist die Beobachtung von individuellen Eigenschaften einzelner Moleküle. Viele Gleichgewichtsschwankungen werden im Ensemble herausgemittelt, eine Synchronisation ist nur schwer zu erreichen. Die Einzelmolekülspektroskopie bietet jetzt die Möglichkeit, zeitliche Fluktuationen zu untersuchen. Molekulare Prozesse wie Konformationsänderungen und Reaktionen können die Fluoreszenzintensität, Polarisation, Fluoreszenzwellenlänge und die Fluoreszenzlebensdauer verändern.

Die Einzelmoleküldetektion in Lösung und bei Raumtemperatur ist kompliziert. Die am weitesten verbreitete Technik zur Detektion einzelner Moleküle in Lösung ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie [Nie 1994]. Hierbei wird der Laserstrahl über ein Objektiv in das Innere einer Messlösung fokussiert und das Fluoreszenzsignal über dasselbe Objektiv eingesammelt. Rayleighstreuung wird räumlich durch eine Lochblende und Ramanstreuung spektral durch Filter vom Fluoreszenzlicht getrennt. Das Objektiv fokussiert das Licht auf einen Punkt, sodass das Beobachtungsvolumen auf 1 Femtoliter reduziert wird. Dadurch wird die Streuung des Lichts weiter minimiert und die Anzahl autofluoreszenter Moleküle ist gering.

Das Objektiv ist im Prinzip eine Linse, die das Licht fokussiert. Die Abbésche Auflösungsformel gibt die Grenzen dieses Prozesses wieder:

$$\Delta X \approx \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} \quad [\text{Formel 2.1.7.1}]$$

λ ist die Wellenlänge des verwendeten Lichts und $n \cdot \sin \alpha$ ist die numerische Appertur des Objektivs, wobei α der Öffnungswinkel des Objektivs ist. Der größte technisch mögliche Apperturwinkel ist 70° . Daraus ergibt sich eine Auflösung von 200 nm lateral und 500 nm axial. Dies entspricht einem Volumen von 1/50 fl.

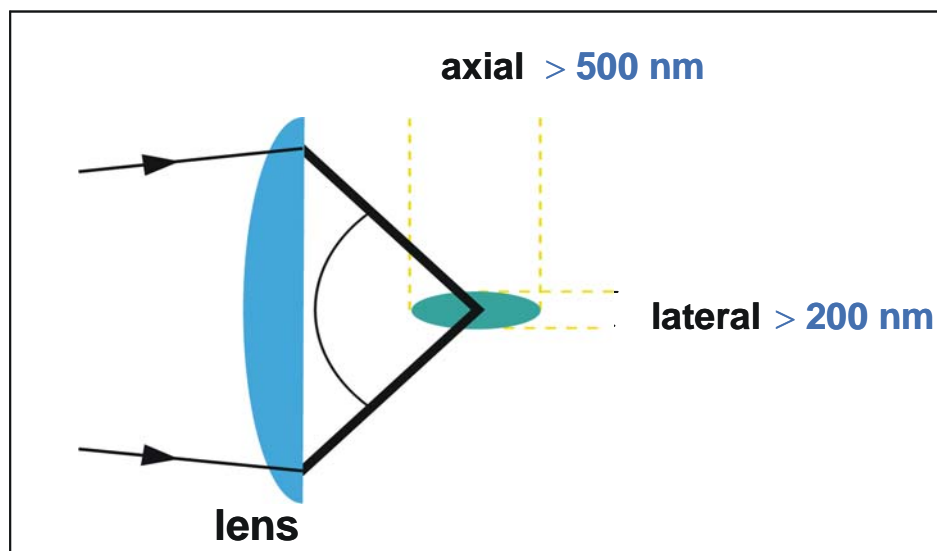


Abbildung 2.1.7.2: Anregungsvolumen der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie

Das Objektiv ist nicht nur wichtig für die punktgenaue Anregung, sondern auch für die Detektion der Fluoreszenz. Dafür ist ein möglichst großer Öffnungswinkel notwendig, da die Fluoreszenz in alle Raumrichtungen abgegeben wird [Hell 2005].

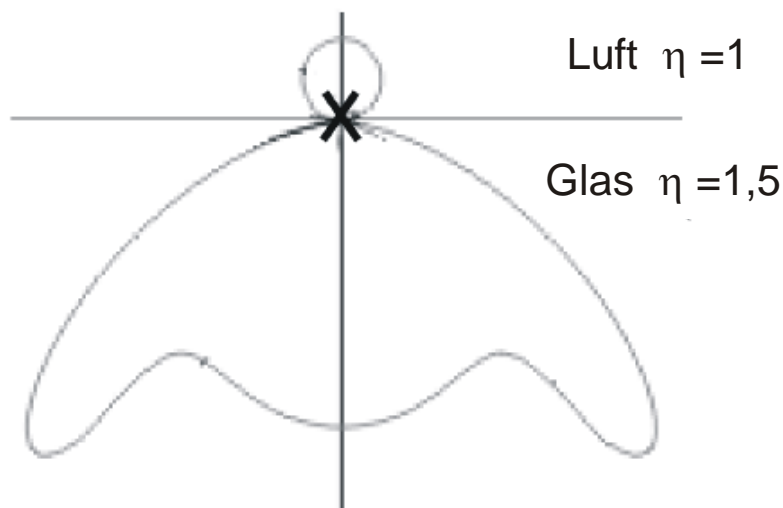
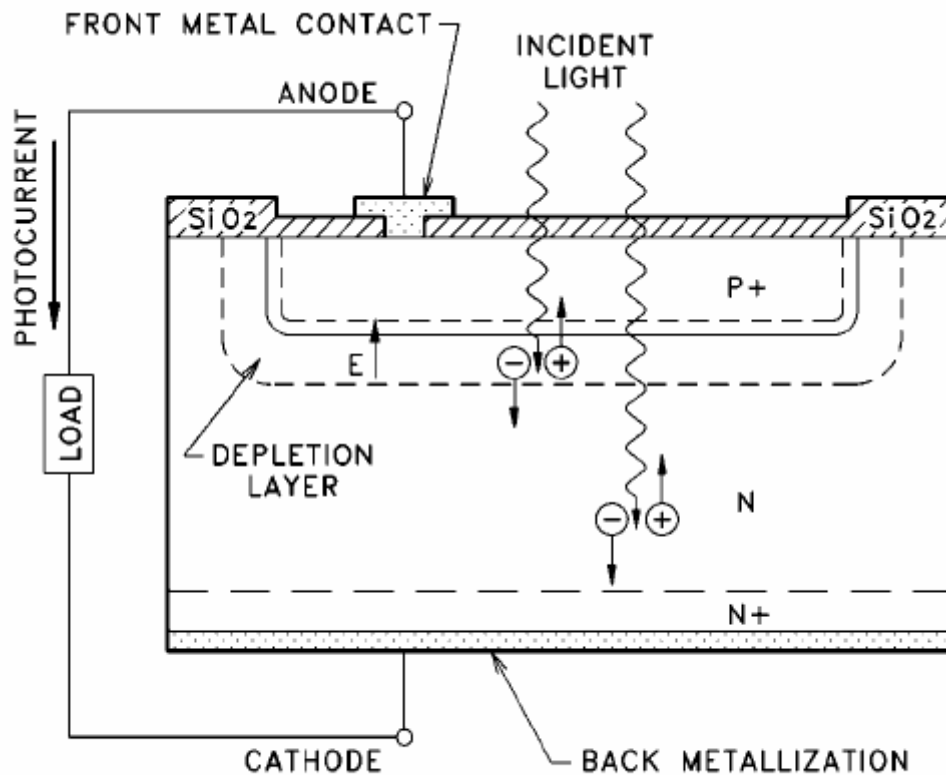


Abbildung 2.1.7.3: Verteilung der Fluoreszenzphotonen eines Farbstoffes an der Glas - Luft - Grenze

Dabei ist die Emissionswahrscheinlichkeit anisotrop, aber trotzdem wird der Hauptteil der Fluoreszenz in einem weiten Winkel in Richtung Glas abgegeben. Durch Überschichtung mit Wasser wird dieser Effekt geringer und man detektiert dadurch auch weniger Photonen [Axelrod 1989].

Bei der Diffusion eines Farbstoffes durch den Fokus kann dieser bis zu 1000 Photonen emittieren. 70% dieser Photonen können nicht detektiert werden, weil diese nicht das Objektiv erreichen. Der Strahlteiler und der Filter haben eine Transmission von 80%. Dadurch reduziert sich die Anzahl von Photonen die auf den Detektor fallen auf $1/5$. Deshalb ist es wichtig, Detektoren zu verwenden die jedes Photon einzeln detektieren und eine möglichst große Anzahl von Parametern wie die exakte Zeit, Wellenlänge und Polarisation liefern.

Als Detektor wird deshalb eine Halbleiterphotodiode verwendet [Abb. 2.1.7.4]. Sie besteht aus einer p-Schicht, die mit dem Plus-Pol und einer n-Schicht die mit dem Minus-Pol verbunden ist. Die Diode ist in Sperrrichtung geschaltet. Im Übergangsbereich zwischen P- und N-Schicht herrscht ein starkes Feld. Dadurch kann das Licht Elektronen-Loch-Paare erzeugen und wird absorbiert. Durch die angelegte Spannung wird das Elektron beschleunigt. Dieses stößt weitere Elektronen heraus und es entsteht eine Elektronenlawine, die als elektrischer Strom detektiert wird.



Cross Section of a Planar Diffused Photodiode

Abbildung 2.1.7.4: Aufbau eines Fluoreszenzdetektors

Eine solche Diode hat hervorragende Eigenschaften zur Detektion einzelner Photonen. Selbst Fluoreszenzlebensdauern können bestimmt werden.

Die Detektionseffizienz ist bei 700 nm mit 70 % am größten, 300 nm vom Maximum entfernt fällt sie fast auf 0% ab [Perkin Elmer].

Als Lichtquelle werden Laser oder Laserdioden verwendet. Das optisch aktive Medium besteht aus der undotierten Schicht eines Halbleitermaterials, das zwischen Schichten aus p- und n-dotiert Halbleitermaterialien eingebettet ist.

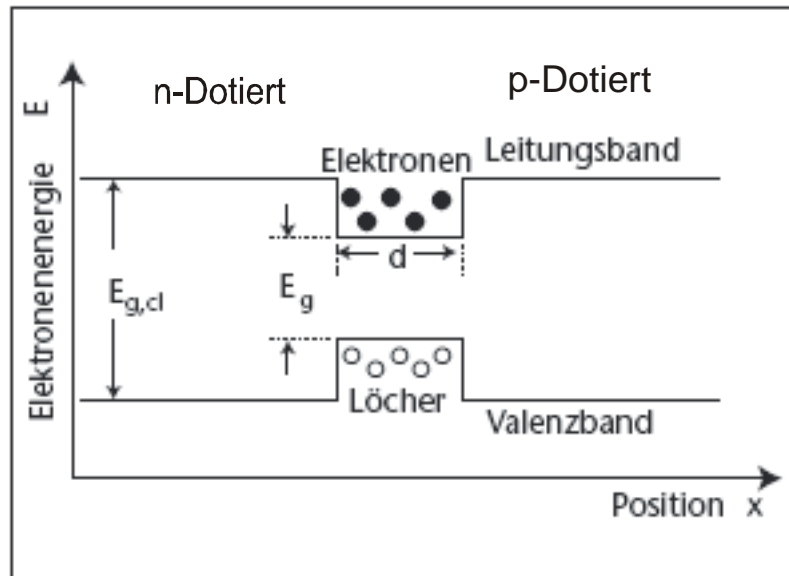


Abbildung 2.1.7.5: Aufbau einer Laserdiode (Pin-Diode)

Mit der Polung dieser pin-Diode in Vorwärtsrichtung werden Elektronen und Löcher in die aktive Schicht injiziert. Elektronen besetzen Energieniveaus im Leitungsband, Löcher (Defektelektronen) besetzen Energieniveaus im Valenzband. Durch die Rekombination dieser Elektronen und Löcher wird wie in einer LED Licht emittiert. Dadurch, dass sowohl die p- als auch n-dotierten Diodenbereiche einen geringeren Brechungsindex haben als der undotierte Teil, kommt es zu Reflexion im Grenzbereich. Ab einer halbleiterspezifischen Schwellwertstromstärke wird das Strahlungsfeld so stark, dass die Rekombination überwiegend durch stimulierte Emission geschieht, bevor spontane oder strahlungslose Prozesse wirksam werden [Demtröder 1993]. Schickt man Strompulse überhalb der Schwellwertstromstärke durch die Diode kommt es zu Laserpulsen die bis zu ps-Sekunden kurz sein können.

2.2 Nukleotide und Nukleinsäuren

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger der Erbinformation. Sie ist aus einem Zuckerphosphatrückgrat aufgebaut, an dem verschiedene Nukleotide angehängt sind. Die Nukleotide sind Derivate des Purins oder Pyrimidins. Die wichtigsten sind Thymin (T), Adenin (A), Cytosin (C) und Guanin (G).

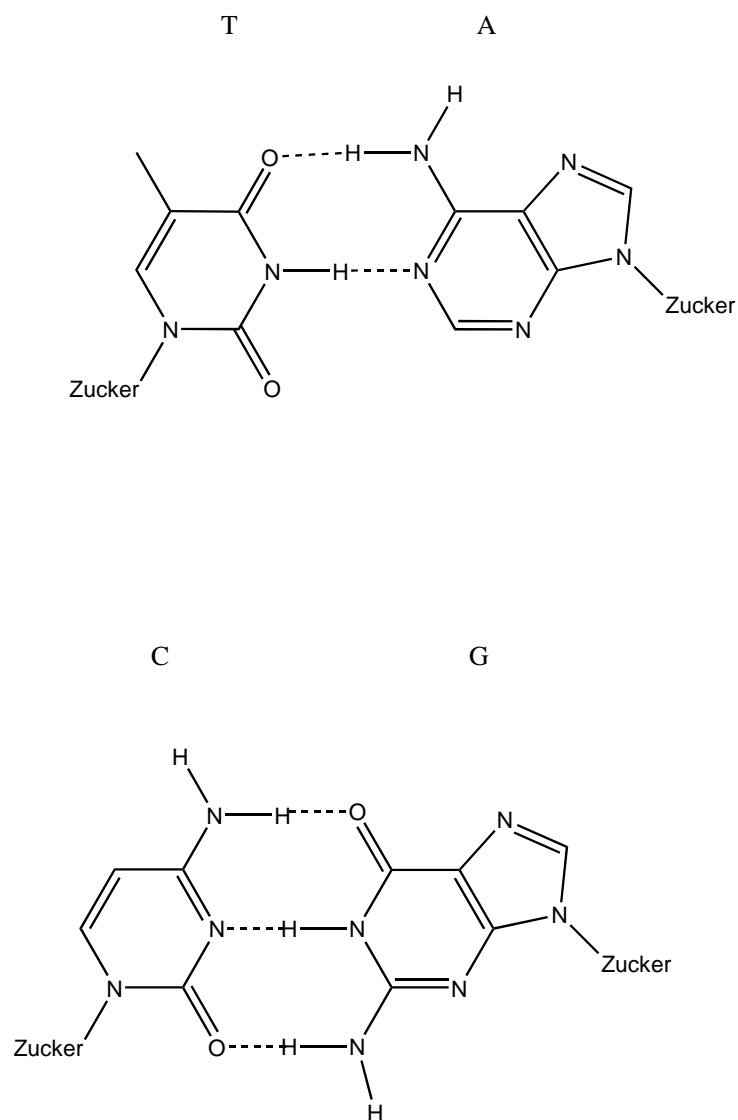


Abbildung 2.2.1: Basenpaarung der Nukleotide, Thymin (T) paart mit Adenin (A) und Cytosin (C) paart mit Guanin (G).

Die Purinbasen binden über das N9-Atom an das C1-Atom eines Zuckers, bei den Pyrimidinbasen erfolgt die Bindung über das N1-Atom. In Ribonukleotiden, die Bausteine der RNA, ist der Zucker die Pentose Ribose, in Desoxyribonucleotiden, den Bausteinen der DNA, die 2'-Desoxyribose. Die einzelnen Nukleotide werden an das 3' und 5' Ende über ein Phosphatmolekül gebunden und bilden so lange Polymere.

Die Bestimmung der DNA-Struktur durch James Watson und Francis Crick im Jahre 1953 wird oft als Grundstein der modernen Molekularbiologie bezeichnet. Die Watson-Crick-Struktur der DNA liefert nicht nur ein Modell für das zentrale Molekül des Lebens, es klärt zusätzlich den molekularen Mechanismus der Vererbung und der Synthese von Proteinen auf.

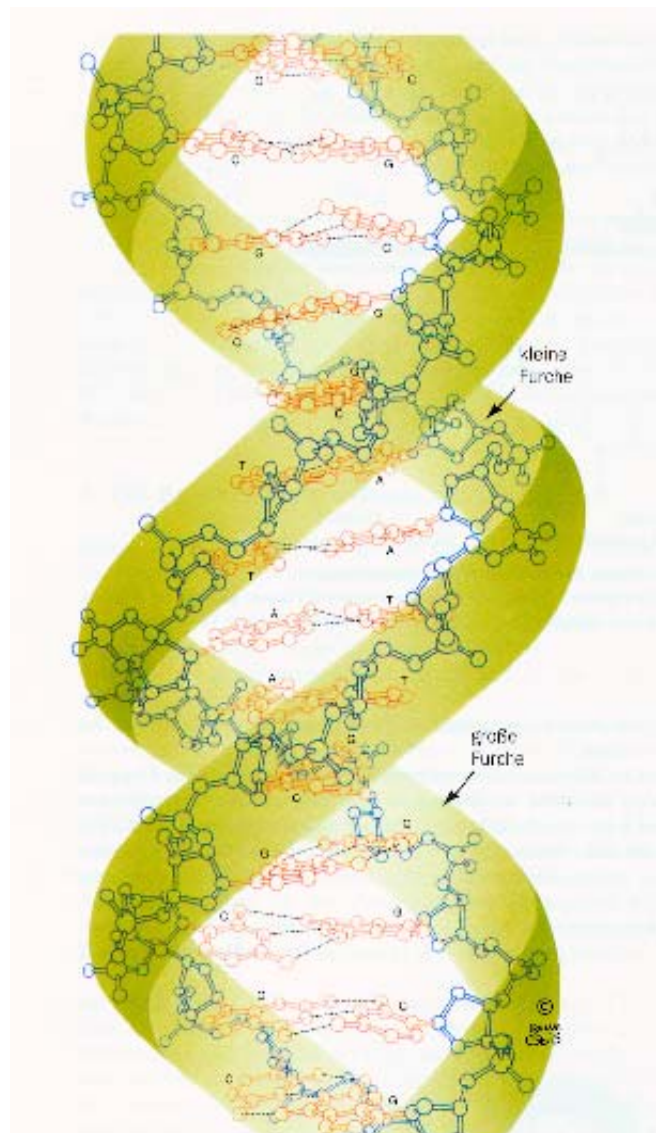


Abbildung 2.2.2: Aufbau der DNA nach Francis Crick und James Watson

Die DNA kommt nicht als Einzelstrang vor, sondern 2 Polynukleotidketten winden sich um eine gemeinsame Achse und bilden eine Doppelhelix. Dabei sind die Stränge antiparallel und jede bildet eine rechtsgängige Helix. Die Basen liegen im Inneren der Helix und das Zucker-Phosphat-Gerüst verläuft an der Peripherie. Somit wird die Abstoßung zwischen den geladenen Phosphatgruppen minimiert. Auf der Oberfläche der Doppelhelix bilden sich dadurch zwei Arten von Furchen mit unterschiedlicher Ausdehnung aus: die große und die kleine Furche. Jede Base in der Doppelhelix ist über Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Base im Gegenstrang verbunden. Dabei können nur Adenine mit Thyminen und Guanosine mit Cytosinen eine Basenpaarung eingehen. Dieses Phänomen nennt man komplementäre Basenpaarung.

Einzelsträngige DNA ist selten und kommt meist als Erbmaterial bei bestimmten Viren vor. Im Gegensatz dazu kommt die RNA meist als Einzelstrang vor. Auch hier paart Adenine mit Uracil, einem Thymin Derivat und Guanosine mit Cytosinen. Da kein Gegenstrang vorhanden ist, erfolgt bei entsprechender Sequenz eine intramolekular Basenpaarung. Es bilden sich Haarnadelstrukturen (Hairpins).

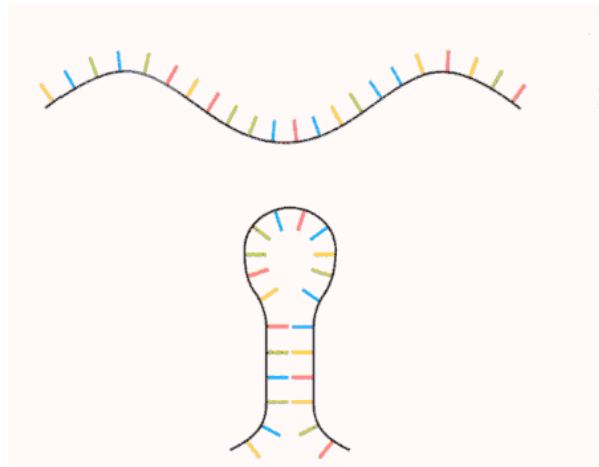


Abbildung 2.2.3: Aufbau eines DNA-Hairpins, oben der Einzelstrang, unten der Hairpin

Komplexere Strukturen entstehen, wenn die Schleifen miteinander in Wechselwirkung treten. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass dadurch spezifische Bindungsmöglichkeiten für kleine, organische Moleküle geschaffen werden und Reaktionen an diesen Zentren stattfinden [Voet 2002].

2.3 Glukoseoxidase

Glukoseoxidase katalysiert die Oxidation von Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid mit Hilfe von molekularem Sauerstoff.

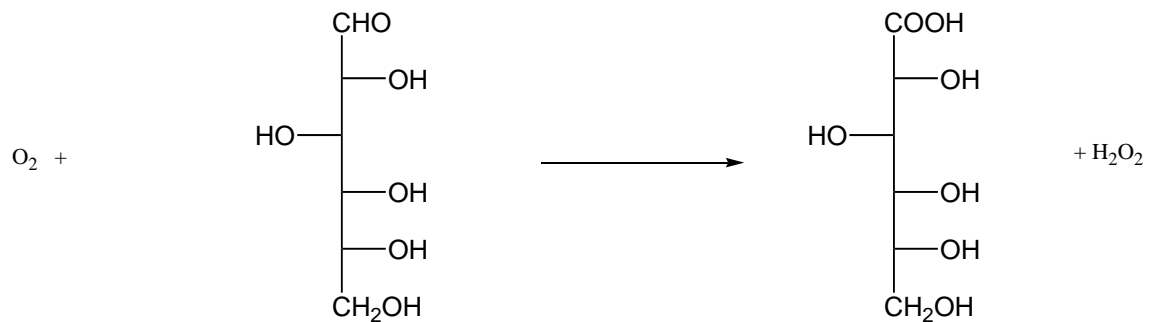


Abbildung 2.3.1: Reaktionsgleichung der Oxidation von Glukose

Sie wird aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* gewonnen. Dieser wird aufgrund seiner dunklen Sporen auch Schwarzsimmel genannt. Diese dunklen Sporen des *Aspergillus niger* sind sehr deutlich erkennbar. Er kommt weltweit im Erdboden vor. Glukoseoxidase ist ein Homodimer mit jeweils 80 kDa und drei Untereinheiten: Flavin-Adenosin-Dinukleotid, α -D-Mannose, N-Acetyl-D-Glucosamin.

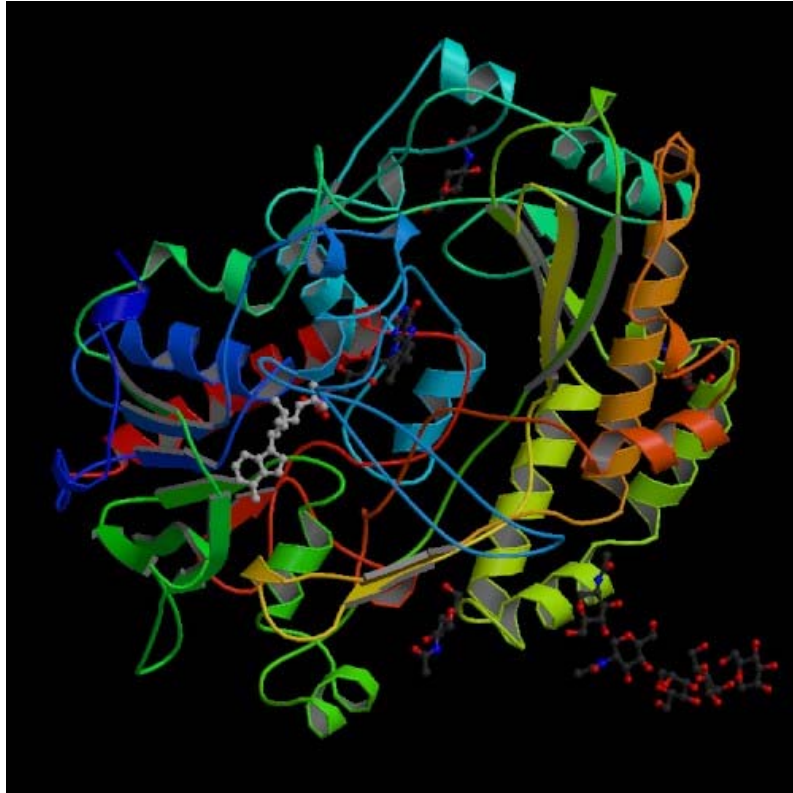


Abbildung 2.3.2: Röntgenstruktur der Glukoseoxidase mit ihren drei Untereinheiten [pdb.org]

Das Flavin-Adenosin Dinukleotid [Abb. 2.3.2] zeigt eine starke Fluoreszenz bei 530 nm.

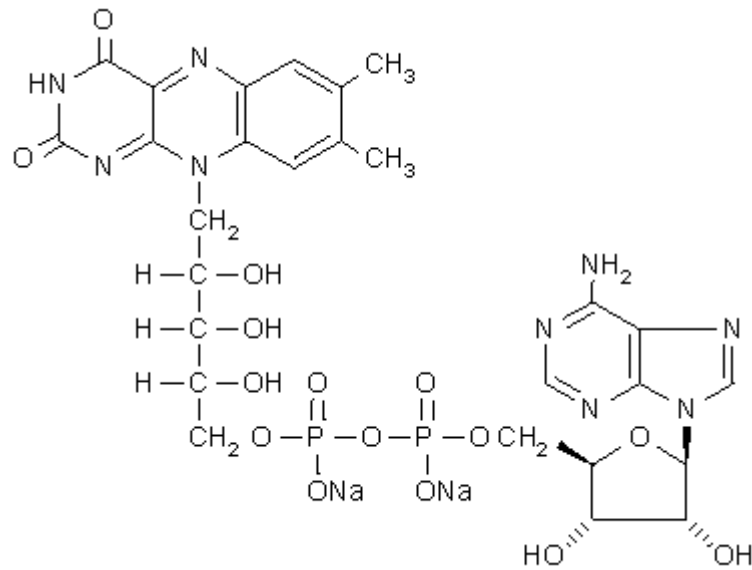


Abbildung 2.3.3: Struktur von Flavin-Adenosin Dinucleotid

Es liegt in zwei verschiedenen Formen vor [Tittmann 2000], einer oxidierten und einer reduzierten Form. Die reduzierte Form wird leicht durch molekularen Sauerstoff oxidiert.

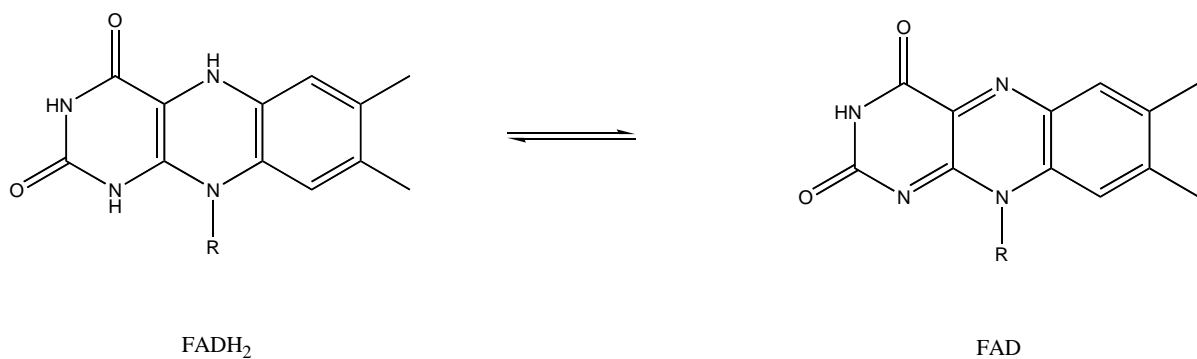


Abbildung 2.3.4: Reduziertes und oxidiertes Flavin-Adenosin Dinucleotid (FAD)

Das konjugierte Ringsystem von FAD kann ein oder zwei Elektronen aufnehmen, wodurch das stabile Radikal Semichinon FADH^\cdot bzw. das vollständig reduzierte Hydrochinon FADH_2 gebildet wird. Die Aufgabe, die FAD im Stoffwechsel übernimmt, ist die Elektronenaufnahme. Dadurch werden Substrate oxidiert und das FAD reduziert. Dieses wird anschließend in einem zweiten Schritt wieder reversibel durch molekularen Sauerstoff aufoxidiert und kann den nächsten Zyklus beginnen.

2.4 Fluoreszenz – Korrelations – Spektroskopie (FCS)

2.4.1 Theoretische Grundlagen der Korrelation

Korrelationsanalysen können verborgene Informationen aus Signalen herausrechnen. Dabei ist unter einer Korrelation im weitesten Sinne die wechselseitige Beziehung oder Beeinflussung zweier Funktionen zu verstehen. Mathematisch ähnelt eine Korrelation der Faltung oder Konvolution [Bronstein 1991]. Eine Funktion $f(x)$ wird mit einer zweiten Funktion $g(x)$, die in x verschoben ist, multipliziert und über den gesamten Wertebereich gemittelt (aufsummiert bzw. integriert).

$$G(\tau) = f(x) \otimes g(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x') * g(x'+x) dx' \quad [\text{Formel 2.4.1.1}]$$

Die Gleichung gibt das Faltungsintegral wieder, wobei \otimes die Faltungsoperation kennzeichnet. Lediglich die Position von $g(x)$ unterscheidet Korrelation und Faltung voneinander. Wird $g(x-x')$ nach $g(x'+x)$ verschoben, spricht man von Korrelation. Ist die Abfragefunktion gleich der ursprünglichen, spricht man von einer Autokorrelation. Sie gibt Auskunft über die Fluktuationen innerhalb einer Signalspur nach einer verschobenen Zeit τ . Währenddessen können mittels der sogenannten Kreuzkorrelation, bei der zwei verschiedene Funktionen korreliert werden, Ähnlichkeiten von und Zusammenhang zwischen zwei Signalspuren untersucht werden. Im Gegensatz dazu gibt die Autokorrelation zeitliche Veränderungen wieder.

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \frac{1}{(1 + \tau/t_c)} \frac{1}{\sqrt{1 + 1/K^2 \tau/t_c}} \quad [\text{Formel 2.4.1.2}]$$

Der erste Faktor ist die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Fokus. T_c ist die Diffusionszeit und K das Verhältnis von z -Ausdehnung zu xy -Ausdehnung des Fokus.

Hat man nicht nur reine Diffusion, sondern auch Änderungen der Fluoreszenzintensität durch Reaktionen, erhält man weitere Komponenten.

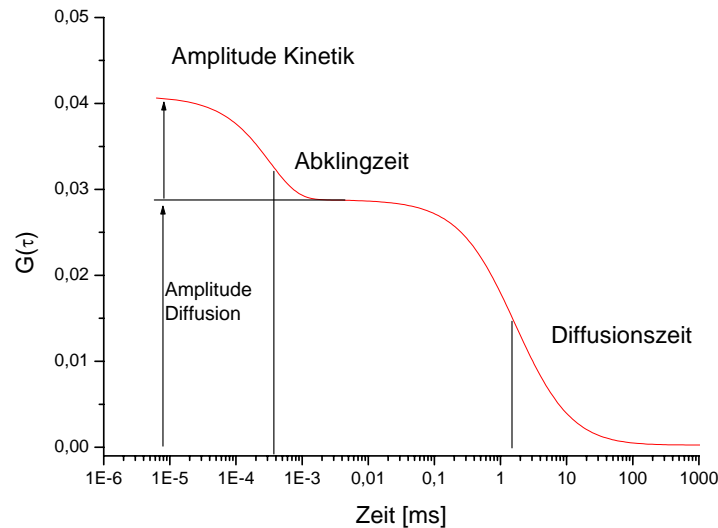
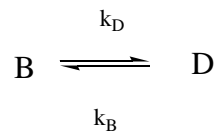


Abbildung 2.4.1.3: FCS-Kurve eines sich verändernden Moleküls.

Diese sind durch eine Amplitude und eine Abklingzeit gekennzeichnet. Wechselt der Farbstoff von einem hellen Zustand B zu einem dunklen D mit der Geschwindigkeitskonstante k_D , so gilt in der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie folgende Formel [Schwille]:



$$G_{\text{total}}(\tau) = G_{\text{diffusion}}(\tau) \cdot X_{\text{kinetik}}(\tau)$$

$$X_{\text{kinetik}}(\tau) = F \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_k}}$$

$$\tau_k = \frac{1}{k_D + k_B}$$

$$F = \frac{k_D}{k_D + k_B}$$

[Formel 2.4.1.4]

2.5 Kinetik

In der Kinetik wird die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen untersucht. Im Wesentlichen verfolgt man damit zwei Ziele: Man will eine Reaktion optimieren, sodass sie schneller abläuft. Zu diesem Zweck können Temperatur, Druck oder Lösungsmittel variiert werden. Durch Zugabe eines Katalysators können beachtliche Steigerungen der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. Der zweite Grund weshalb man sich mit der Kinetik einer Reaktion beschäftigt, sind Fragen des Mechanismus.

2.5.1 Reaktionen erster Ordnung

Reaktionen erster Ordnung sind oft Zerfallsreaktionen. Die Substanz A reagiert bzw. zerfällt zu Substanz B und C.

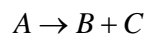


Abbildung 2.5.1.1: Reaktionsgleichung einer Reaktion erster Ordnung

Das Geschwindigkeitsgesetz einer solchen Reaktion lautet:

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k[A]$$

Abbildung 2.5.1.2: Geschwindigkeit der Produktbildung

Die Geschwindigkeit mit der Substanz A zerfällt ist gleich der Geschwindigkeit mit der Substanz B gebildet wird, ist gleich der Bildungsgeschwindigkeit von Substanz C und dies ist gleich einer Geschwindigkeitskonstanten mal der Konzentration von A. Die Geschwindigkeitskonstante ist nicht konzentrationsabhängig, aber sehr wohl von der Temperatur abhängig.

Durch Integration dieser Formel erhält man ein Gesetz, das die Eduktabnahme im Verlauf der Zeit beschreibt.

$$[A]_t = [A]_0 * e^{-kt} \quad \text{[Formel 2.5.1.3]}$$

$[A]_t$ ist die Eduktkonzentration zum Zeitpunkt t , $[A]_0$ ist die Ausgangskonzentration des Eduktes und k die Geschwindigkeitskonstante. Eine Reaktion erster Ordnung folgt einem monoexponentiellen Verlauf.

2.5.2 Reaktionen zweiter Ordnung

Reaktionen zweiter Ordnung haben dagegen ein komplexes Verhalten: Reaktionen zweiter Ordnung sind bimolekulare Reaktionen, da ihre Geschwindigkeit proportional zur Zahl der Stöße zwischen beiden Reaktionspartnern ist, die wiederum proportional zu ihren jeweiligen Konzentrationen sind. Bei einer Reaktion 2. Ordnung bei der die beiden Teilchen identisch sind gelten folgende Gesetze: (Abb. 2.5.1.3)

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^2 \quad \text{[Formel 2.5.2.1]}$$

$$[A]_t = \frac{[A]_0}{1 + kt[A]_0}$$

2.5.3 Arrheniusgleichung

Bei den meisten Reaktionen nimmt die Geschwindigkeit mit der Temperatur zu. Empirisch wurde gefunden, dass viele Reaktionen der Arrheniusgleichung folgen:

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{[Formel 2.5.3.1]}$$

In dieser Gleichung ist A der präexponentielle Faktor, k die Geschwindigkeitskonstante, E_a die Aktivierungsenergie und T die Temperatur.

Die Aktivierungsenergie ist die Energie, die die Reaktanden besitzen müssen, damit sie miteinander reagieren und Produkte bilden können. D.h. nicht jeder Stoß zwischen zwei Reaktionspartnern führt zum gewünschten Produkt. Der Exponentialteil gibt den Anteil der Moleküle an, die die nötige Aktivierungsenergie haben. Der präexponentielle Faktor kann als die Zahl der Stöße interpretiert werden, die überhaupt stattfinden multipliziert mit einem Orientierungsfaktor.

2.5.4. Michaelis Menten Kinetik

Enzymatische Reaktionen haben oft ein Vorgleichgewicht. Das bedeutet, dass der eigentlichen Reaktion eine weitere Reaktion vorgeschaltet ist, die aber wesentlich schneller ist, als die eigentliche Reaktion.



Abbildung 2.5.4.1: Mechanismus einer enzymatischen Reaktion

Das Enzym reagiert mit dem Substrat zum Enzym-Substrat-Komplex. Diese Reaktion ist sehr schnell und reversibel. Danach folgt die relativ langsame Umsetzung des Substrates zum Produkt. Diese Reaktion ist irreversibel. Michaelis und Menten haben eine Gesetzmäßigkeit für solche Reaktionen beobachtet.

$$\frac{d[P]}{dt} = k[ES] \quad [\text{Formel 2.5.4.2}]$$

Die Geschwindigkeit der Produktbildung ist abhängig von der Enzym-Substrat-Konzentration. Dadurch, dass diese Reaktion sehr schnell im thermodynamischen Gleichgewicht ist, kann man die Enzym-Substrat-Konzentration über die Gleichgewichtskonstante errechnen.

$$K = \frac{k_{hin}}{k_{rück}} = \frac{[Produkte]}{[Edukte]} \quad \text{[Formel 2.5.4.3]}$$

Umformung gibt die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_b[E]_0[S]}{K_m + S} \quad \text{[Formel 2.5.4.4]}$$

Hierbei ist k_b die Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Produktes aus dem Enzymsubstratkomplex und K_m , die Michaelis-Konstante, die Gleichgewichtskonstante des Vorgleichgewichtes.

3. Material und Methoden

3.1 Farbstoffe - Proben

In dieser Arbeit wurde PET - Photoinduzierter Elektronen Transfer und FRET – Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer - zur Aufklärung der Konformationsdynamik von DNA – Hairpins verwendet.

Ein Farbstoff der sehr gut durch PET gequenchet wird, ist MR 121 (K.H. Drexhage, ATTO-TEC, Siegen, Deutschland). Er besitzt eine Komplexbildungskonstante von 110 M^{-1} . Im Komplex zeigt er keine messbare Fluoreszenz. Darüber hinaus besitzt er hervorragende Absorptions- und Emissionseigenschaften. Mit einem Absorptionsmaximum von 660 nm ist er sehr gut mit gepulsten Laserdioden anzuregen. Sein Extinktionskoeffizient von 80.000 l/mol*cm und seine Quantenausbeute von 0,3 zusammen mit der sehr guten Photostabilität machen ihn zu einem hervorragenden Farbstoff für Messungen auf Einzelmolekülebene.

MR 121

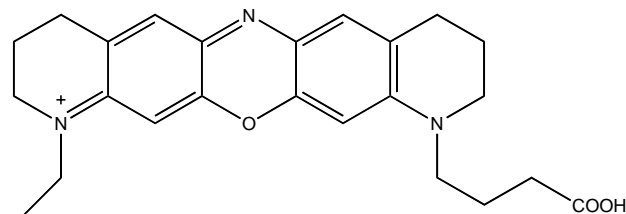


Abbildung 3.1.1: Farbstoff MR 121

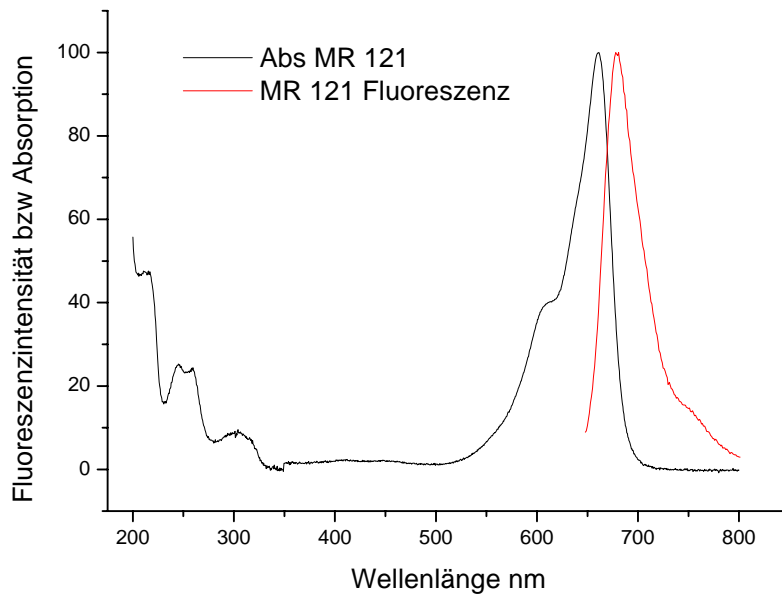


Abbildung 3.1.2: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Farbstoffes MR 121

Als Vergleichssystem wird das fast schon klassische FRET-Paar Cy3 / Cy5 (GE Healthcare, United Kingdom) verwendet. Cy3 dient als Donor und hat ein Extinktionskoeffizient von $150.000 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ bei einer Wellenlänge von 550 nm . Damit ist er sehr gut mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG anzuregen. Das Emissionsmaximum liegt bei 570 nm . Cy5, der Akzeptor, hat sein Absorptionsmaximum bei 650 nm mit einem Extinktionskoeffizient von $250.000 \text{ l / mol cm}$. Dadurch hat man kaum Direktanregung des Farbstoffes durch den frequenzverdoppelten Nd:YAG. Das Emissionsmaximum liegt bei 670 nm und ist um 100 nm weiter rot verschoben als die Emission des Donors und damit einfach zu unterscheiden.

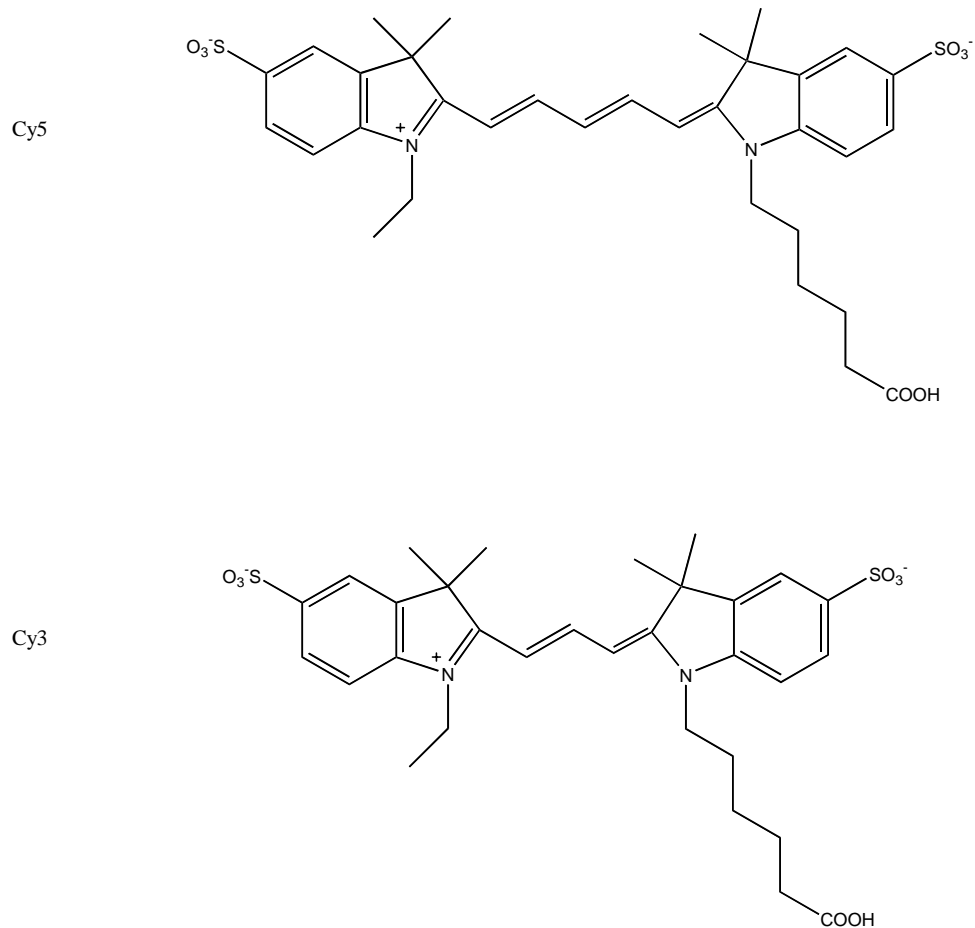


Abbildung 3.1.3: Struktur der Farbstoffe Cy5 und Cy3

Aus dem Emissionsspektrum des Donor und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors wurde zusammen mit den Extinktionskoeffizienten und der Quantenausbeute ein Försterradius von 53 Å berechnet.

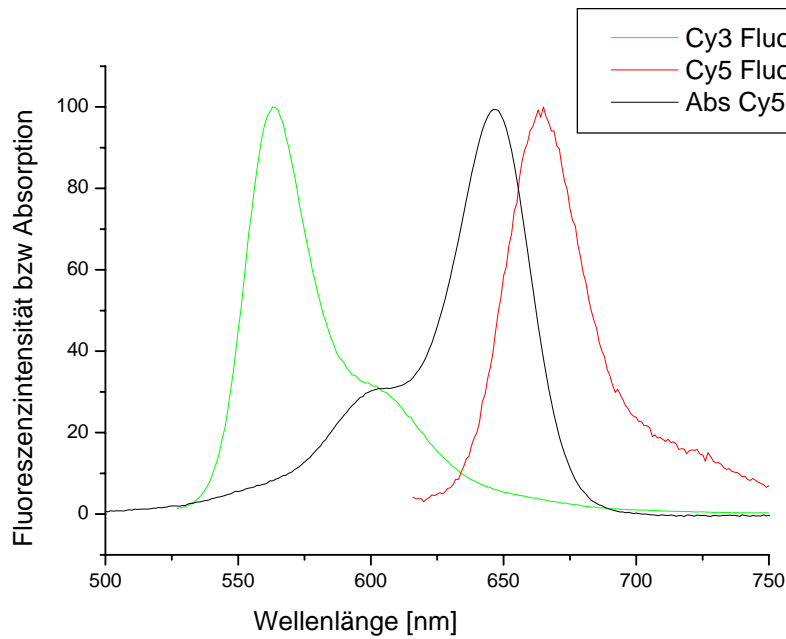


Abbildung 3.1.4: Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum von Cy3 und Cy5

Daraus ergibt sich folgende FRET-Effizienz – Abstandsbeziehung.

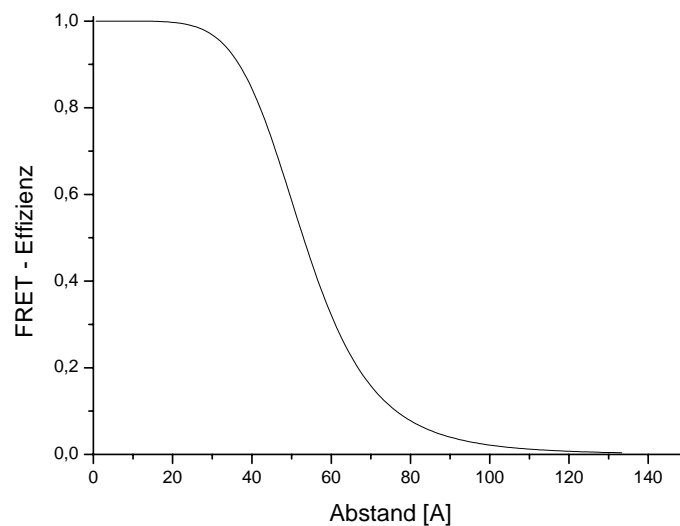


Abbildung 3.1.5: FRET-Effizienz – Abstandsbeziehung

Untersucht werden die Farbstoffe an DNA. Dazu wird ein DNA-Hairpin verwendet. Für den PET-Hairpin wird die DNA (IBA-Go, Göttingen, Deutschland) mit dem Fluoreszenzfarbstoff (MR 121) markiert. Der FRET-Hairpin wurde markiert geliefert.

Amino – C6 Linker - CCCCATTTTTTTTTTTTTTTGGGGTTT – Biotin (PET)

Cy5 – CCCCATTTTTTTTTTTTTTT – Cy3 – GGGGTTT – Biotin (FRET)

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (Gegensequenz)

Abbildung 3.1.6 Sequenzen der verwendeten DNA

Gekoppelt wird der Farbstoff an die DNA in Carbonatpuffer.

Carbonatpuffer 100mM pH = 8,5

840 mg	Natriumhydrogencarbonat (84 g/mol)	(Fluka, Buchs, Schweiz)
100 ml	Wasser	
5g	Aktivkohle (Fluka, Buchs, Schweiz)	
	1 M Salzsäure	

Das Natriumhydrogencarbonat wird abgewogen und in Wasser gelöst. Der pH-Wert wird auf 8,5 mit Salzsäure eingestellt. Danach wird die Aktivkohle hinzugegeben. Vor Gebrauch wird die Lösung steril gefiltert.

Vorschrift 3.1.7: Vorschrift zur Herstellung von Kopplungspuffer

Vor dem Koppeln wird der Farbstoff aktiviert.

Farbstoffaktivierung

	O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N',-tetramethyluroniumtetrafluorborat (301 g/mol)	
	TSTU (Fluka, Buchs, Schweiz)	
	Farbstoff	
1 µl	Diisopropyletylamin (Fluka, Buchs, Schweiz)	
	Aceton (Fluka, Buchs, Schweiz)	

Der Farbstoff wird in wasserfreiem Aceton gelöst und das Aktivierungsreagenz sowie die Base hinzugegeben. Die Lösung lässt man anschließend für 2h auf dem Schüttler reagieren.

Vorschrift 3.1.8: Vorschrift zur Farbstoffaktivierung

Kopplung

40µl Carbonatpuffer 100mM pH = 8,5

10 µl 100 pmol/µl DNA-Lösung

1µl aktivierter Farbstoff

Die Reagenzien werden zusammen pepitiert und über Nacht geschüttelt. Danach wird das Produkt von den Edukten mittels HPLC (Agilent, Karlsruhe, Deutschland) getrennt. Als Säule wird eine Reversed-phase-Säule Hypersil – Si (Knauer, Berlin, Deutschland) verwendet. Als Laufmittel wird eine 0,1 M wässrige Triethylammoniumacetat Lösung (A) bzw. eine 0,1 M Triethylammoniumacetat Lösung mit 75% Acetonitril und 25% Wasser (B) verwendet.

Anschließend wird eine Step-Elution durchgeführt.

Zeit	Fluss	Eluent
0 min	2,5 ml/min	100% Laufmittel A; 0% Laufmittel B
5 min	2,5 ml/min	65% Laufmittel A; 35% Laufmittel B
34 min	2,5 ml/min	0% Laufmittel A; 100% Laufmittel B
60 min	2,5 ml/min	0% Laufmittel A; 100% Laufmittel B

Tabelle 3.1.9: Endpunkte der gefahrenen Gradienten

Das Produkt wird aufgefangen und anschließend zum Salzentzug über eine Gelfiltrationssäule (NAP-Säule, GE Healthcare, United Kingdom) von dem Triethylammoniumacetat getrennt. Die Lösung wird daraufhin gefriergetrocknet.

Vorschrift 3.1.10: Vorschrift zur Koppelung von DNA und Farbstoff

2 M TEAA – Lösung

147 ml	Triethylamin (101 g/mol) (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
120 ml	Eisessig (60 g/mol) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
	Wasser

500 ml Wasser werden vorgelegt und mit Eis gekühlt. Die Essigsäure wird hinzugegeben. In mehreren Portionen wird das Triethylamin hinzugegeben. Nach jeder Zugabe bildet sich eine 2. Phase auf der Oberfläche, die aber mit der Zeit verschwindet. Die Lösung wird für 12h gerührt und anschließend der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Vorschrift 3.1.11: Vorschrift zur Herstellung einer 2M TEAA - Lösung

Laufmittel A

50 ml	2M TEAA-Lösung
950 ml	Wasser

Beide Lösungen werden zusammengegeben und für 12 h stehen gelassen.

Vorschrift 3.1.12: Vorschrift zur Herstellung von HPLC-Laufmittel A

Laufmittel B

50 ml	2M TEAA-Lösung
750 ml	Acetonitril (Serva, Heidelberg, Deutschland)
200 ml	Wasser

Alle Lösungen werden zusammengegeben und für 12 h stehen gelassen.

Vorschrift 3.1.13: Vorschrift zur Herstellung von HPLC-Laufmittel B

3.2 Fluoreszenzspektrometer /Absorptionsspektrometer

Die Quantenausbeuten und Schmelzkurven werden mit Hilfe des Absorptionsspektrometers Cary 500 Scan (Varian, Palo Alto, USA) und des Fluoreszenzspektrometers Cary Eclipse mit Multizellhalter und Peltierelement (Varian, Palo Alto, USA) aufgenommen. Um ein geringes Probenvolumen zu haben werden Suprasil-Halbmikroküvetten mit einem Füllvolumen von 800µl verwendet.

3.2.1 Einzelmolekülspektroskopie

In Abbildung 3.2.1.1 ist die Anlage gezeigt, die zur Messung einzelner Moleküle auf Oberflächen verwendet wurde.

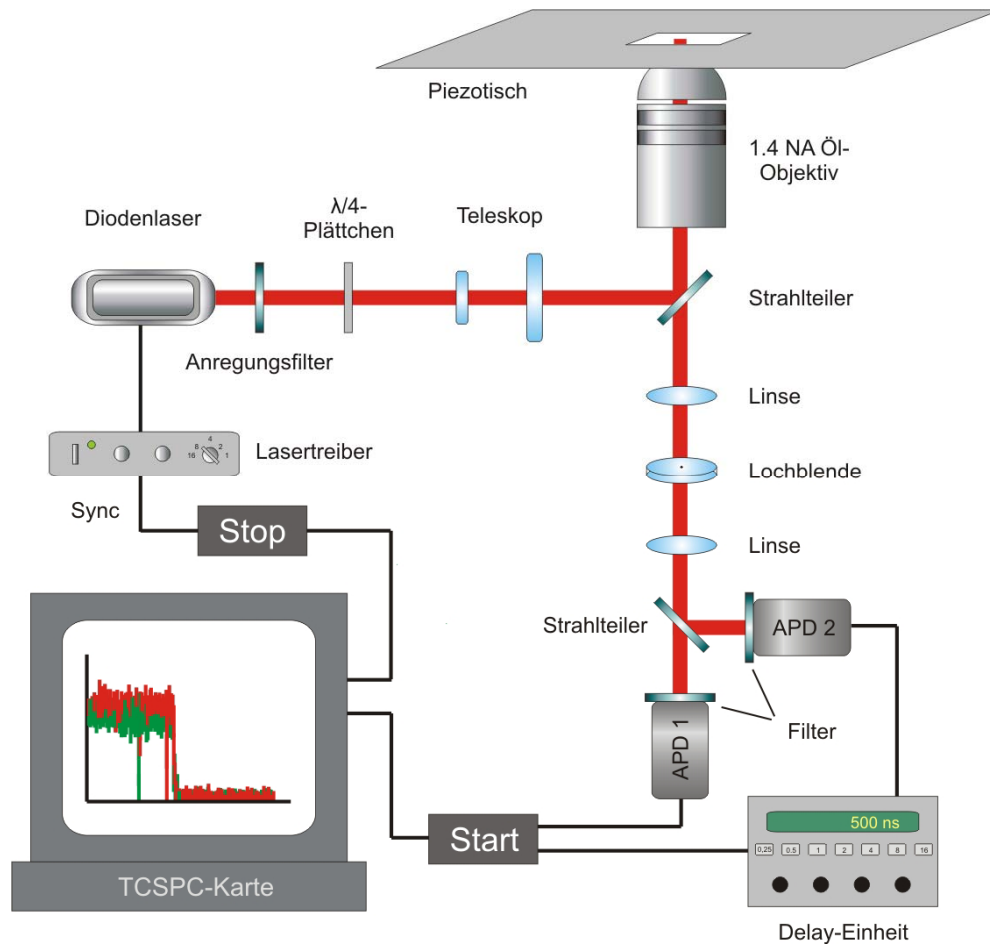


Abbildung 3.2.1.1: Anlage zur Messung einzelnen Molekülen auf Oberflächen

Sie besteht aus einem inversen, konfokalen Mikroskop (Axiovert 100TV, Zeiss), das mit dem Piezo-Tisch PZT-Servo (Physik Instrumente (PI), Karlsruhe, Deutschland) zur Änderung der x-y-Position ausgestattet ist. Als Anregungsquelle für die „roten“ Proben (MR 121) wird ein gepulster Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm und einer Repetitionsrate von 80 MHz verwendet (PDL 800-B, PicoQuant, Berlin, Deutschland). Das Laserlicht wird in eine Glasfaser eingekoppelt, um ein gaussähnliches Strahlprofil zu bekommen. Der Strahl wird durch ein Teleskop aufgeweitet, bevor er ins Mikroskop eingekoppelt wird, nachdem er einen Anregungsfilter (630DF10; Omega Optics, Brattleboro, USA) durchlaufen hat. Nach dem Strahlteiler (645DMLP, Omega Optics, USA) wird das Licht durch ein Mikroskopobjektiv (100x, NA = 1.4, Olympus, Tokyo, Japan) in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird mit dem selben Objektiv gesammelt und durch den Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt. Das Licht wird durch die Linsen im

Mikroskop fokussiert. Um bessere Bilder zu erhalten wird eine Lochblende von 100 μ m eingesetzt.

Das Licht wird auf eine Single – Photon – Avalanche – Diode (AQR-14; EG&G Optoelectronics, Kanada) fokussiert, die mit einem Emissionsfilter (680DF80; Omega Optics, Brattleboro, USA) ausgestattet ist.

Die FRET-Proben werden mit einem frequenzverdoppeltem Nd:YAG 532nm Compass 215M (Coherent, Santa Clara, USA) angeregt. Als 1. Strahlteiler wird ein 560 DMLP (Omega Optics, USA) verwendet. Das verwendete Objektiv ist das selbe. Nach der Lochblende wird dieses mal das Signal gesplittet und auf zwei APDs fokussiert. Als Strahlteiler wird ein 645 DMLP (Omega Optics, USA) verwendet. Die beiden Emissionsfilter sind ein 570 DF 60 und 675 DF 50 (beide Omega Optics, USA)

Das Detektorsignal wird von einer Time-Correlated Single Photon Counting Interface Card (TCSPC) (SPC-630; Becker & Hickl, Berlin, Deutschland) zusammen mit dem Triggersignal weiterverarbeitet. Um die Delaytime zwischen den Detektoren und dem Laserpuls zu kompensieren sind jeweils eine Delayunit (DG535, Stanford Research Systems, Bell Electronics, Renton, Washington) zwischen den Detektoren und der PC-Karte geschaltet.

Das Messprogramm zur Koordination der Datenacquisition, Tischbewegung und Polarisationsmodulation wurde in LabView von Prof. Dr. Kenneth D. Weston geschrieben. Die Daten werden im FIFO-mode der SPC630 aufgenommen, d.h. jedes Photon wird mit seiner absoluten Ankunftszeit, der Zeit zwischen dem Start der Messung und der Ankunft des Photons, und der mikroskopischen Zeit, der Zeit zwischen dem Laserpuls und der Fluoreszenz, gespeichert. Die Karte arbeitet im reversen Modus, d.h. das Detektorsignal startet den Zeitnehmer für die mikroskopische Zeit und der Triggerpuls von dem darauffolgenden Laserpuls stoppt ihn wieder.

Die Analysesoftware erlaubt die Bestimmung der Fluoreszenzintensität aus Kanal 1 und Kanal 2 sowie der Gesamtintensität, der spektralen Verteilung (F_2 – Wert), der aus dem Verhältnis der Intensität aus Kanal 2 zur Gesamtintensität berechnet wird, sowie der Fluoreszenzlebensdauer aus Kanal 1 und 2 sowie aus beiden Kanälen zusammen. Die Fluoreszenzlebensdauer wird über einen monoexponentiellen Fit der maximalen Wahrscheinlichkeit bestimmt. Der MLE (Maximum Likelihood Estimator) wird über Formel 3.4.1 bestimmt. [Soper 1994, Tellinghuisen 1993]

$$1 + \left(e^{T/\tau} - 1 \right)^{-1} - m \left(e^{mT/\tau} - 1 \right)^{-1} = N^{-1} \sum_{i=1}^m i N_i \quad [\text{Formel 3.2.1.2}]$$

T	Zeitauflösung der Microtime
m	Zahl der Zeitintervalle (hier 64)
N	Zahl der Photonen
N _i	Zahl der Photonen im Zeitintervall i

Für diese Analyse werden die Photonen aus allen Pixel genommen, die in einem Kreis von beliebigem Radius vorhanden sind. Es werden von dem Programm nur die Stellen als ein Molekül erkannt, die mehr als eine bestimmte Anzahl von Photonen haben.

Hat man die Oberfläche abgescannt, so kann man auf einzelne Spots klicken, von denen nun Traces aufgenommen werden. Dabei fährt der Piezotisch an die entsprechende Stelle der Oberfläche und es wird die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Für die Analyse dieser Spuren wurde ein Programm geschrieben, das im Anhang zu sehen ist.

3.3 Oberflächen

Um die DNA auf der Oberfläche immobilisieren zu können und keine unspezifische Adsorption zu haben, wurde eine BSA-Oberfläche hergestellt.

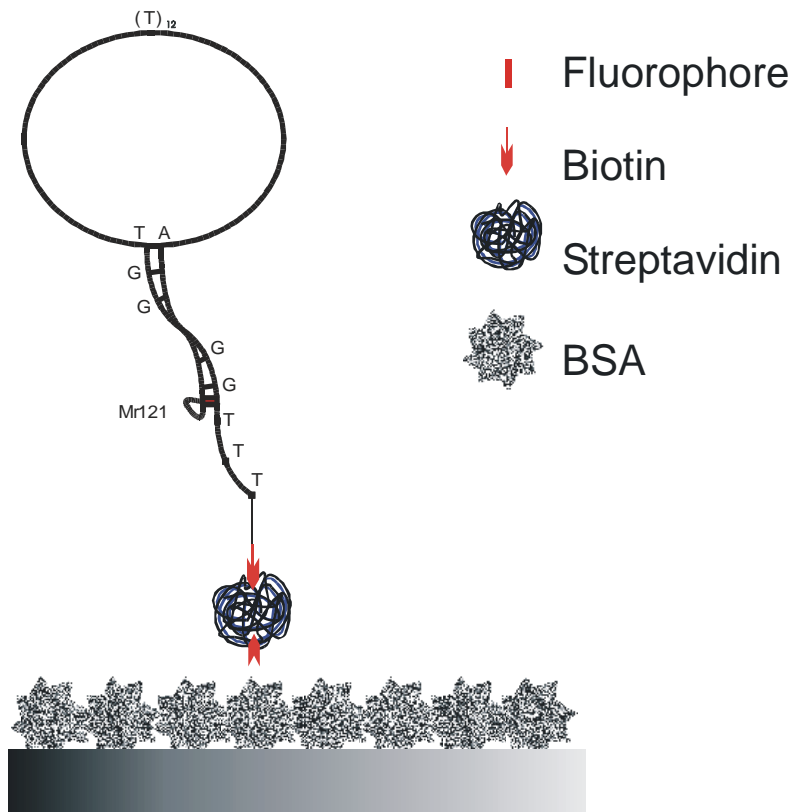


Abbildung 3.3.1: Oberfläche zur Immobilisation von Molekülen

BSA-Oberfläche

10 mg	BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
1 mg	BSA-Biotin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
1 mg	Streptavidin in 2 ml PBS (Roche, Basel, Schweiz)
2 ml	PBS über Aktivkohle gelagert und gefiltert

Die Oberfläche im Plasma reinigen und benetzen, das BSA und BSA-Biotin in PBS lösen und in das Rack geben. 12h bei 4°C inkubieren lassen. 5 mal mit PBS waschen und für 10 min die Streptavidinlösung einwirken lassen und wieder 5 mal waschen. Danach kann die Probe immobilisiert werden.

Vorschrift 3.3.2: Vorschrift zur Herstellung von BSA-Oberflächen

PBS-Puffer

- 1 PBS-Puffertablette (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 100 ml Wasser
- 1 Aktivkohle (Fluka, Buchs, Schweiz)

Die PBS-Tablette wird in Wasser gelöst und Aktivkohle hinzugegeben. Vor dem Gebrauch wird der Puffer steril filtriert damit kein Kohlestaub in der Lösung ist, der das Licht stark streut.

Vorschrift 3.3.3: Vorschrift zur Herstellung von PBS-Puffer

3.4 Photostabilität

Zur Erhöhung der Photostabilität wird Glukoseoxidase zugegeben. Glukoseoxidase stammt von *Apergillus Niger*, einem Pilz. Dieses Enzym oxidiert Zucker durch molekularen Sauerstoff auf. Diese Reaktion wird genutzt um den Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen.

Glukoseoxidase 20x Stocklösung 1 ml in Tris mit Tween 20

- 1 mg Glukoseoxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 0,5 ml Tris 25 mM KCl über Aktivkohle gelagert und gefiltert
- 2 µl Katalase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 4 µl 1M DTT-Lösung
- 0,5 ml Glycerin (Fluka, Buchs, Schweiz)
- 0,5 µl Tween 20 (Fluka, Buchs, Schweiz)
- 50 µl Natriumdithionit

Die Glukoseoxidase wird abgewogen und in Tris gelöst. Die Katalase, das DTT, das Natriumdithionit und das Tween 10 werden hinzugegeben und die Lösung wird homogenisiert. 0,5 ml Glycerin werden hinzugegeben und vermischt. Die Lösung wird portioniert (50µl) und bei -20°C eingefroren.

Vorschrift 3.4.1: Vorschrift zur Herstellung von Glukoseoxidase 20x Stocksolution

Glukoselösung zur Verdünnung

0,1 g Glukose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

0,9 ml PBS über Aktivkohle gelagert und gefiltert

100 µl Glycerin

10 µl 1M β -Mercaptoethylamin-Lösung in PBS (77 g/mol)

Die Glukose wird in PBS gelöst und die β -Mercaptoethylamin-Lösung wird hinzugegeben. Am Ende wird das Glycerin hinzugegeben und alles bei -20°C eingefroren.

Vorschrift 3.4.2: Vorschrift zur Herstellung von Glukoselösung

1 M DTT-Lösung in PBS/TRIS

154 mg DTT (154 g/mol) (Fluka, Buchs, Schweiz)

1 ml PBS/Tris

Alles wird zusammengegeben und bei -20°C eingefroren.

Vorschrift 3.4.3: Vorschrift zur Herstellung von 1 M DTT-Lösung

1 M β -Mercaptoethylaminlösung in PBS/Tris

- 77 mg β -Mercaptoethylamin (77 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 1 ml PBS/Tris

Alles wird zusammengegeben und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Vorschrift 3.4.4: Vorschrift zur Herstellung von 1 M β -Mercaptoethylaminlösung

10 mM Tris – Puffer (100ml)

- 121 mg Tris (121 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 37,22 mg EDTA (1 mM) $2\text{ Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (372,2 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 1 M Salzsäure (Fluka, Buchs, Schweiz)

25 mM KCl (74,55 g/mol): 186 mg (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

200 mM KCl (74,55 g/mol): 1,49 g (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

Das Tris, EDTA und gegebenenfalls das Kaliumchlorid werden abgewogen und in Wasser gelöst. Die Lösung wird mit HCl titriert bis es einen pH-Wert von 7,5 hat, zur Lösung wird Aktivkohle hinzugegeben und autoklaviert. Vor Gebrauch wird die Lösung steril gefiltert.

Vorschrift 3.4.5: Vorschrift zur Herstellung von 10 mM Tris-Puffer

Natriumdithionit

- 60 mg Natriumdithionit (174,1 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 1 ml Tris 25 mM KCL über Aktivkohle gelagert und vor Gebrauch steril filtriert

Das Natriumdithionit wird abgewogen und in Tris-Puffer gelöst.

Vorschrift 3.4.6: Vorschrift zur Herstellung von Natriumdithionit

Für die Untersuchung der Ursache der Fluoreszenz von Glukoseoxidase wird eine Stocklösung verwendet.

Flavin-Adenosin Dinukleotid Stocklösung

- 3mg Flavin (829,5 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 1ml Tris 25 mM KCL über Aktivkohle gelagert und vor Gebrauch steril filtriert

Das Flavin wird abgewogen und in Tris-Puffer gelöst. Für die Fluoreszenzmessungen wurden 8 µl dieser Lösung in 1 ml Tris 25 mM KCl verdünnt.

Vorschrift 3.4.7: Vorschrift zur Herstellung von Flavin-Adenosin-Dinukleotid Lösung

Riboflavin (Vitamin B₂)

- 1,4 mg Riboflavin (Vitamin B₂) 376,4 g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 1 ml Tris 25 mM KCL über Aktivkohle gelagert und vor Gebrauch steril filtriert

Das Riboflavin wird abgewogen und in Tris-Puffer gelöst

Vorschrift 3.4.8: Vorschrift zur Herstellung von Riboflavin Lösung

3.5 Kontrollsystem

Als Kontrollsystem für FRET wird ein DNA-Doppelstrang verwendet, mit der folgenden Sequenz:

Biotin GGG GGG GGX¹ AAA AAT CCC CAA AAA AAG GGG GGG G
CCC CCC CCT TTT TT²GGG GTT TTT TTC CCC CCC C

Abbildung 3.5.1: Sequenz des DNA-Doppelstrang

Diese beiden Sequenzen werden fertig gelabelt bei IBA (Göttingen, Deutschland) gekauft.

3.6 FCS

Unter Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie - FCS versteht man die Analyse der zeitlichen Fluktuationen zweier Fluoreszenzsignale. Stammen beide Fluoreszenzsignale von einem Detektor - um eine bestimmte Korrelationszeit zueinander verschoben – spricht man von Autokorrelation, stammen sie von zwei verschiedenen Detektoren, spricht man von der Kreuzkorrelation. Charakteristische Abklingkurven in der Fluoreszenz-Korrelations-Funktion liefern Informationen bezüglich der auftretenden Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit. Korrelationen werden häufig durchgeführt um Triplettzustände zu charakterisieren aber auch Bindungsstudien von farbstoffmarkierten Liganden mit Proteinen werden untersucht.

Die erhaltenen Daten werden mit der Methode des logarithmischen Binnings autokorreliert. Dabei wird die Spur gebinnt und jeder Wert mit dem nächsten Wert multipliziert. Die Ergebnisse werden dann aufsummiert.

$$G(t_1) = \sum_0^{\infty} I(t) * I(t+1) \quad [\text{Formel 3.6.1}]$$

Wobei t_1 die Binnzeit der Spur ist und $I(t)$ die Intensität der Spur zum Zeitpunkt t .

Um die gesamte Autokorrelationskurve zu erhalten, wird nun das Binning der Kurve variiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 FRET – PET

PET - Photoinduzierter Elektronen Transfer und FRET - Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer sind zwei völlig verschiedene Methoden, um Abstandsänderungen im Nanometerbereich zwischen zwei Punkten zu messen. Beide basieren auf dem Phänomen der Fluoreszenz, aber die Mechanismen der Fluoreszenzänderung und die Art der Änderung sind völlig verschieden.

Die beiden Methoden werden an einem Modellsystem, ein DNA – Hairpin, in dieser Arbeit verglichen. Beide Systeme bestehen aus einem DNA Strang, der eine Komplementarität aufweist, die zu einer intramolekularen Hybridisierung führt, die den Stamm des Hairpins bilden. Dieser besteht aus 4 Guanosin – Cytosin – Paarungen und einer Adenosin – Thymin Paarung. Die restlichen Basen bilden den Loop. Dieser besteht wiederum aus 12 Thymidinen, die als Einzelstrang vorliegen. Am 3´-Ende wird der Hairpin über einen Thymidin - Linker mit Hilfe von Biotin an einer Streptavidinoberfläche immobilisiert.

Am 5´-Ende sitzt im Fall des PET-Hairpins der Farbstoff MR 121. Dieser wird von den Guanosinen im Gegenstrang bei direktem Kontakt gelöscht. Der FRET-Hairpin trägt am 5´Ende den Farbstoff Cy5 als Akzeptor und im Gegenstrang, am anderen Ende des Stammes des Hairpins, ist der Donor Cy3 des FRET-Paares lokalisiert [Abb. 4.1.1].

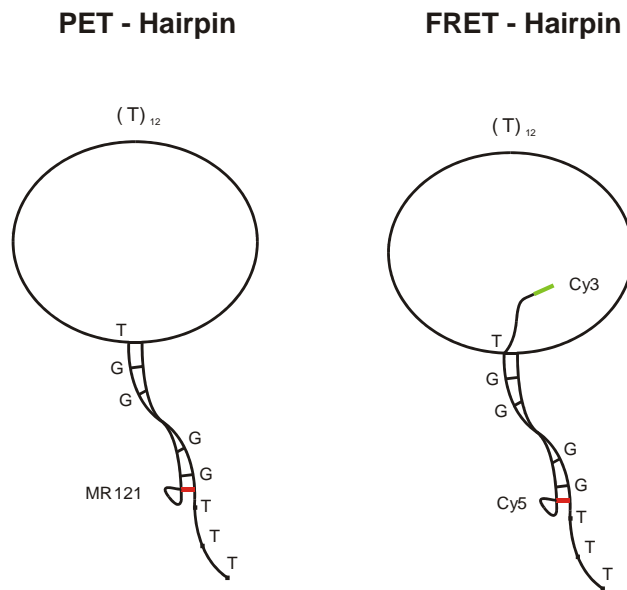


Abbildung 4.1.1: Aufbau des PET-Hairpins und des FRET-Hairpins

Gibt man zu dem Hairpin komplementäre Gegensequenz, so öffnet sich der Hairpin und man erhält eine Änderung der Fluoreszenz. Dies funktioniert sowohl mit dem FRET-Hairpin, als auch mit dem PET-Hairpin [Abb. 4.1.2].

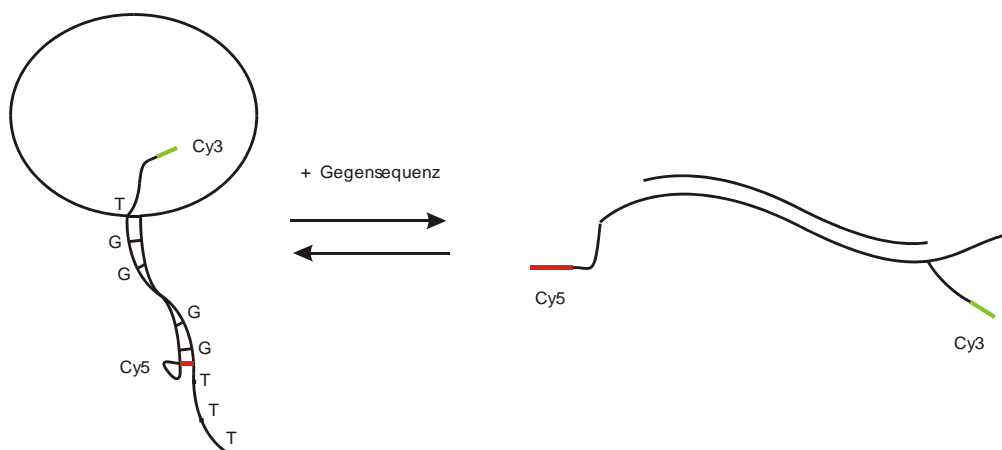


Abbildung 4.1.2: Struktur eines FRET-DNA-Hairpins in geschlossener (links) und geöffneter Form (rechts) nach Hybridisierung an die komplementäre Gegensequenz. Erniedrigt man die Stabilität des Hairpins durch eine Verringerung der Salzkonzentration, so beobachtet man ein stetiges Öffnen und Schließen des Hairpins.

Deutlich ist eine Änderung zwischen der gequenchten und der ungequenchten Konformation zu sehen. Im geschlossenen Zustand hat der FRET-Hairpin eine

Energietransfereffizienz von 80%. Wird er geöffnet, vergrößert sich der Abstand von Donor zu Akzeptor, sodass es zu fast keinem Energietransfer mehr kommt. Bei dem PET-Hairpin wird durch das Öffnen des Hairpins die Guanosin-Farbstoffwechselwirkung verhindert und damit das Quenching aufgehoben. Es kommt zu einem 3 bis 4-fachen Fluoreszenzanstieg.

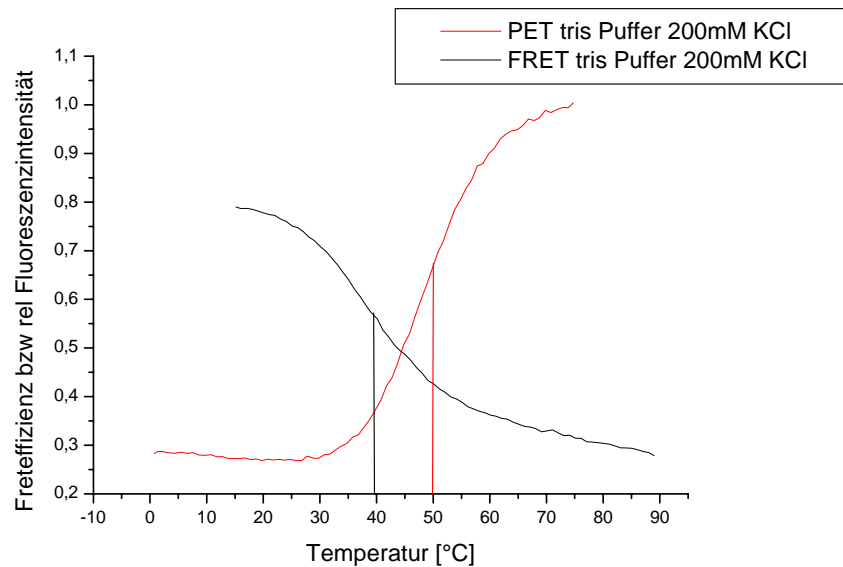


Abbildung 4.1.3: Schmelzkurven des FRET und PET Hairpins in Tris-Puffer mit 200mM KCl

Die Schmelzkurven der beiden Hairpins zeigen zwei verschiedene Schmelzpunkte. Der FRET-Hairpin öffnet sich bei 40°C, der PET-Hairpin hat einen Schmelzpunkt von 50°C. Dieser Unterschied rührt von der Wechselwirkung des PET-Farbstoffes mit den Nukleotiden her. Für die Quenchung des Farbstoffes ist diese unerlässlich, für das FRET-System ist keine Interaktion der Farbstoffe mit den Nukleotiden von Nöten.

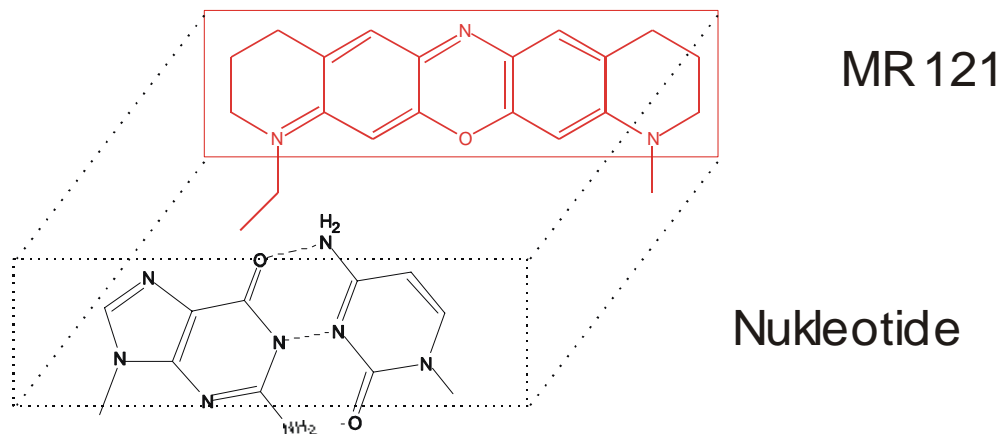


Abbildung 4.1.4: Komplexbildung zwischen MR 121 und Guanosin

Der Farbstoff MR 121 ist so konstruiert, dass die π - π -Interaktion mit dem Guanosinnukleotid möglichst ungestört ist. Auf weitere Gruppen an dem aromatischen Grundgerüst wurde deshalb verzichtet.

Damit die zeitliche Konformationsdynamik nicht herausgemittelt wird, werden die beiden Systeme mit Hilfe der Fluoreszenzeinzelmolekülspektroskopie untersucht. Um Änderungen auf der Sekunden-Zeitskala sehen zu können, werden die Moleküle auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert. Die Oberfläche wird mit der in Kapitel 3.2 beschriebenen Detektionsanlage aufgenommen. Bei der unten gezeigten Oberfläche wird der FRET-Hairpin in Tris – Puffer mit 200 mM KCl vermessen, mit einer mittleren Laserleistung von 10 μ W. Die Sammelzeit pro Pixel beträgt 1 ms. Die Größe des Bildes beträgt 10 x 10 μ m mit einer Auflösung von 200 x 200 Punkten. Die Immobilisierung erfolgt über Biotin/Streptavidin. Eine Schicht aus BSA/BSA-Biotin wird absorptiv auf die Oberfläche aufgebracht. An das Biotin bindet das Streptavidin mit hoher Affinität. Da Streptavidin bis zu vier Biotinmoleküle binden kann, können biotinylierte Proben auf diese Art und Weise an Streptavidin gebunden und dadurch immobilisiert werden.

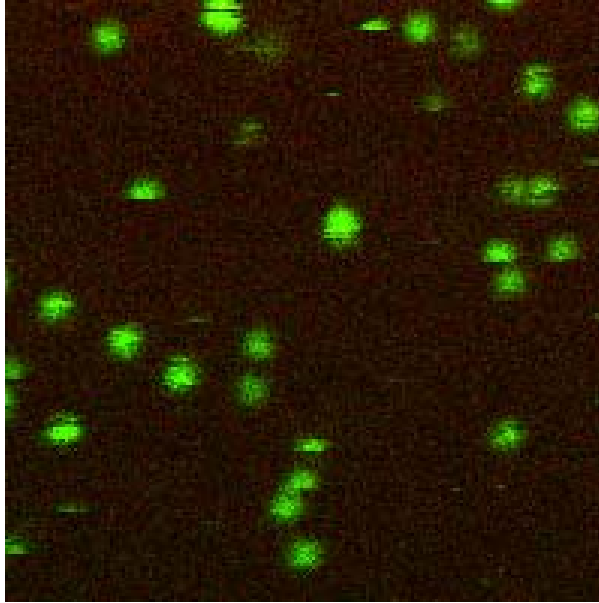


Abbildung 4.1.5: Der FRET-Hairpin immobilisiert auf der BSA-Oberfläche 10 x 10 μm , 50nm/Pixel, 5 μW Anregungsleistung, 532nm

In Abbildung 4.1.5 sind deutlich mehrere Spots auf der Oberfläche zu sehen. Im Ensemble ist eine 80% FRET-Effizienz zu sehen. Es ist zu erwarten, dass hauptsächlich der Akzeptor Cy5 rot leuchtet. Deutlich ist aber nur grüne Fluoreszenz zu sehen. Um zu klären, ob der Akzeptor überhaupt vorhanden ist, wird die gleiche Stelle der Oberfläche nochmals vermessen. Diesmal wird der Akzeptor direkt angeregt.

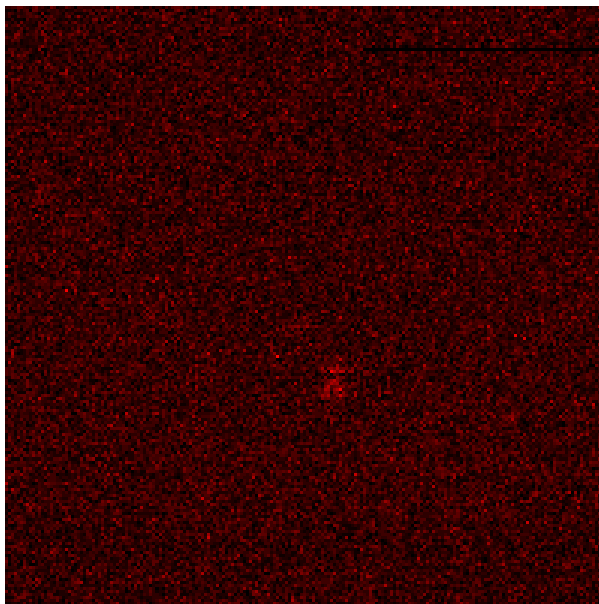


Abbildung 4.1.6: Der FRET-Hairpin immobilisiert auf der BSA-Oberfläche 10 x 10 μm , 50nm/Pixel, 5 μW Anregungsleistung Laserdiode 635nm

Die Oberfläche zeigt keine fluoreszierenden Spots. Eine Wiederholung der Messung mit Anregung im grünen Spektralbereich zeigt das gleiche Muster auf der Oberfläche. D.h. man hatte die ganze Zeit die gleiche Stelle der Oberfläche gescannt und man sieht keinen FRET, da kein Akzeptor vorhanden ist.

Literaturstudien zeigten, dass Cy5 stark sauerstoffempfindlich ist. Wird der Farbstoff in Gegenwart von Sauerstoff angeregt, so wird er schnell irreversibel oxidiert. Durch Entfernung des Sauerstoffes wird Cy5 wesentlich photostabiler, hat aber dann längere Triplets, d.h. man benötigt den Tripletlöcher β -Mercaptoethylamin (MEA). Der im Wasser gelöste Sauerstoff wird durch das Enzym Glukoseoxidase entfernt [Ha 2002]. Dieses Enzym oxidiert Glukose mit Hilfe von molekularem Sauerstoff zu Glukonsäure auf. Erste Messungen zeigten, dass von der Glukoseoxidase selber Fluoreszenz ausgeht. Daraufhin wurde die Fluoreszenz der Glukoseoxidase näher untersucht.

4.2 Die intrinsische Fluoreszenz der Glukose-oxidase aus *Apergillus Niger*

Cy5 ist ein Farbstoff, der äußerst photolabil ist. Durch Entfernen von Sauerstoff kann die Photostabilität erheblich gesteigert werden. Dies geschieht indem Glukoseoxidase den Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert und anschließend Glukose zu Glukonsäure oxidiert. Von der Glukoseoxidase geht selber Fluoreszenz aus, so dass Messungen stark gestört werden (Abb. 4.2.1).

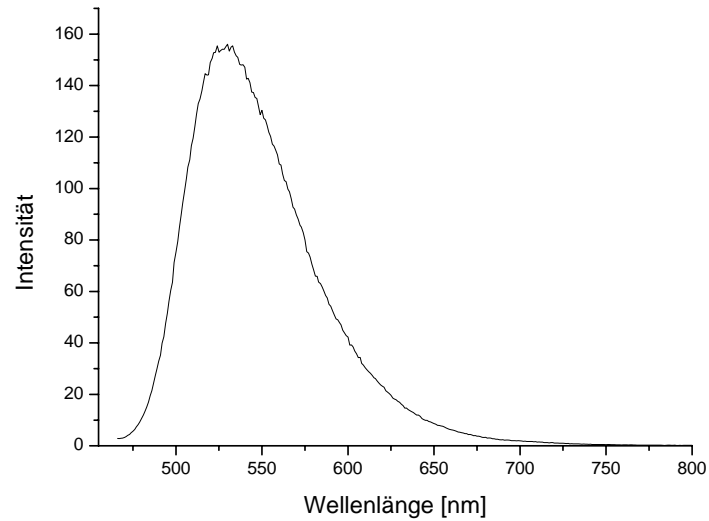


Abbildung 4.2.1: Fluoreszenz der Glukoseoxidase, Anregung bei 450 nm

Die Röntgenstruktur von Glukoseoxidase aus *Apergillus Niger* offenbart die Ursache der Fluoreszenz [Wohlfahrt 1999].



Abbildung 4.2.2: Röntgenstruktur der Glukoseoxidase mit ihren 3 Untereinheiten Flavin-Adenosin-Dinukleotid, α -D-Mannose, N-Acetyl-D-Glucosamin

Glukoseoxidase ist ein Homodimer mit jeweils 80kDa und 3 Untereinheiten : Flavin-Adenosin-Dinukleotid, α -D-Mannose, N-Acetyl-D-Glucosamin. Das Flavin-Adenosin Dinukleotid ist für die Fluoreszenz verantwortlich.

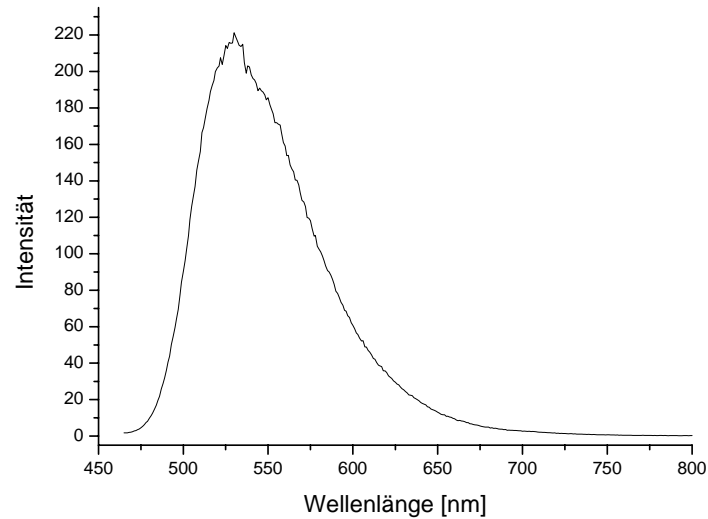


Abbildung 4.2.3: Fluoreszenz des Flavin-Adenosin-Dinukleotid (Anregung bei 450 nm).

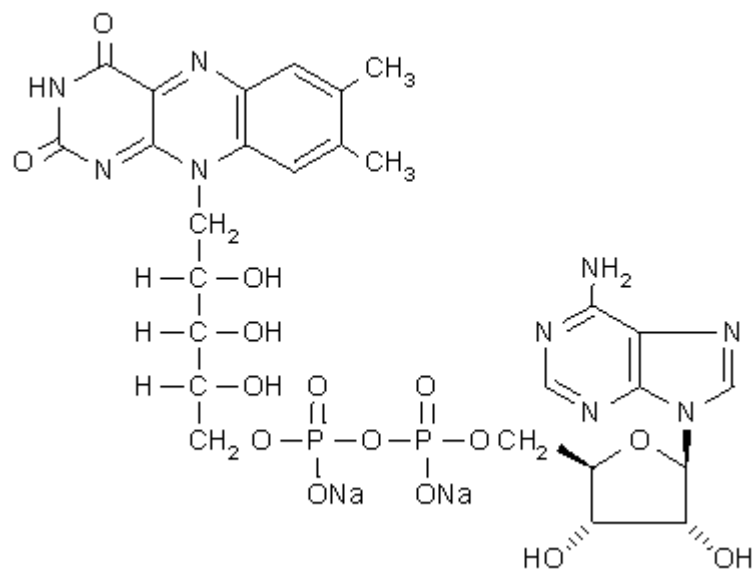


Abbildung 4.2.4: Struktur von Flavin-Adenosin-Dinukleotid

Das Flavin-Adenosin-Dinukleotid liegt in zwei verschiedenen Formen vor [Tittmann 2000]. In einer oxidierten und in einer reduzierten Form. Als Reduktionsreagenz wird Natriumdithionit [Kim 1995] verwendet.

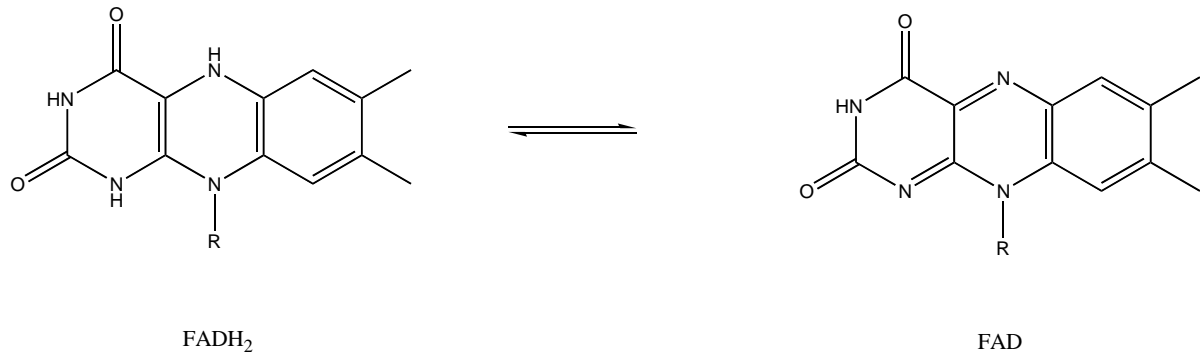


Abbildung 4.2.5: Reduziertes und oxidiertes Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD)

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren dieser beiden Verbindungen sehen völlig verschieden aus. Flavin-Adenosin-Dinukleotid zeigt vier Absorptionsmaxima bei 450 nm, 375 nm 265 nm, und 212 nm. Bei der reduzierten Form ist bei 450 nm und 375 nm keine Absorption festzustellen, wobei die Absorption bei 265 nm noch vorhanden ist. Der Vergleich mit ATP zeigt, dass diese Absorptionsbande vom ATP stammt. Die starke Absorption bei 315 nm stammt von Natriumdithionit, dass als Reduktionsreagenz eingesetzt wurde.

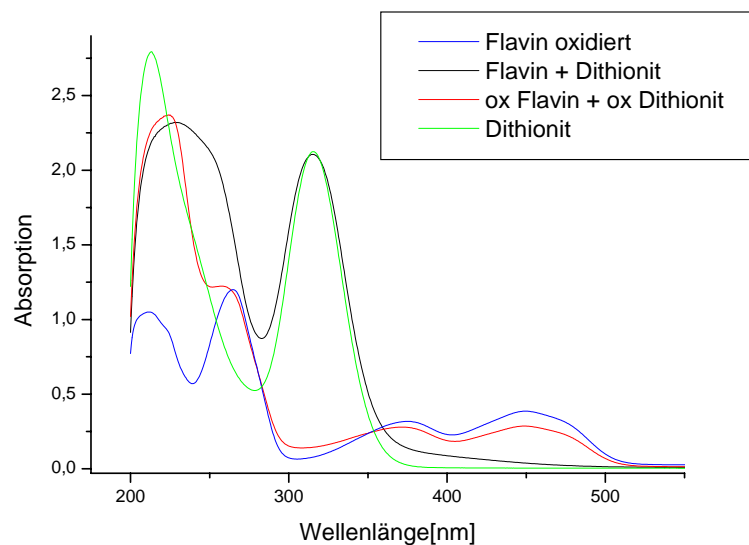


Abbildung 4.2.6: Oxidiertes und reduziertes Flavin

Die Fluoreszenzen der beiden Spezies unterscheiden sich ebenfalls. Das FAD zeigt eine starke Fluoreszenz bei 530 nm, wobei die unterschiedlichen Absorptionen zu gleichen Fluoreszenzspektren führen.

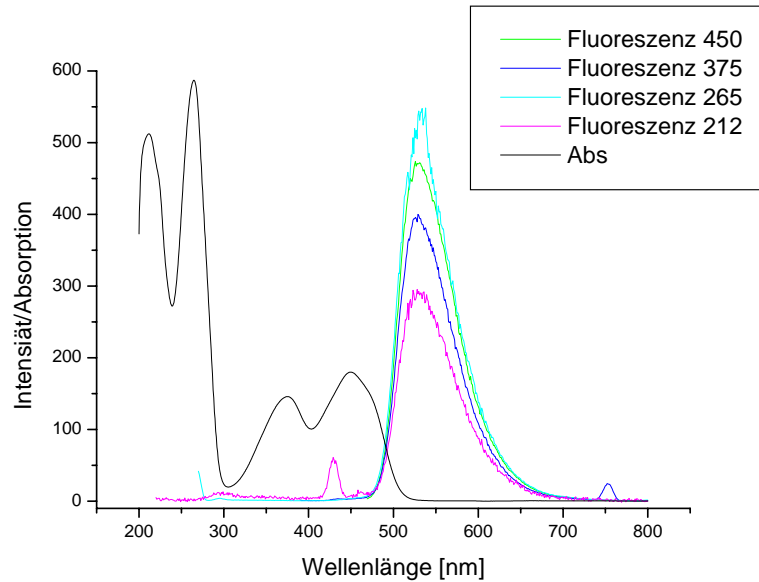


Abbildung 4.2.7: Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungswellenlängen

Die reduzierte Form des Flavin (FADH_2) zeigt keine Fluoreszenz.

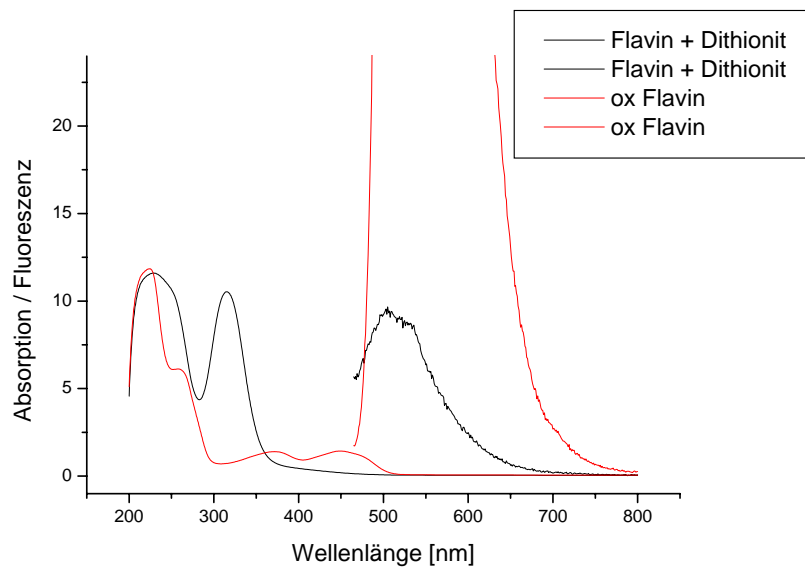


Abbildung 4.2.8: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von FAD und FADH_2

Erstaunlich ist, wie oxidationsempfindlich das FADH_2 ist. Gibt man zu einer FAD-Lösung Natriumdithionit, so nimmt die Fluoreszenz schnell ab. Leitet man

anschließend Luft durch die Lösung, so steigt die Fluoreszenz wieder an und erreicht nach wenigen Sekunden ihren ursprünglichen Wert.

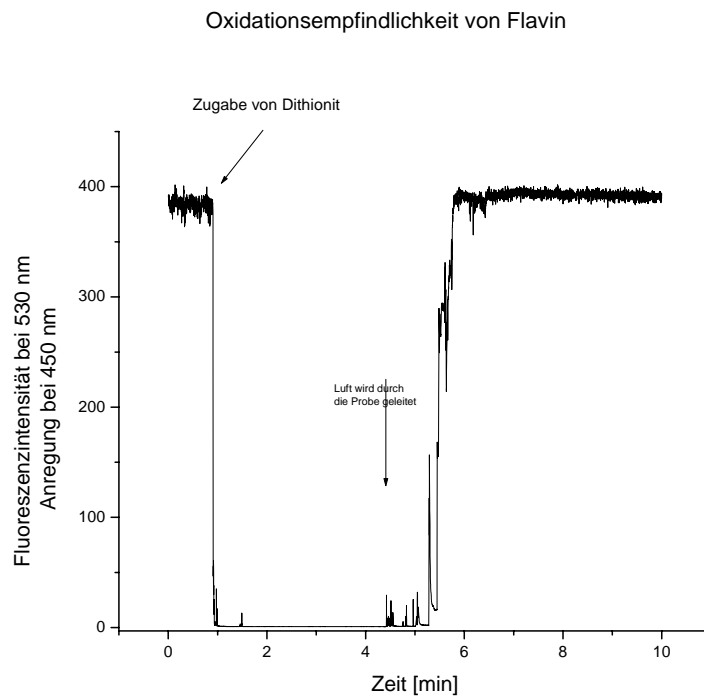


Abbildung 4.2.9: Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit. Anregung: 450 nm Detektion: 530 nm nach 1 min Zugabe von Natriumdithionit nach 4 min Durchleitung von Luft.

Der Vergleich von Glukoseoxidase mit dem Flavin-Adenosin-Dinukleotid zeigt, das die Absorptionsspektren oberhalb von 300 nm exakt übereinstimmen. Der einzige Unterschied ist die Proteinabsorption unterhalb 300 nm (Abb. 4.2.10).

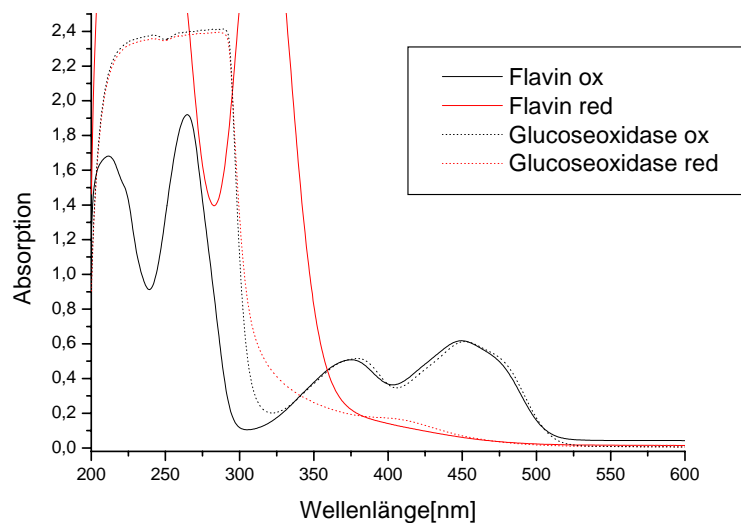


Abbildung 4.2.10: Vergleich der Absorptionsspektren von Flavin und Glukoseoxidase in der oxidierten und reduzierten Form

Durch Zugabe von Glukose zum Enzym wird das FAD reduziert, was sich in der Abnahme der Absorption bei 375 nm und 450 nm zeigt. Eine vollständige Reduktion ist aber nicht möglich. Erst durch Zugabe von Natriumdithionit kann die Absorption völlig unterdrückt werden.

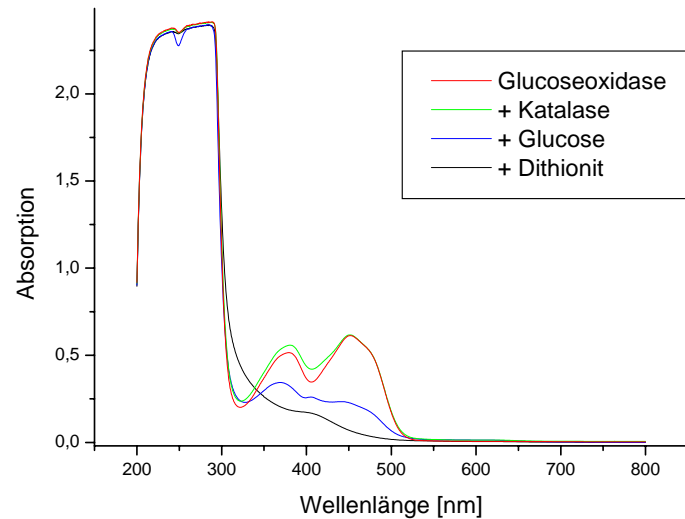


Abbildung 4.2.11: Vergleich der Absorptionsspektren von Glukoseoxidase mit verschiedenen Additiven

Das Fluoreszenzspektrum beider Verbindungen zeigt die gleiche Form der Kurve und einen gleich großen Stokes-Shift.

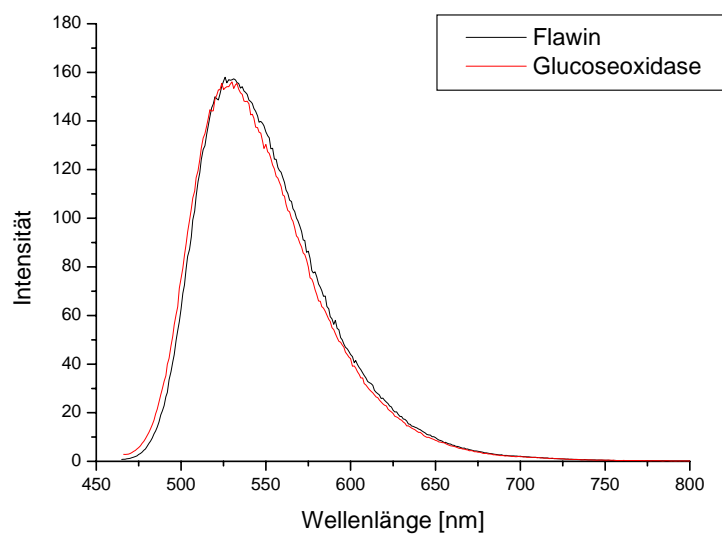


Abbildung 4.2.12: Vergleich der Fluoreszenzspektren von Flavin und Glukoseoxidase in der oxidierten und reduzierten Form

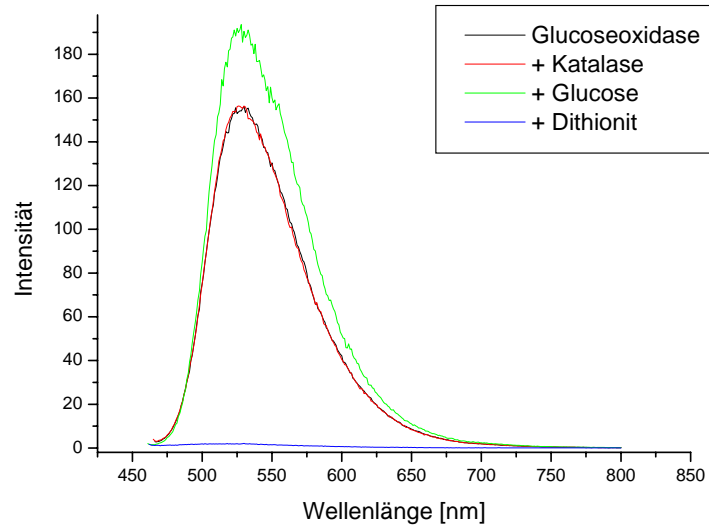


Abbildung 4.2.13: Fluoreszenz der Glukoseoxidase mit verschiedenen Additiven

Durch die Zugabe von Glukose steigt die Fluoreszenz an, obwohl die Glukoseoxidase verdünnt wird. Nach 45 Minuten kontinuierlicher Abnahme der Fluoreszenz nimmt diese wieder sprunghaft zu. Die Zugabe von weiterem Zucker kann den Fluoreszenzanstieg nicht aufhalten. Das Enzym ist nicht mehr stabil.

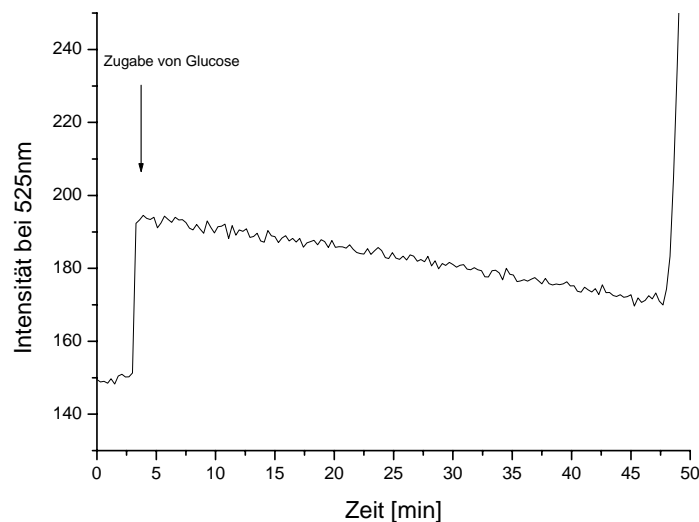


Abbildung 4.2.14: Zeitliche Änderung der Fluoreszenz der Glukoseoxidase, Anregung: 450 nm Detektion: 525 nm

Durch Zugabe von Natriumdithionit wird das Flavin in der Glukoseoxidase ebenfalls reduziert. Dies ist erstaunlich, da das Flavin im Innern des Enzyms lokalisiert ist und durch α -Helices abgeschirmt wird. Die Zugabe von Natriumdithionit inhibiert nicht die Enzymreaktion. Die Zugabe von Katalase ändert die Zeit bis zum Fluoreszenzanstieg nicht. Auch die Zugabe von Ascorbinsäure als Radikalfänger ändert nicht das Verhalten der Glukoseoxidase. Offensichtlich ist die Zerstörung der Glukoseoxidase durch das bei der Sauerstoffumsetzung gebildete Wasserstoffperoxid nicht der limitierende Schritt, denn dann müsste sowohl zusätzliche Katalase als auch Ascorbinsäure einen positiven Effekt haben. Auch der vollständige Umsatz des Zuckers kann nicht der Grund sein, da eine Zufuhr von weiterem Zucker keinen Einfluss hat. Der Anstieg der Fluoreszenz bei Zugabe von sowohl Zucker als auch Ascorbinsäure und die Verzögerung des Anstieges der Fluoreszenz bei einem erhöhten Glycerinanteil und der Zugabe von Tween 20 spricht für eine hydrophobe Wechselwirkung der Glukoseoxidasen untereinander, die zu einer Clusterbildung führt. Weshalb es zu einer Clusterbildung im Verlauf der Zeit kommt, ist nicht ganz klar.

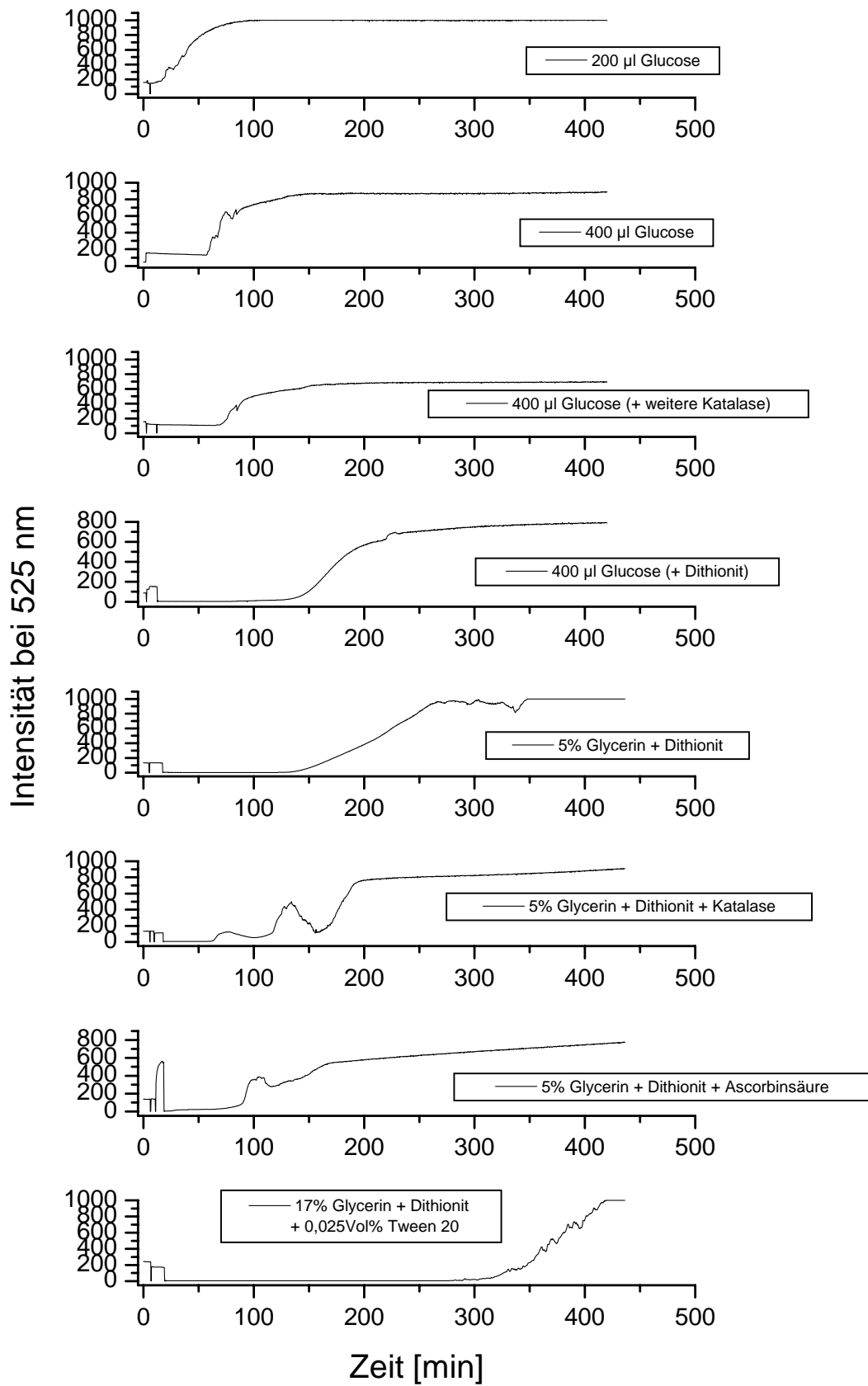


Abbildung 4.2.15: Vergleich der Änderung der Fluoreszenz im Verlauf der Zeit unter verschiedenen Bedingungen

Einzelmolekülmessungen bestätigen, dass die Glukoseoxidase im Verlauf der Zeit Cluster bildet.

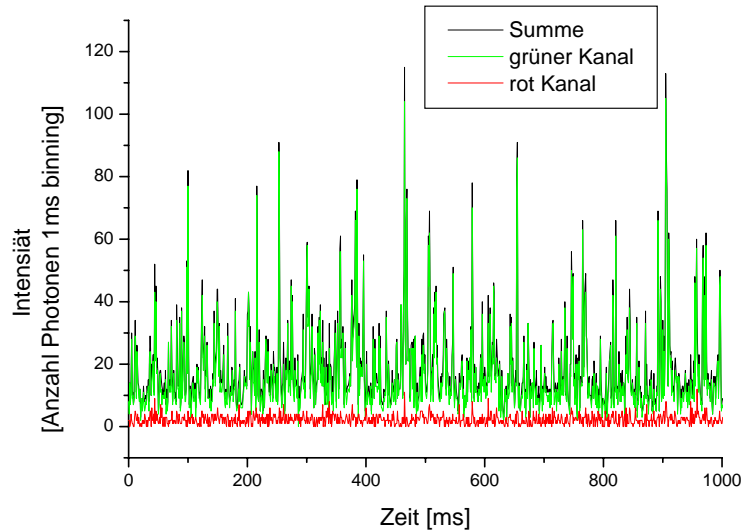


Abbildung 4.2.16: Einzelmolekülspur von Glukoseoxidase in Tris HCl – Puffer mit 25 mM KCl und 10 vol% Glycerin bei 100 μ W Anregungsleistung bei 532 nm

Obwohl die Absorption bei 532 nm sehr schlecht ist, sieht man einzelne Cluster durch den Fokus diffundieren.

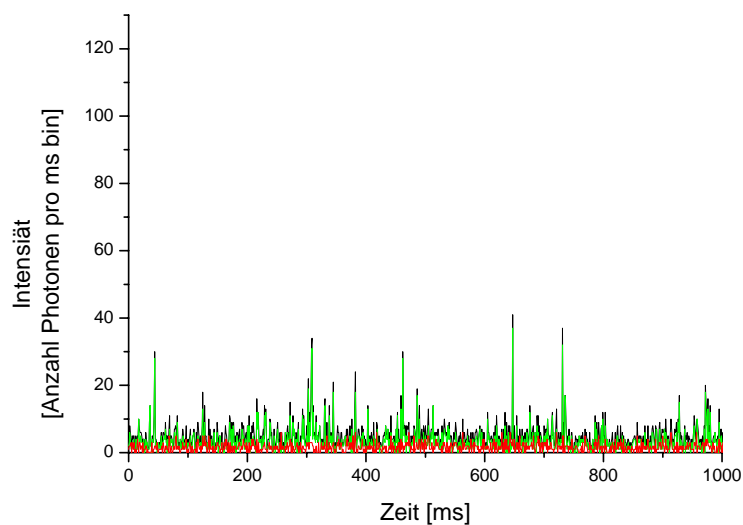


Abbildung 4.2.17: Einzelmolekülspur von Glukoseoxidase in Tris HCl – Puffer mit 25 mM KCl und 10 vol% Glycerin 40 μ l Dithionit bei 100 μ W Anregungsleistung nach 5 h

Eine Erwärmung des Enzyms auf 35°C bewirkt keinen Anstieg der Fluoreszenz. Im Gegenteil, die Aktivität der Glukoseoxidase wird erhöht, was eine Verringerung der Fluoreszenz zur Folge hat.

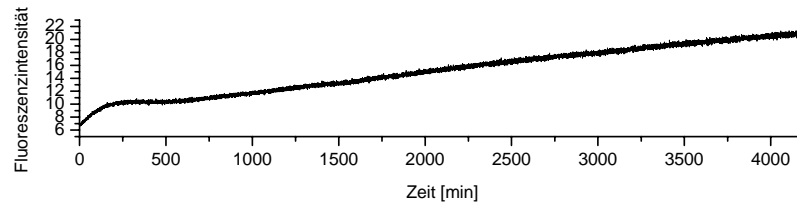


Abbildung 4.2.18: Fluoreszenz der Glukoseoxidase im Verlauf der Zeit bei 35 °C.

Die Messung der Quantenausbeute zeigt, weshalb die Glukoseoxidase so gute Signale ergibt. Die Quantenausbeute von Vitamin B2 beträgt bis zu 80 %.

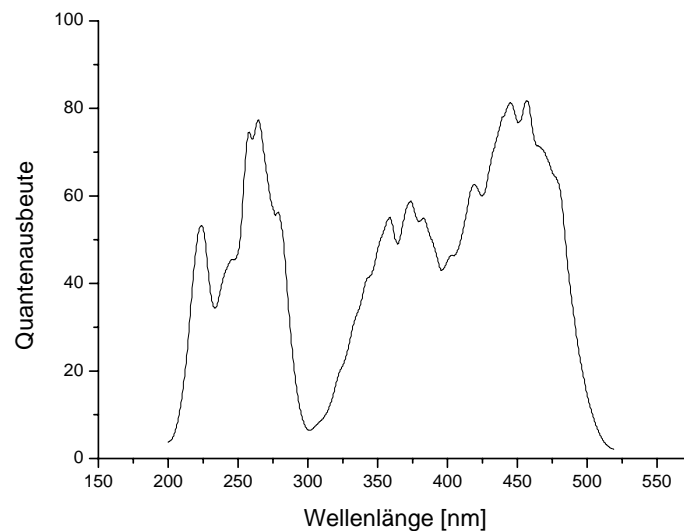


Abbildung 4.2.19: Quantenausbeute von Vitamin B2

Im Enzym ist diese Quantenausbeute niedriger. Dies liegt hauptsächlich daran, dass Flavin durch Tryptophan gequencht wird.

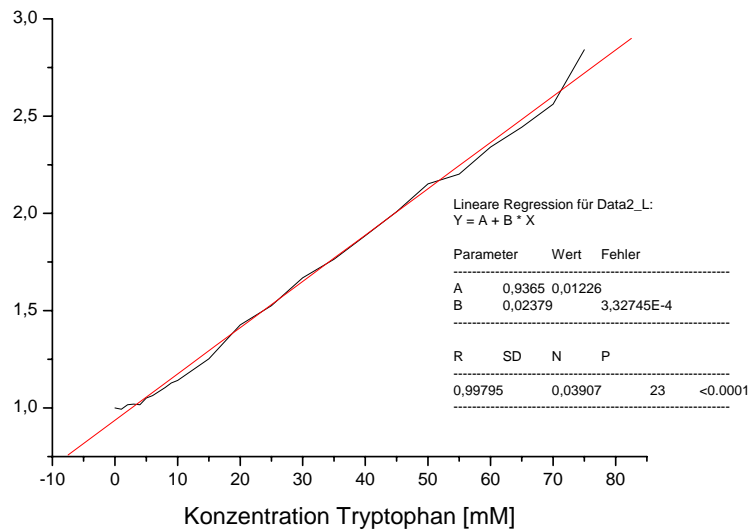


Abbildung 4.2.20: Stern -Volmer- Plot von Flavin-Adenosin-Dinucleotid mit Tryptophan

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nun klar ist, woher die Fluoreszenz der Glukoseoxidase stammt. Es ist keine Verunreinigung des Enzyms, sondern ein integraler Bestandteil, der für die Funktion des Enzyms unerlässlich ist. Des weitern ist nun klar, wie diese Fluoreszenz zu unterdrücken ist, indem das Coenzym Flavin-Adenosin-Dinucleotid durch das Reduktionsmittel Natriumdithionit in eine nicht fluoreszente Formt umwandelt wird, die zugleich katalytisch aktiv den Sauerstoff umsetzt. Dadurch ist die Nutzung der Glukoseoxidase für die Erhöhung der Photostabilität von Cy5 möglich.

4.3 Untersuchung des FRET-Hairpins auf Einzelmolekülebene

Wendet man die Technik der Glukoseoxidase auf die Oberflächen mit den immobilisierten FRET-Hairpins an, erhält man viele deutlich rot fluoreszierende Spots (Abb. 4.3.1). Die Oberfläche hat eine Größe von $10 \times 10 \mu\text{m}$ bei einer Auflösung von 50 nm/Pixel . Die Integrationszeit pro Pixel beträgt 1 ms und wird mit einem frequenzverdoppeltem Nd:YAG durchgeführt.

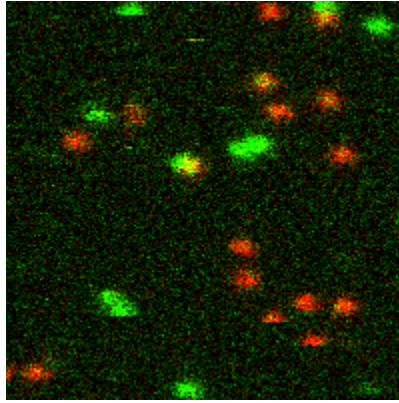


Abbildung 4.3.1: Auf BSA-Oberfläche immobilisierte FRET-Hairpins in Tris-Puffer 200 mM KCl, 10 x 10 μm , 50 nm/Pixel, 5 μW 532 nm

Das im Methodenteil beschriebene Verfahren zur Spoterkennung wird auf das Fluoreszenzbild (Abb. 4.3.1) angewendet. Für die Analyse dieses Bildes wurde jeder helle Spot verwertet, der mindestens einen Pixel mit mehr als 10 Photonen hat. Aus diesen Daten wird anschließend ein Histogramm über die Verteilung des F_2 -Wertes erzeugt. Für die Berechnung des F_2 -Wertes wird die Intensität aus Kanal 2 durch die Gesamtintensität geteilt. Damit ist der F_2 -Wert nichts anderes als die FRET-Effizienz. Das Histogramm zeigt deutlich einen hohen Anteil von Molekülen, die FRET zeigen. 70 % aller Moleküle haben einen F_2 -Wert der größer als 0,4 ist. Der Mittelwert des F_2 -Wertes der roten Spezies ist 0,73 und der Mittelwert der grünen Spezies 0,13.

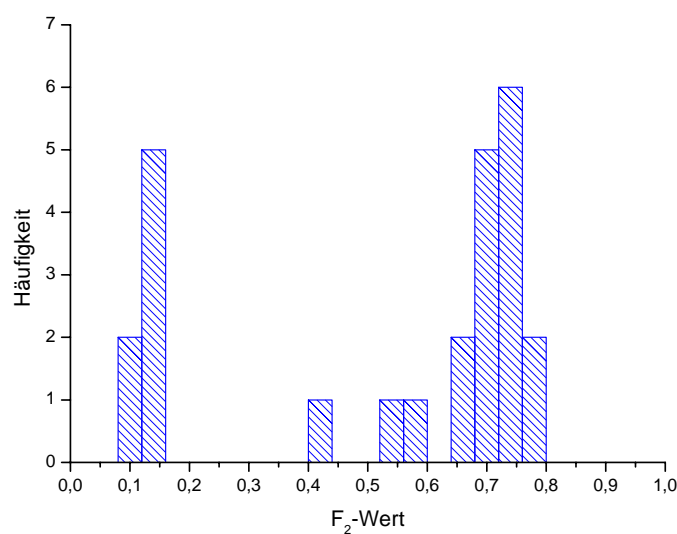


Abbildung 4.3.2: Histogramm der Häufigkeit des F_2 -Wertes der Oberfläche 4.3.1

Unter diesen Bedingungen, d.h. in Gegenwart von 200mM KCl, erwartet man, dass der DNA-Hairpin-Stamm so stabilisiert worden ist, dass keine Fluktuationen in der Konformation auftreten. Deshalb kann man davon ausgehen, dass der Peak um 0,13 aus der Photozerstörung des Akzeptors hervorgeht. In Bezug auf die 100%-ige Photozerstörung ohne die Glukoseoxidase ist, dies eine beachtliche Zunahme der Photostabilität.

Um aber auch langsamere Veränderungen der Fluoreszenz und damit die Konformation des Hairpins verfolgen zu können, werden nicht nur Oberflächen abgescannt, sondern man betrachtet die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Moleküls in Abhängigkeit von der Zeit. Dadurch erhält man eine Fluoreszenzintensitätsspur (Abb. 4.3.3):

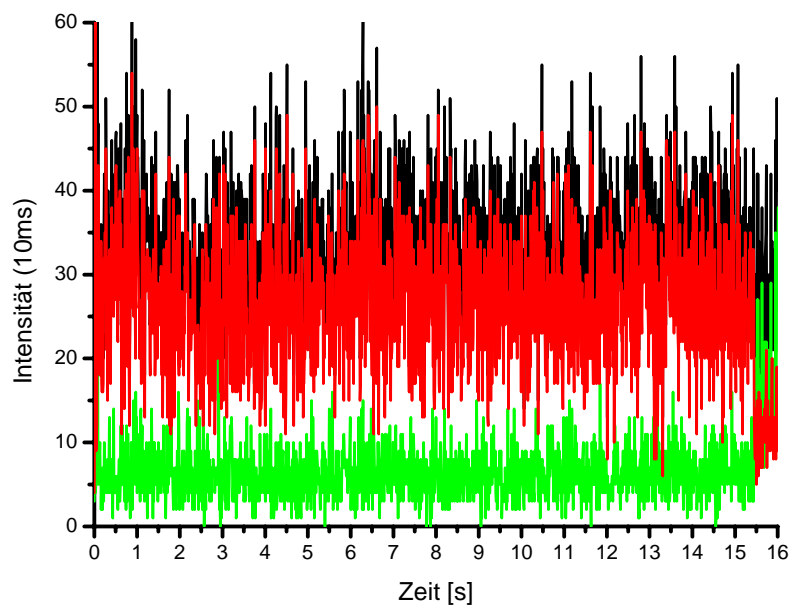


Abbildung 4.3.3: Einzelmolekülspur eines FRET-Hairpins in Tris Puffer 200 mM KCl 5 μ W, 532 nm 10 ms Binning, nach 15,5 Sekunden tritt die Photozerstörung des Akzeptors ein.

Man sieht, dass die rote Fluoreszenzintensität im Mittel 30 Photonen pro 10 ms (3 kHz) beträgt. Im grünen Kanal erhält man mit 7 - 8 Photonen deutlich weniger Signal. Daraus lässt sich ein F_2 -Wert von 0,8 berechnen. Das ist ein deutlich höherer Wert als der aus der Oberfläche bestimmte. Dies liegt daran, dass beim „Spotpicken“ sehr viele Pixel eine niedrige Fluoreszenzintensität haben und nur wenige Pixel im Zentrum eine annähernd gleiche Fluoreszenzintensität aufweisen. Dadurch wird das

Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis schlechter und der F_2 -Wert sinkt. Der F_2 -Wert von 0,8 ist jetzt exakt der gleiche Wert, der aus den Ensemble-Daten bestimmt wurde.

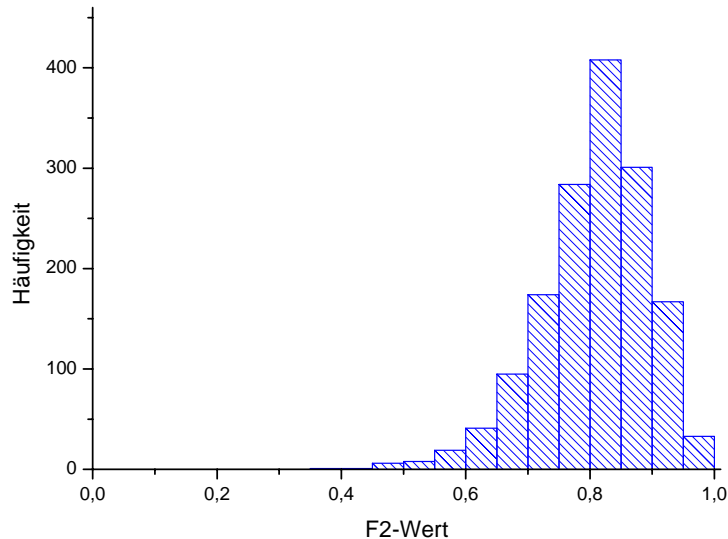


Abbildung 4.3.4: Histogramm der Häufigkeit des F_2 -Wertes der Spur 4.3.3

Histogrammiert man die F_2 -Werte, erhält man wieder eine Verteilung. Eine zweite Spezies ist nicht zu erkennen. F_2 -Wert Histogramme von reinen Farbstoffen sehen ähnlich aus. Fluktuationen sind also nicht im Histogramm erkennbar. Entweder hat man ein starres System oder die Fluktuationen finden im Submillisekundenbereich statt und werden dadurch bei der verwendeten Integrationszeit von 10 ms herausgemittelt. Aus diesem Grund werden die Fluoreszenzintensitätsspuren im FiFO-Mode aufgenommen. Dadurch hat man nicht nur die Möglichkeit die Spuren zu generieren, sondern auch andere Analysemethoden wie die Autokorrelation (FCS) auf die Daten anzuwenden (Abb. 4.3.5). Wallace *et al.* haben hierbei Fluktuationen für DNA-Hairpins in Lösung im Mikrosekundenbereich gefunden [Wallace 2001]. Durch FCS ist es möglich, diese aus den Spuren sichtbar zu machen. Findet man ähnliche Fluktuationen, ist dies ein Hinweis, dass Oberflächenwechselwirkungen die Funktionsweise eines DNA – Hairpins nicht beeinträchtigen.

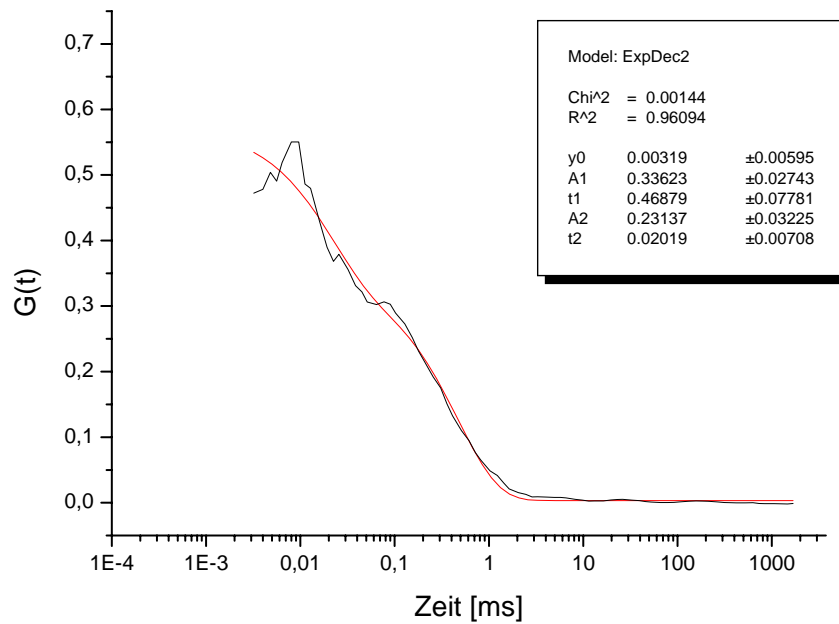


Abbildung 4.3.5: Autokorrelation der Spur 4.3.3

Die Autokorrelation in Abbildung 4.3.5 zeigt, dass im Millisekundenbereich keine Fluktuationsänderungen stattfinden. Der Fit der Daten zeigt zwei verschiedene Fluktuationen bei 450 μs und bei 20 μs . Eine Aussage über die Art der Änderung gibt die Autokorrelation nicht. Daher ist die Ursache unklar und es kann nur darüber spekuliert werden. Auch ist unklar, ob es sich nur um die beiden verschiedenen Fluktuationen handelt, die für den Fit angenommen werden, oder ob es noch andere Veränderungen mit verschiedenen Ursachen gibt, die aber aufgrund der wenigen Photonen innerhalb einer Spur nicht sicher aufgelöst werden können. Klar ist nur, dass eine Fluktuation der FRET – Effizienz im hohen μs Bereich stattfindet.

Wird die Öffnungs- und Schließungskinetik des Hairpins in diesen Fluktuationen wiedergegeben? Um diese Frage zu beantworten, muss man die Stabilität des Hairpins verringern. Dies kann man auf verschiedene Weisen machen. Man kann die Temperatur erhöhen, denaturierende Substanzen zugeben oder die Ionenstärke verringern. Um diesen Effekt auf den Hairpin genauer zu verstehen, wird eine Schmelzkurve des Hairpins unter zwei verschiedenen Bedingungen gemessen. Einmal wird der Schmelzpunkt in reinem Tris-Puffer bestimmt und zum anderen mit zusätzlich 200mM Kaliumchlorid (Abb. 4.3.6).

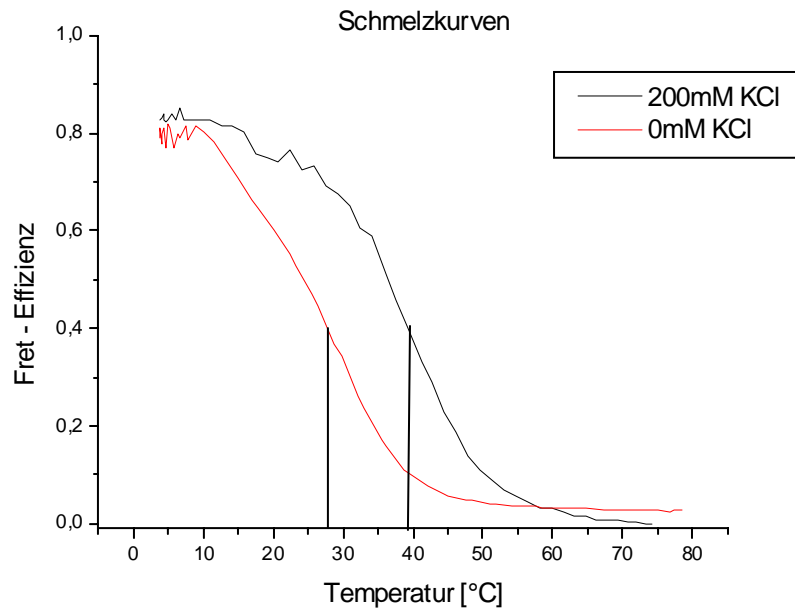


Abbildung 4.3.6: Schmelzkurven des FRET-Hairpins in Hochsalz und Niedersalz

Deutlich ist der Unterschied in den Schmelztemperaturen zu sehen. Einmal liegt er bei 28 °C und mit 200 mM KCL um 10 °C höher bei 38 °C. Setzt man die Salzkonzentration herab, sollten vermehrt Fluktuationen aufgrund der Öffnung und Schließung des Hairpins auftreten.

Die in Abbildung 4.3.7 dargestellte Oberfläche zeigt einen 10 x 10 µm Scan immobilisierter DNA-Hairpins unter Niedersalzbedingungen mit einer Auflösung von 50 nm. Die Integrationszeit ist 1 ms bei 5 µW Anregungsleistung bei 532 nm. Deutlich sind mehrere Spots zu sehen, die rot gefärbt sind, d.h. eine hohe FRET-Effizienz aufzeigen.

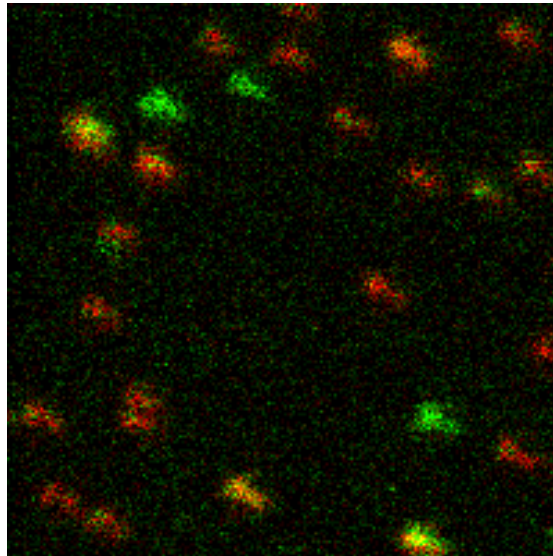


Abbildung 4.3.7: Immobilisierte Hairpins in Tris-Puffer, 10 x 10 μm , 50 nm/Pixel, 5 μW , 532 nm, 1 ms Integrationszeit pro Pixel

Betrachtet man sich einige Spots genauer, so sieht man, dass immer wieder einzelne Pixel keinen FRET zeigen. Meistens hat man mehrere rote Pixel und dann ein, zwei manchmal bis zu 10 Pixel rein grüne Fluoreszenz. Offensichtlich ändert sich die Konformation langsam im Verlauf der Zeit.

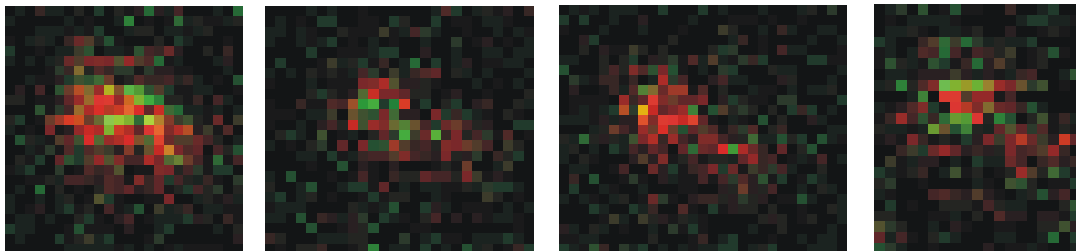


Abbildung 4.3.8: Immobilisierter Hairpin in Tris-Puffer, 10 x 10 μm , 50nm/Pixel, 5 μW , 532nm, 1ms Integrationszeit pro Pixel

Analysiert man die Spots mit Hilfe von einem F_2 -Wert-Histogramm, so erhält man wieder deutlich zwei verschiedene Spezies mit einem F_2 -Wert von 0,66 und 0,14.

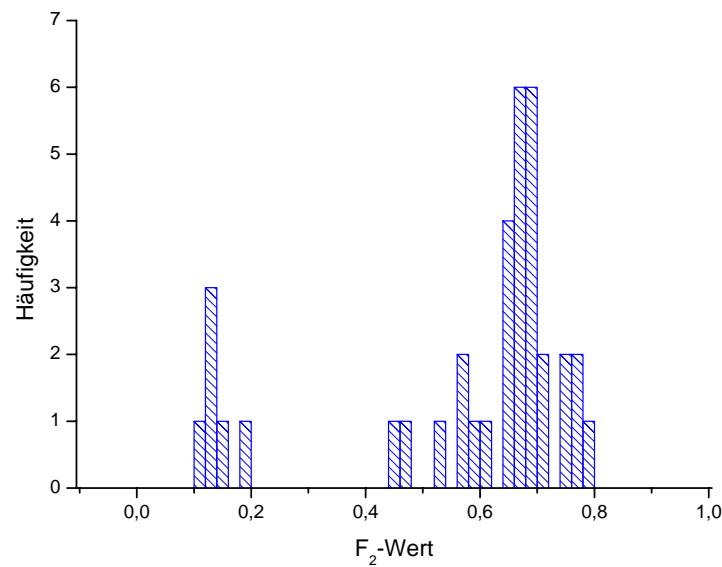


Abbildung 4.3.9: Histogramm der Häufigkeit der F₂-Verteilung der Oberfläche von Abb. 4.3.7

Im Vergleich zur Oberfläche mit 200 mM KCl ist das Maximum des Peaks um 0,66 leicht grün verschoben (0,1) und asymmetrisch verbreitert. Diese Verschiebung deutet an, dass die Stabilität des Hairpins deutlich verringert ist und das Öffnen und Schließen des Systems erheblich öfter zu beobachten ist. Der Peak bei 0,13 bleibt unverändert und repräsentiert die Moleküle, die nur einen Donor besitzen bzw. die schnelle Photozerstörung des Akzeptors.

Auch ohne Anwesenheit von Kaliumchlorid im Medium werden Spuren aufgenommen um konformative Änderungen im Verlauf der Zeit verfolgen zu können (Abb. 4.3.10).

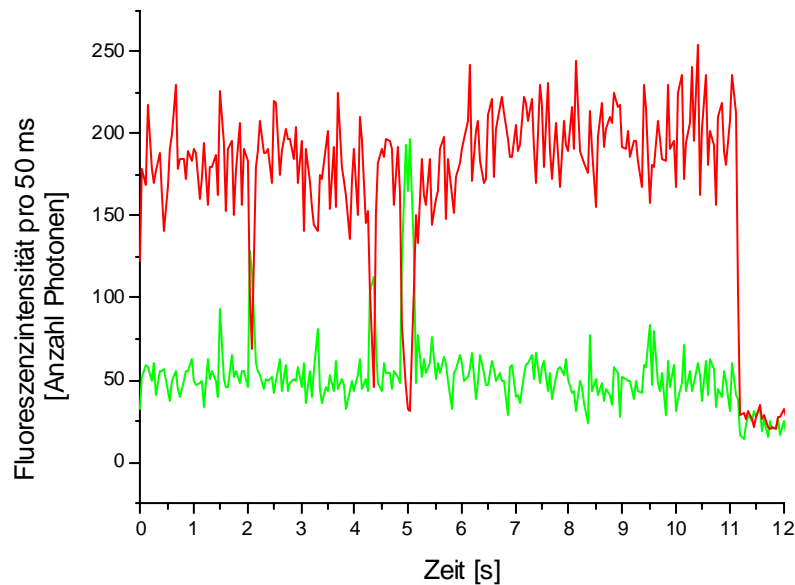


Abbildung 4.3.10: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität des Donors Cy3 und Akzeptors Cy5 im FRET-Hairpin in Tris-Puffer, 10 ms Binning, 5 μ W Anregungsleistung, 532nm

Am Anfang zeigt die Spur einen hohen FRET, d.h. der Hairpin ist geschlossen. Nach 2 s ändert sich die FRET – Effizienz, was auf eine Öffnung des Hairpins hinweist. Nach weiteren 2,5 Sekunden ändert sich die Konformation wieder und der Hairpin wird zum zweiten Mal für 0,1 s geöffnet. Nach weiteren 0,75 s öffnet sich der Hairpin zum dritten Mal. Diesmal für 0,2 s. Nach insgesamt 11 s wird der Donor photozerstört, da anschließend keine Donorfluoreszenz vorhanden ist. Um sicher zu gehen, dass der Farbstoff wirklich gebleicht worden ist, wird die Spur noch weitere 40s beobachtet (Nicht in der Grafik dargestellt).

Die meisten Spuren zeigen kurze Phasen des geöffneten Hairpins. Einige wenige zeigen jedoch auch längere Phasen, in denen die FRET-Effizienz gering, d.h. der Abstand zwischen den Farbstoffen groß ist (Abb. 4.3.10).

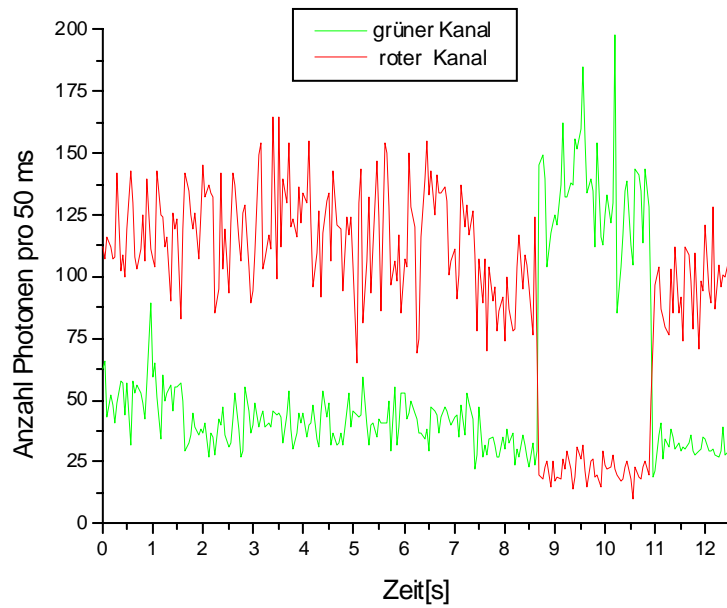


Abbildung 4.3.11: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität zweier Wellenlängenbereiche von FRET-Hairpin in Tris-Puffer, 10 ms Binning, 5 μ W Anregungsleistung, 532nm

Am Anfang zeigt die Spur einen hohen FRET. Nach 8,5 s ändert sich dies abrupt in einen Zustand, der keinen FRET mehr aufweist – der Hairpin ist geöffnet. Nach weiteren 2,5 Sekunden wechselt der Hairpin wieder zurück in seinen ursprünglichen Zustand mit einer hohen FRET-Effizienz.

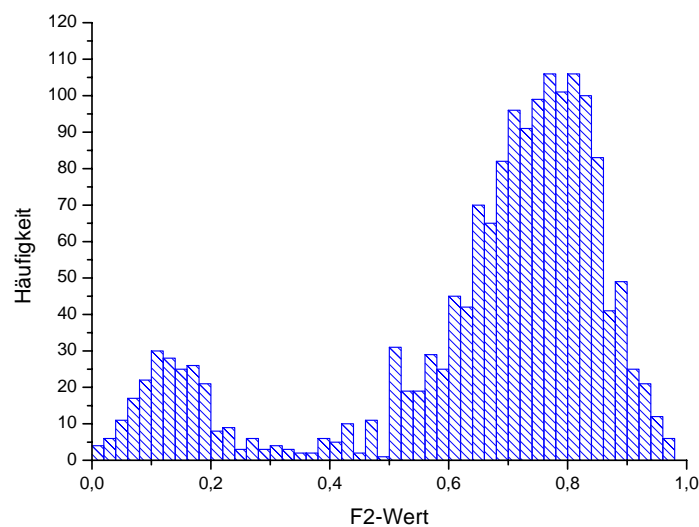


Abbildung 4.3.12: Histogramm der Häufigkeit des F_2 -Wertes aus Spur 4.3.11

Auch das F_2 – Wert Histogramm verdeutlicht diese beiden Zustände. Das Histogramm enthält zwei Peaks bei 0,75 und bei 0,15, d.h. eine rein rote und rein grüne Spezies. Die Abweichung der Werte von diesen beiden Maxima ist sehr gering.

Histogrammiert man die Zeiten, in denen der Hairpin geschlossen ist, also einen hohen FRET – Anteil aufweist, aus 390 Spuren, erhält man das Histogramm aus Abb. 4.3.13. Es zeigt die Kinetik des Öffnens des Hairpins.

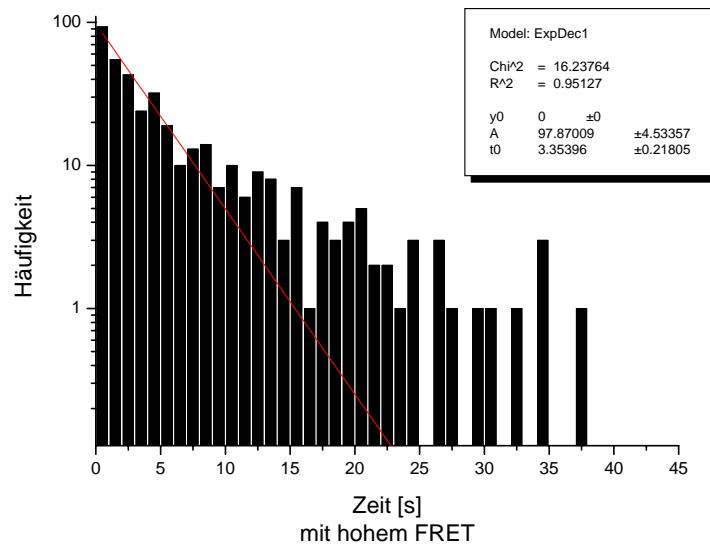


Abbildung 4.3.13: Histogramm der Häufigkeit der Zeiten indem der FRET-Hairpin geschlossen ist.

Für eine solche Kinetik erwartet man einen monoexponentiellen Abfall. Tatsächlich sieht die Kurve eher nach einem bi- oder multiexponentiellen Abfall aus. Wie kommt dieser Abfall zu stande? Die Spuren zeigen eine hohe FRET-Effizienz. Es kommt zur Öffnung des Hairpins und dadurch zu niedriger FRET-Effizienz, der Hairpin schließt sich wieder und man hat eine hohe FRET-Effizienz. Diese Phase wird aber jetzt durch die Photozerstörung beendet und nicht durch das Öffnen des Hairpins. Der Hairpin ist immer noch geschlossen. Nimmt man diese Zeiten aus der Statistik heraus, verändert sich das Histogramm erheblich (Abb. 4.3.14).

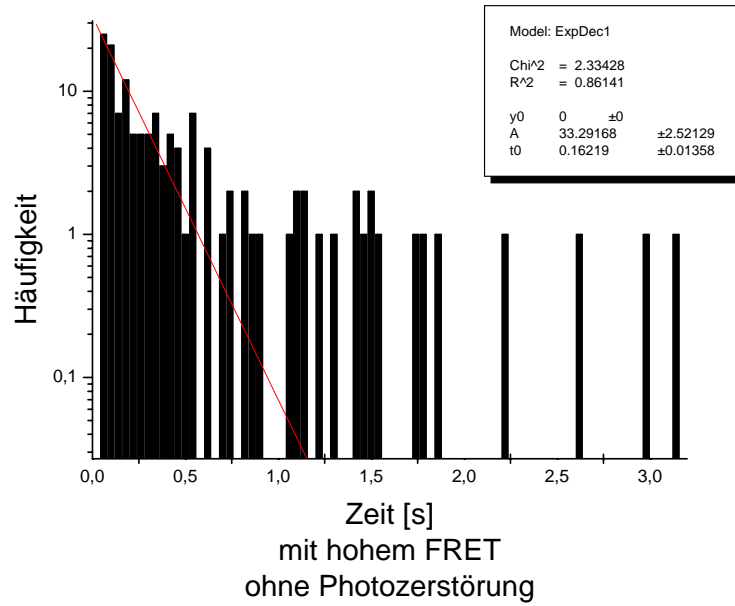


Abbildung 4.3.14: Histogramm der Häufigkeit der Zeiten, in denen der FRET-Hairpin geschlossen ist ohne Photozerstörung.

Betrachtet man das Histogramm für die Zeiten des geschlossenen Hairpins ohne Photozerstörung, so nimmt die Steigung der Verteilung ab, obwohl der Prozess der Photozerstörung eine Verkürzung der Zeiten zur Folge hat. Darüber hinaus zeigt die Kurve kein exponentielles Verhalten. Lange Zeiten, in denen der Hairpin geschlossen ist, sind überproportional vertreten.

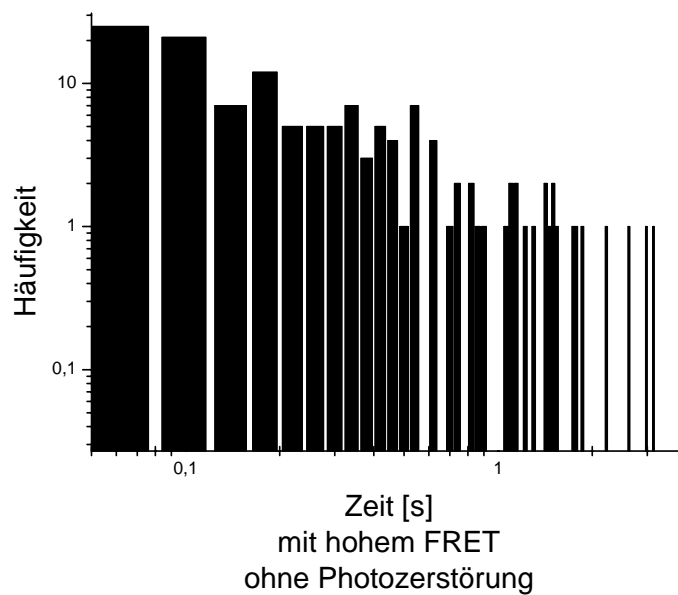


Abbildung 4.3.15: Histogramm der Häufigkeit der Zeiten, in denen der FRET-Hairpin geschlossen ist.

D.h. man hat keine konstante Geschwindigkeitskonstante, sondern eine exponentielle Verteilung dieser Konstante. Dies ist nicht real, vor allem da die meisten Spuren keine Fluktuationen zeigen, sondern die ganze Zeit geschlossen sind. Deshalb ist die Photozerstörung der limitierende Faktor. Die Verteilung enthält auch die Zeiten zwischen Start der Messung und dem Konformationswechsel. Beim Start der Messung muss der Hairpin nicht unbedingt in offenem Zustand vorliegen. Dieser willkürliche Start zusammen mit dem Konformationswechsel erklärt die Verteilung im Histogramm. Eliminiert man auch diese Werte, so erhält man eine nahezu leere Menge, aus der man keine Geschwindigkeitskonstante bestimmen kann. Da die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung offensichtlich kleiner ist als die Geschwindigkeitskonstante der Öffnung des Hairpins kann man eine untere Grenze der Öffnung des Hairpins festlegen.

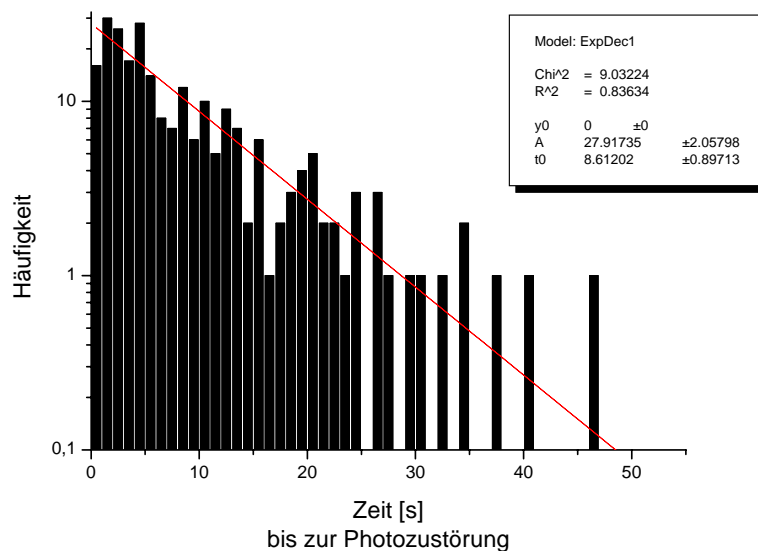


Abbildung 4.3.16: Histogramm der Häufigkeit der Zeiten bis zur Photozerstörung des Akzeptors

Für die Photozerstörung erhält man einen Wert von $k = 8,6 \text{ } 1/\text{s}$. Erstellt man das gleiche Histogramm für den geöffneten Hairpin, entfallen die o.a. Probleme, da diese Zeiten wesentlich kürzer sind.

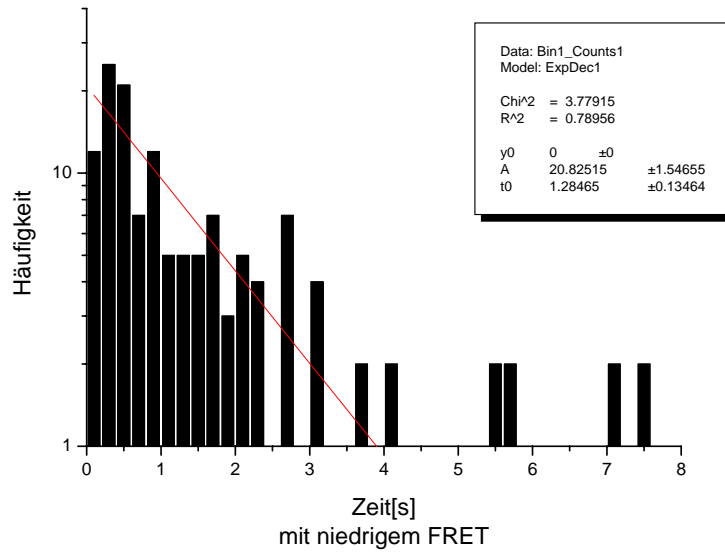


Abbildung 4.3.17: Histogramm der Häufigkeit der Zeiten, in denen der FRET-Hairpin geöffnet ist

Als Geschwindigkeitskonstante für die Schließung des Hairpins erhält man $k^* = 1,3 \pm 0,13 \text{ } ^1/\text{s}$. Mit Hilfe der Gleichgewichtskonstante aus der Schmelzkurve lässt sich die Geschwindigkeitskonstante der Öffnung des Hairpins berechnen.

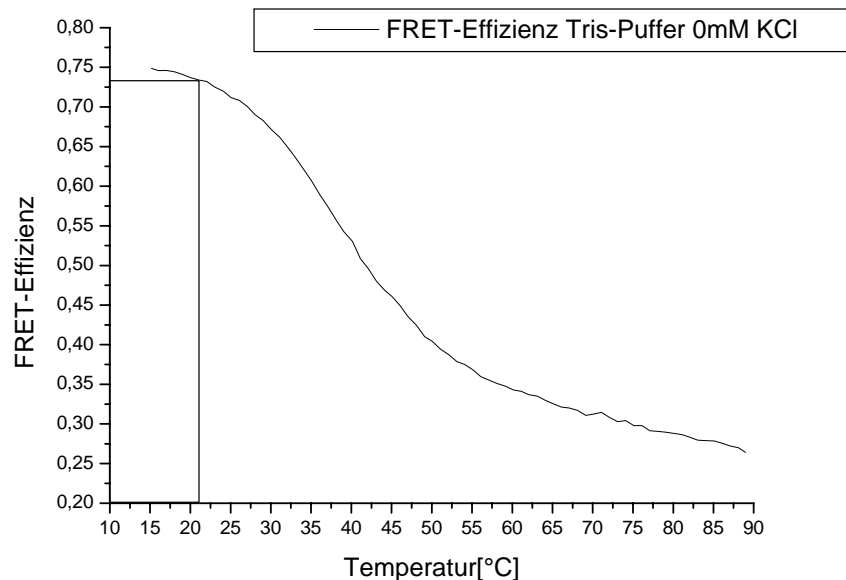


Abbildung 4.3.18: Schmelzkurve des FRET-Hairpins

Die Messungen werden bei ~ 22 °C durchgeführt. Die Schmelzkurve ergibt eine durchschnittliche FRET-Effizienz von 0,73. Betrachtet man die FRET – Effizienzen bei 15 °C und 90 °C, so lässt sich der Anteil des geöffneten Hairpins herausrechnen.

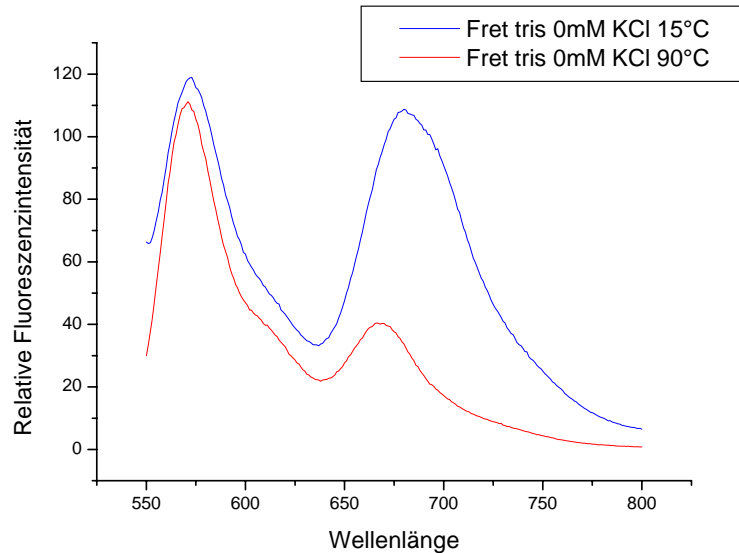


Abbildung 4.3.19: Fluoreszenzspektrn des geöffneten und geschlossenen Hairpins

Im geschlossenen Zustand hat man eine FRET-Effizienz von 0,79. Der geöffnete Hairpin zeigt eine FRET-Effizienz von 0,26. Der Anteil der geschlossen a und der Anteil der offen b berechnet sich nach

$$a * 0,79 + b * 0,267 = 0,73$$

$$a + b = 1$$

$$\Rightarrow a * 0,79 + (1 - a) * 0,26 = 0,73 \quad \text{[Formel 4.3.20]}$$

$$0,53a = 0,47$$

$$a = 0,89$$

$$b = 0,11$$

D.h. der Hairpin ist unter diesen Bedingungen zu 89% geschlossen und zu 11% geöffnet. Daraus lässt sich nun die Gleichgewichtskonstante berechnen:

$$K = \frac{[\text{Produkte}]}{[\text{Edukte}]} = \frac{[\text{Hairpin}_{\text{offen}}]}{[\text{Hairpin}_{\text{geschlossen}}]} = \frac{0,11}{0,89} = 0,12 \quad \text{[Formel 4.3.21]}$$

Aus der Gleichgewichtskonstante und der Schließungskinetik kann man jetzt die Geschwindigkeitskonstante der Öffnung des Hairpins berechnen.

$$K = \frac{k_{rück}}{k_{hin}} \quad [Formel 4.3.22]$$
$$\Rightarrow \frac{k_{rück}}{K} = k_{hin} = \frac{1,3 \frac{1}{s}}{0,12} = 10,8 \frac{1}{s}$$

Eine andere Möglichkeit den Hairpin zu öffnen, besteht in der Zugabe der komplementären Gegensequenz. Die in Abbildung 4.3.23 dargestellte Oberfläche zeigt einen 10 x 10 µm Scan mit einer Auflösung von 50 nm. Die Integrationszeit beträgt 1 ms bei einer mittleren Anregungsleistung von 5 µW bei 532 nm.

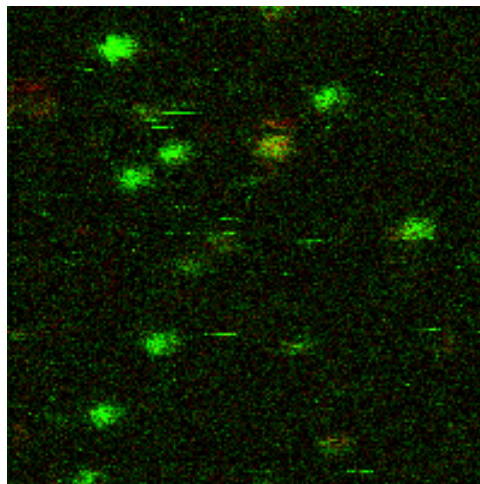


Abbildung 4.3.23: Immobilisierter FRET-Hairpin mit Gegensequenz geöffnet, 200 x 200 Pixel, 50nm/Pixel, 5µW, 532 nm

Dabei ist deutlich zu sehen, dass nur noch der Donor leuchtet. Es findet aufgrund der räumlichen Trennung kein Energietransfer zum Akzeptor statt (Abb. 4.3.23).

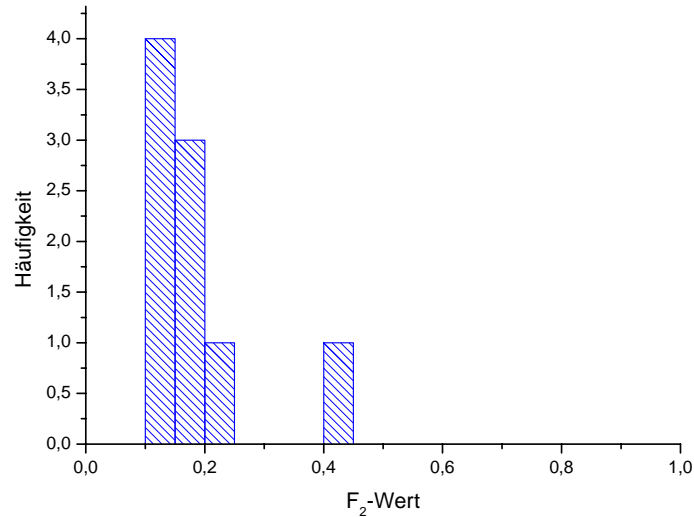


Abbildung 4.3.24: Histogramm der Häufigkeit des F_2 -Wertes aus Oberfläche 4.3.19

Zur genaueren Analyse wurden die Spots wieder auf der Oberfläche durch das Analyseprogramm bestimmt und das Ergebnis im Histogramm dargestellt (Abb. 4.3.24). Die Verteilung des F_2 -Wertes zeigt das Vorhandensein einer Spezies mit einem F_2 -Wert von 0,1. Dieser geringe Wert zeigt, dass die beiden Farbstoffe so weit auseinander liegen, dass es kaum noch zu einem Energieübertrag kommt. Auch wenn man längere Zeit auf einem Spot verweilt, ändert sich die FRET-Effizienz nicht (Abb. 4.3.25).

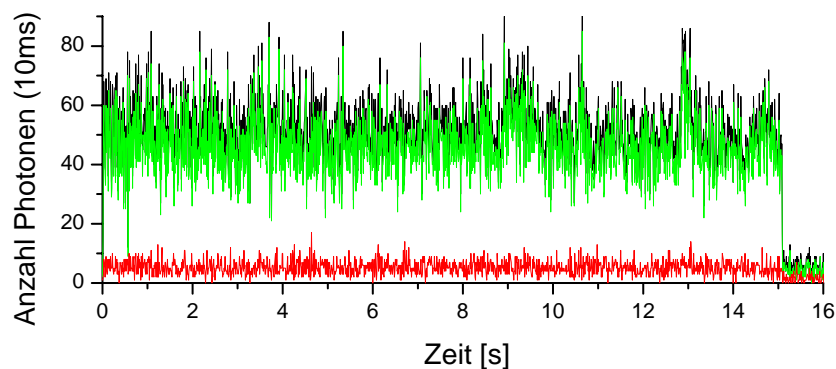


Abbildung 4.3.25: Zeitliche Änderung der Fluoreszenz des FRET-Hairpins mit Gegensequenz, 200 x 200 Pixel, 50nm/Pixel, 5 μ W, 532nm

Der Hairpin ist und bleibt die ganze Zeit offen bis zur Photozerstörung nach 15 s. Auch Waschen der Oberfläche und Inkubation für 72 h in reinem Tris-Puffer zeigen

anschließend das gleiche Resultat. Das Histogramm zeigt eine enge Verteilung der FRET-Effizienz um die 0,1 (Abb. 4.3.26).

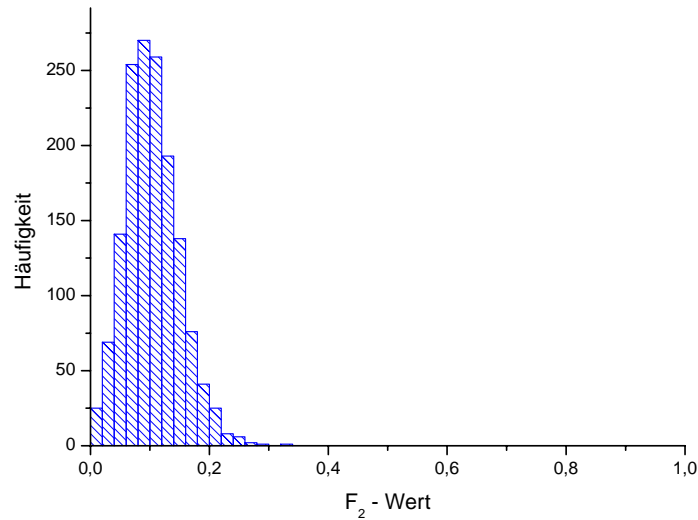


Abbildung 4.3.26: Histogramm der Häufigkeit der FRET-Effizienz aus Spur 4.3.25

Die Autokorrelation der Daten aus Abb. 4.3.25 zeigt auch im hybridisierten Zustand eine Fluktuationsdynamik im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich (Abb. 4.3.21), die nicht auf das Öffnen bzw. Schließen des Hairpins zurückzuführen ist.

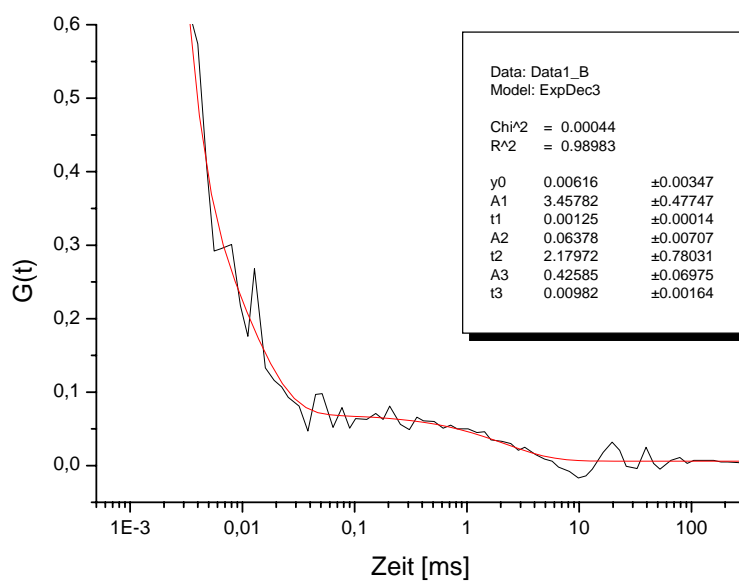


Abbildung 4.3.27: Autokorrelation der Spur 4.3.25

4.4 PET - Hairpins

Die erhaltenen Daten wurden in einem 2. Schritt mit denen des Elektron-Transfer-Hairpins verglichen.

Auch diese Art von Hairpins besteht aus einem Stamm und einem Loop. An einem Ende des Stammes ist der Farbstoff MR 121 am 5'-Ende lokalisiert, der durch die Guanosine im gegenüberliegenden Strang gelöscht wird. An dem anderen Ende schließt sich der Loop an den Stamm an, der, wie der FRET-Hairpin, aus 12 Thymidinen besteht.

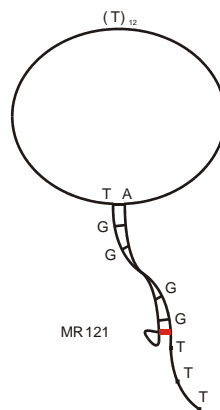


Abbildung 4.4.1: Aufbau des PET-Hairpins

Auch dieser Hairpin trägt am 3'-Ende ein Biotin zur Verankerung auf der Oberfläche, der über einen Thymin-Linker mit dem Hairpin verbunden ist.

Der Hairpin wird wie die FRET-Hairpins in Tris-Puffer mit 200 mM KCl vermessen (Abb. 4.4.2). Das Bild hat eine Größe von 400 x 400 Pixel mit einer Auflösung von 50 nm/Pixel. Die Integrationszeit pro Pixel beträgt 7 ms.

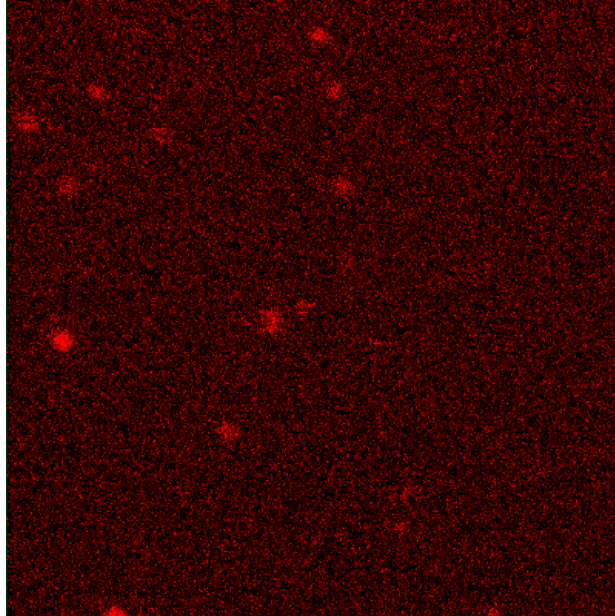


Abbildung 4.4.2: Immobilisierter PET-Hairpin in Tris-Puffer 200mM KCl, 10 x 10 μm , 200 Pixel, 5 μW , 635nm

Obwohl die Fluoreszenz gequencht ist, sieht man noch Spots von einzelnen Molekülen. Inhomogenitäten, vor allem zwischen verschiedenen Molekülen, aber auch im Molekül selbst sind zu erkennen. Betrachtet man einzelne Moleküle genauer, so sieht man sehr helle rote Pixel und manchmal sehr dunkle Pixel. Die Grenzen zwischen Molekül und Oberfläche verwischen. Das System ist darauf optimiert worden im geschlossenen Zustand nicht zu leuchten.

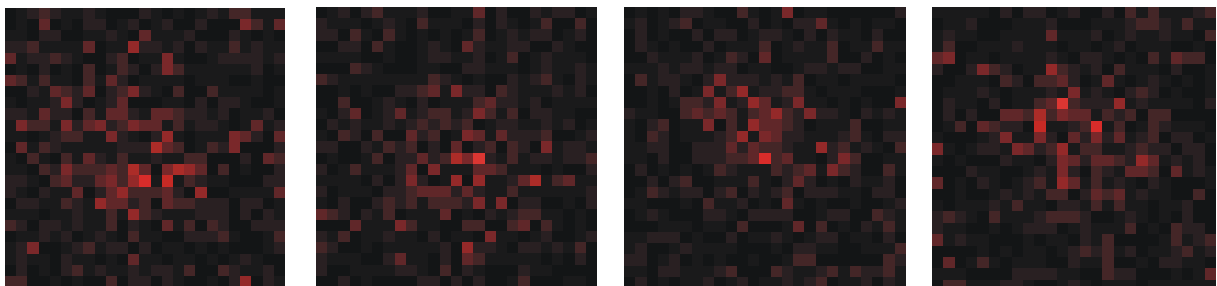


Abbildung 4.4.3: Immobilisierter PET-Hairpin in Tris-Puffer 200mM KCl, 10 x 10 μm , 200 Pixel, 5 μW , 635nm

Die statistische Auswertung der Oberfläche zeigt eine mittlere Fluoreszenzintensität von 400 Photonen pro Spot (Abb. 4.4.4).

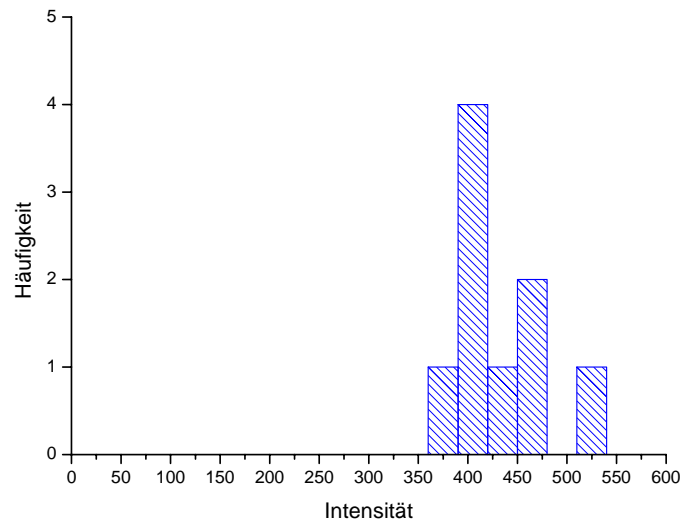


Abbildung 4.4.4: Spot – integrierte Photonenzahl des PET-Hairpins

Die Analyse weiterer Oberflächen zeigt, dass die Verteilung zu größeren Intensitäten hin stark verbreitert ist, d.h. dass nicht nur eine Mittelung über 1 ms in jedem Pixel zu kurz ist alle Fluktuationen herauszumitteln, sondern auch dass die Messzeit eines Spots von einigen Sekunden zu kurz für eine Herausmittlung ist.

Die Fluoreszenzlebensdauer liegt bei 1,75 ns und weist, mit Ausnahme eines Wertes, eine schmale Verteilung auf (Abb. 4.4.5).

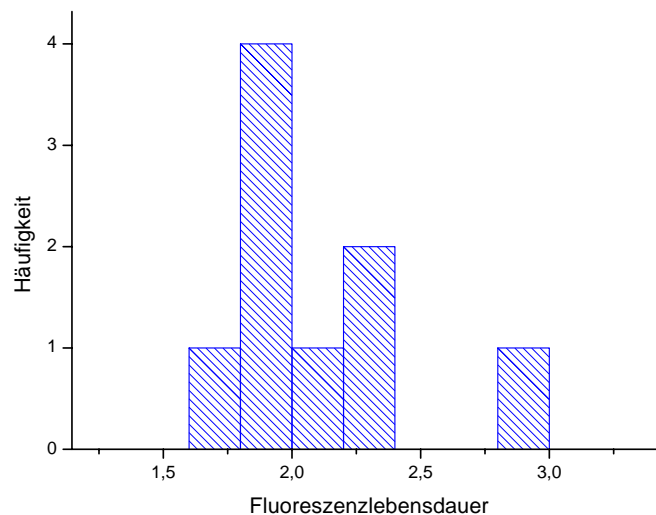


Abbildung 4.4.5: Häufigkeit der Fluoreszenzlebensdauer des PET-Hairpins

Betrachtet man die Fluoreszenz im Verlauf der Zeit, so sieht man, dass diese sich stark ändert (Abb. 4.4.6).

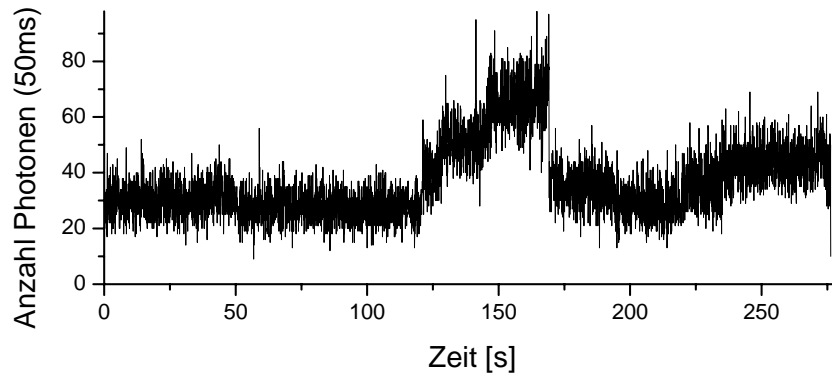


Abbildung 4.4.6: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität des PET-Hairpins

Die Spur in Abb. 4.4.6 zeigt mindestens 9 verschiedene Intensitätslevels. Nach 50 s erscheint der 1. Wechsel der Intensität. Die Spur zeigt ein leicht verstärktes Quenchverhalten. Nach weiteren 70 s kommt es zum 2. Wechsel der Fluoreszenzintensität. Dieser Zustand dauert nicht lange, denn nach 8 Sekunden erhöht sich die Fluoreszenzintensität noch zwei Mal in kurzem Abstand und erreicht ihr Maximum, das mehr als doppelt so groß ist wie die minimale Fluoreszenzintensität.

So starke und vor allem so viele Fluktuationen sind nicht erwartet worden und machen eine genaue Auswertung der Daten schwierig.

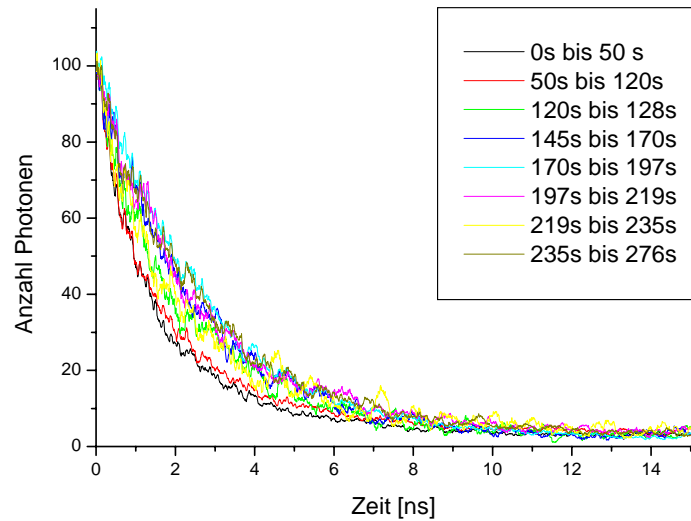


Abbildung 4.4.7: Fluoreszenzabklingkurven der einzelnen Intensitätslevels des PET-Hairpins

Klar ist nur, dass die im Ensemble gemessenen Lebensdauern nur Mittelwerte aus verschiedenen Lebensdauern sind, die aber so dicht beieinander liegen, dass sie nicht aufgelöst werden können.

Die einzelnen Intensitätsabschnitte unterliegen einer starken Fluktuation.

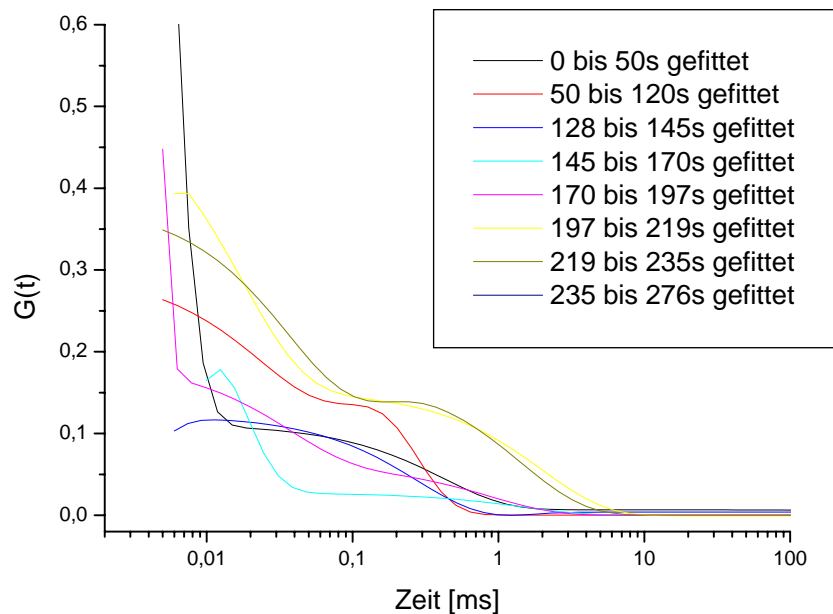


Abbildung 4.4.8: Autokorrelation der einzelnen Intensitätslevels des PET-Hairpins

Die Autokorrelation der einzelnen Bereiche (Abb. 4.4.8) zeigt Fluktuationen im Millisekunden- bis Mikrosekundenbereich.

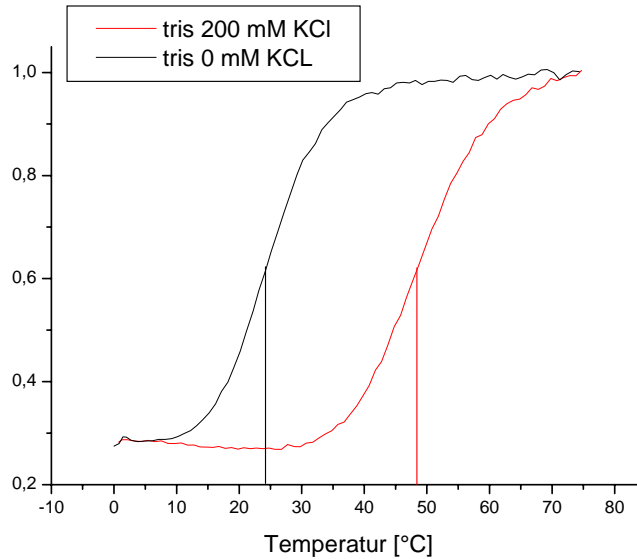


Abbildung 4.4.9: Schmelzkurven des PET-Hairpins in Tris-Puffer mit und ohne KCl

Verringert man die Salzkonzentration, so verringert sich auch der Schmelzpunkt. In diesem Fall von 50°C auf 25°C (Abb. 4.4.9). Dadurch sollte man jetzt öfter Öffnungen und wieder Schließungen des Hairpins beobachten können. Deshalb wird auch bei diesem Hairpin die Messung in einem salzfreien Puffer wiederholt. Das Bild besteht aus 200 x 200 Pixel mit einer Auflösung von 50 µm. Deutlich sind runde Spots zu erkennen, die aber von der Intensitätsverteilung her sehr inhomogen sind und durch das Quenching eine geringe Intensität aufweisen.

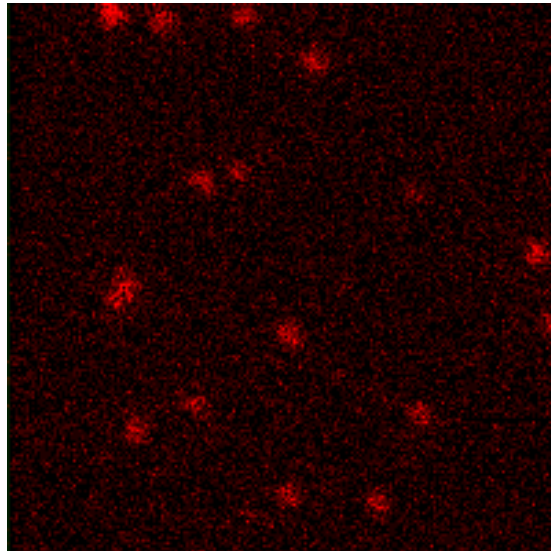


Abbildung 4.4.10: Oberfläche mit PET-Hairpin, Tris-Puffer, 200 x 200 Pixel, 50nm Auflösung, 5 μ W, 635nm Anregung, 7 ms/Pixel

Einige Pixel in einem Spot sind wesentlich heller als andere. Es findet ein ständiger Wechsel zwischen verschiedenen Konformationen statt.

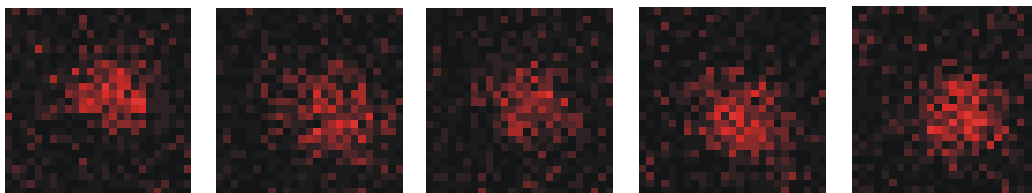


Abbildung 4.4.11: Oberfläche mit PET-Hairpin, Tris-Puffer, 200 x 200 Pixel, 50nm Auflösung, 5 μ W, 635nm Anregung, 7 ms/Pixel

Das Intensitätshistogramm der verschiedenen Spots spiegelt dieses Verhalten deutlich wider (Abb. 4.4.11). Man erhält eine sehr breite Verteilung der Fluoreszenzintensitäten um 350 Photonen mit einer Abweichung von 33 %. Dies ist selbst für die Einzelmolekülspektroskopie sehr viel und zeigt die Inhomogenität der Spots. Offensichtlich reicht die Zeit von mehreren Millisekunden nicht aus, diese Inhomogenitäten herauszumitteln.

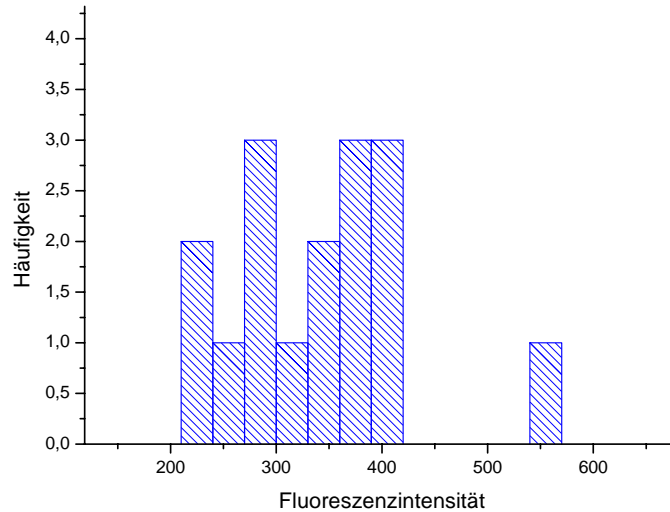


Abbildung 4.4.12: Histogramm der spot-integrierten Fluoreszenzintensitäten der Oberfläche 4.4.11

Da im Gegensatz zum FRET-Hairpin mit einer gepulsten roten Laserdiode gemessen wird, erhält man auch Fluoreszenzlebensdauern.

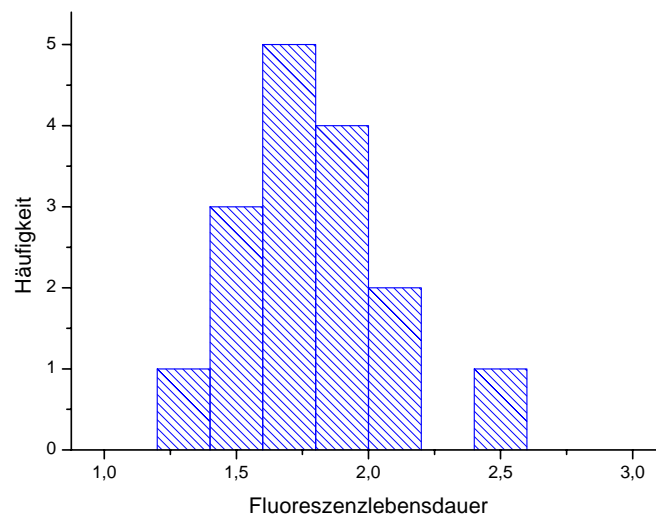


Abbildung 4.4.13: Histogramm der Fluoreszenzlebensdauer der Oberfläche 4.4.11

Das Maximum der Verteilung liegt bei 1,75 ns. Im Gegensatz zur Intensitätsverteilung ist die Lebensdauerverteilung sehr schmal.

Die Beobachtung des Fluoreszenzverhaltens in Abhängigkeit mit der Zeit ergibt eine ähnlich komplexe Spur wie der Hairpin unter Hochsalz, nur dass jetzt einige weitere Intensitätslevel hinzugekommen sind, die eine hohe Fluoreszenzintensität aufweisen (Abb.4.4.14).

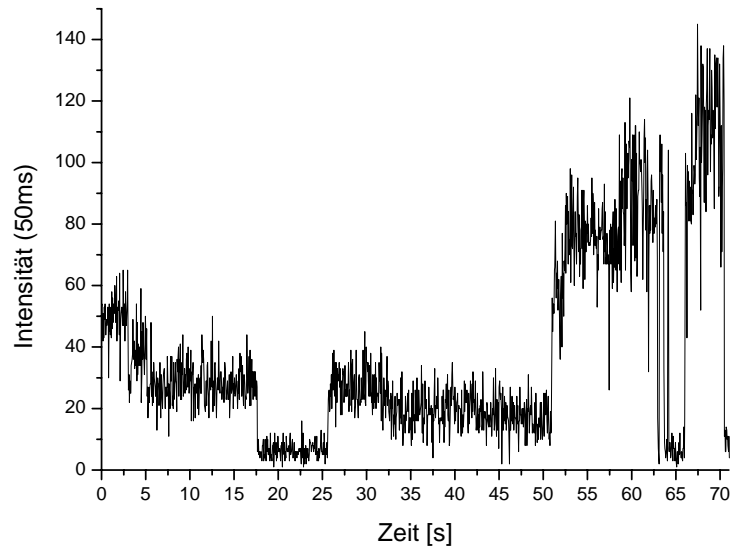


Abbildung 4.4.14: Fluoreszenzspur des PET-Hairpins in Tris-Puffer, 5 μ W Anregungsleistung, 635nm, 50ms binning

Der Anfang der Spur ist ähnlich der Spur mit Hochsalz (Abb. 4.4.6). Etwa 8 verschiedene Intensitätslevel sind bis zur 50. Sekunde zu erkennen, die sich bis um den Faktor 4 unterscheiden, aber alle eine Fluoreszenzlebensdauer von etwa 2 ns haben. Danach kommen eine Reihe von Intensitätslevel, die im Durchschnitt um den Faktor 3 bis 4 höher liegen, als die Intensitätslevel zuvor.

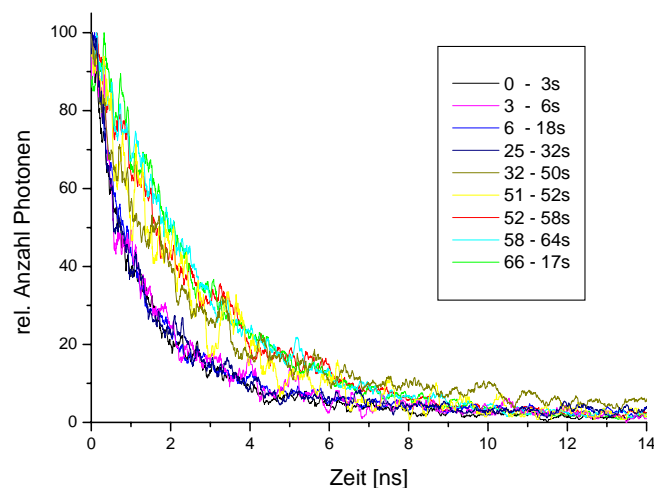


Abbildung 4.4.15: Fluoreszenzabklingkurven des PET-Hairpins in Tris-Puffer, 5 μ W Anregungsleistung, 635nm

Diese Level zeigen eine lange Fluoreszenzlebensdauer um die 3 ns. Auch wenn die Guanosine entfernt sind, so gibt es noch Cytosine, mit denen der Farbstoff eine Wechselwirkung eingehen kann. Diese Wechselwirkung muss kein Quenchen sein. Viele Farbstoffe haben 2 verschiedene Quantenausbeuten in wässrigem Lösungsmittel und organischen Lösungsmitteln wie Ethanol. Darüber hinaus kann auch eine partielle Öffnung des Hairpins die Farbstoff - Guanosin Wechselwirkung stören.

Für die unterschiedlichen Intensitätslevel im geschlossenen Zustand kommen verschiedene Arten der Interaktion von Farbstoff und DNA in Frage.

Die klassische Interaktion von Farbstoff und DNA ist die Interkalation. Es wurden viele Farbstoffe entwickelt, um DNA anfärben zu können. Viele Röntgenstrukturanalysen von kurzen DNA – Oligomeren zeigen neben Interkalation auch endcapping, aber es können sich auch Farbstoffe sowohl in die große als auch in die kleine Furche legen. Man hat so 4 verschiedene Bindungsarten mit jeweils einer eigenen Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer (Abb. 4.4.16).

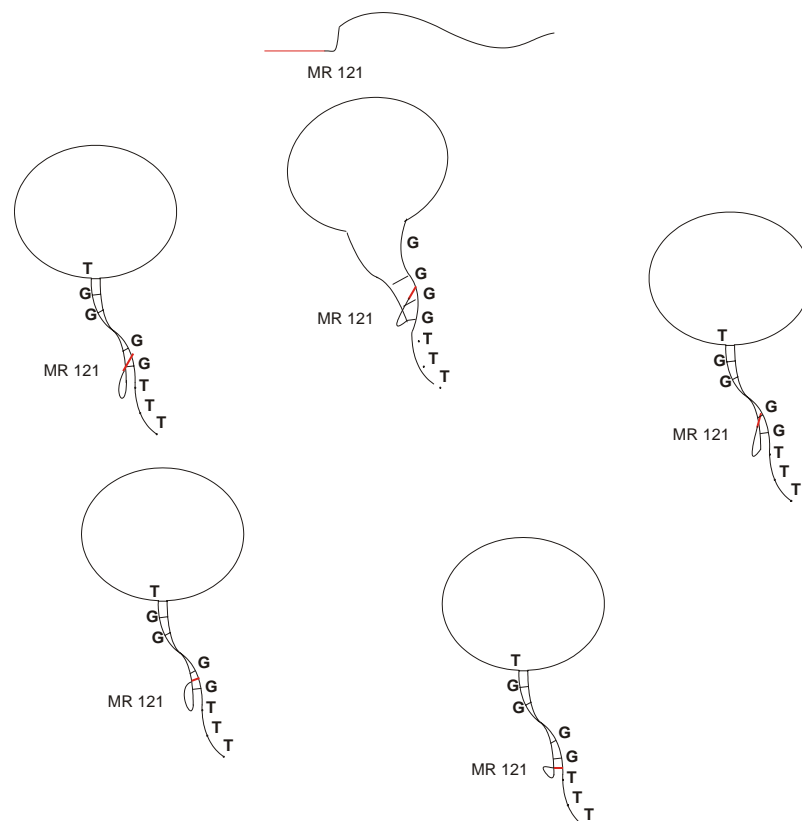


Abbildung 4.4.16: Konformationen des PET-Hairpins

Die Spuren zeigen aber wesentlich mehr Intensitätslevel. Darüber hinaus dürften die einzelnen Level keine Fluktuationen zeigen, außer den Fluktuationen, die aus der Photophysik des Farbstoffes stammen. Dies ist aber nicht der Fall. Man sieht Fluktuationen im μs bis ms Bereich (Abb. 4.4.17).

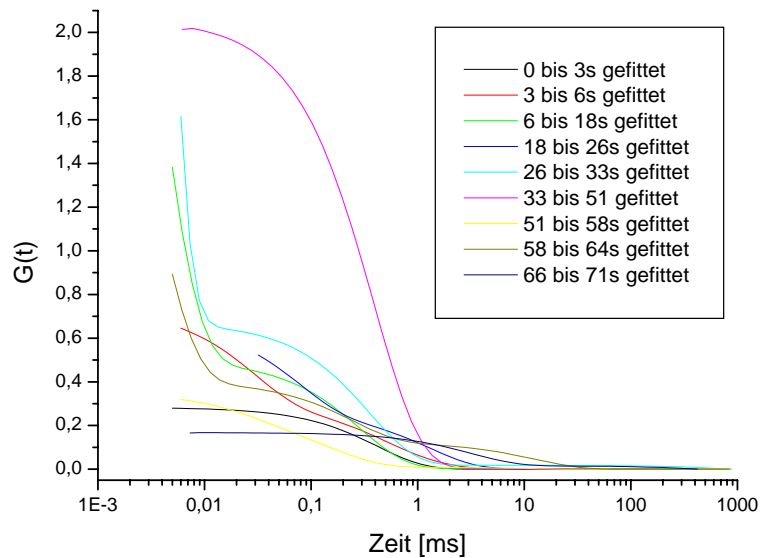


Abbildung 4.4.17: Autokorrelationen des PET-Hairpins in Tris-Puffer, $5\mu\text{W}$ Anregungsleistung, 635nm

Durch Zugabe einer DNA- Gegensequenz bestehend aus 30 Nukleotiden konnte auch der Elektronen-Transfer-Hairpin geöffnet werden. Dadurch wird das Quenching aufgehoben und man erhält eine Oberfläche mit sehr stark leuchtenden Spots.

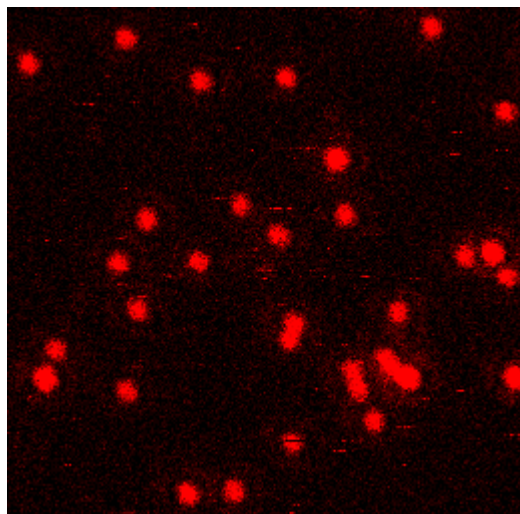


Abbildung 4.4.18: Oberfläche mit PET-Hairpin mit Gegensequenz, Tris-Puffer, 200×200 Pixel, 50nm Auflösung, $5\mu\text{W}$, 635nm Anregung, $7\text{ms}/\text{Pixel}$

Die genau Analyse der Oberfläche zeigt, dass die Durchschnittsintensität der Spots bei etwa 1000 Photonen liegt. Bei den geschlossenen Hairpins sind es 300 Photonen pro Spot. Dies entspricht einem 3-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität durch das Öffnen des Hairpins, was in etwa auch dem Wert im Bulk entspricht.

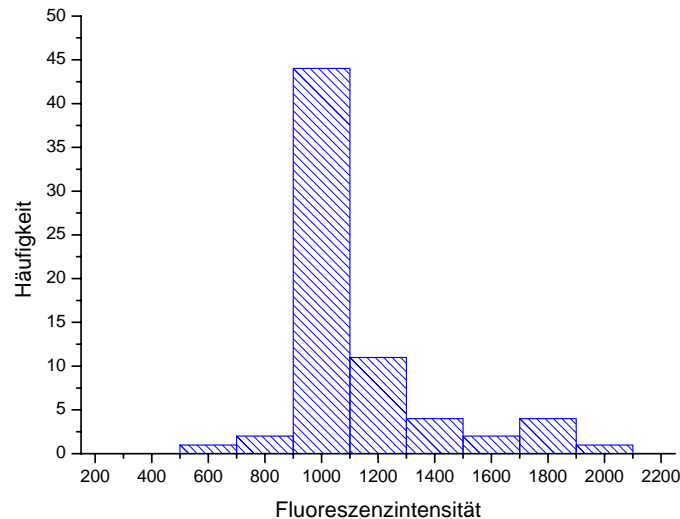


Abbildung 4.4.19: Histogramm der Fluoreszenzintensität der Oberfläche 4.4.18

Die Breite der Verteilung der Werte ist durch das Öffnen des Hairpins kleiner geworden, wie man es für einen Farbstoff erwartet. Das zeigt, dass die unterschiedlichen Intensitätslevel nicht von dem Farbstoff stammen, sondern von verschiedenen Konformationen, die ein unterschiedliches Quenchingverhalten haben.

Die Lebensdauer ist nochmals um 1,5 ns gestiegen und liegt jetzt bei 3,25 ns (Abb. 4.4.18).

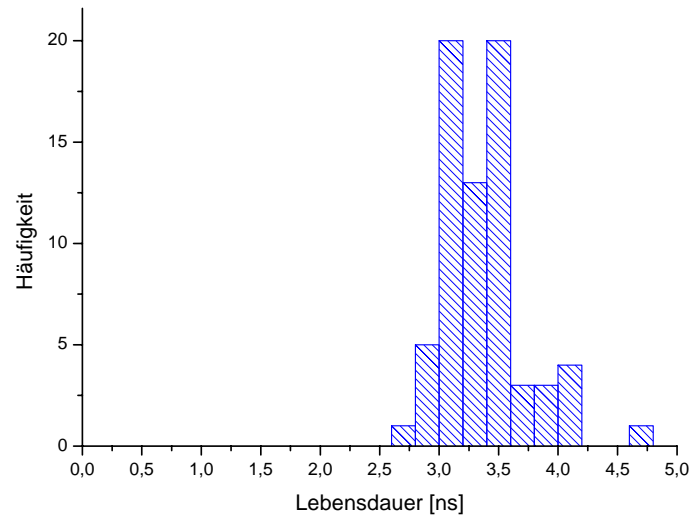


Abbildung 4.4.20: Histogramm der Fluoreszenzlebensdauer der Oberfläche 4.4.18

Vergleicht man die unter verschiedenen Bedingungen gemessenen Spots, so sieht man deutlich, dass der geschlossene Hairpin eine geringe Fluoreszenzintensität und eine kurze Fluoreszenzlebensdauer hat. Durch Öffnung des Hairpins wird das Quenchen aufgehoben, und sowohl die Fluoreszenzlebensdauer als auch die Intensität erhöhen sich. Eine Unterscheidung ist einfach möglich (Abb. 4.4.21).

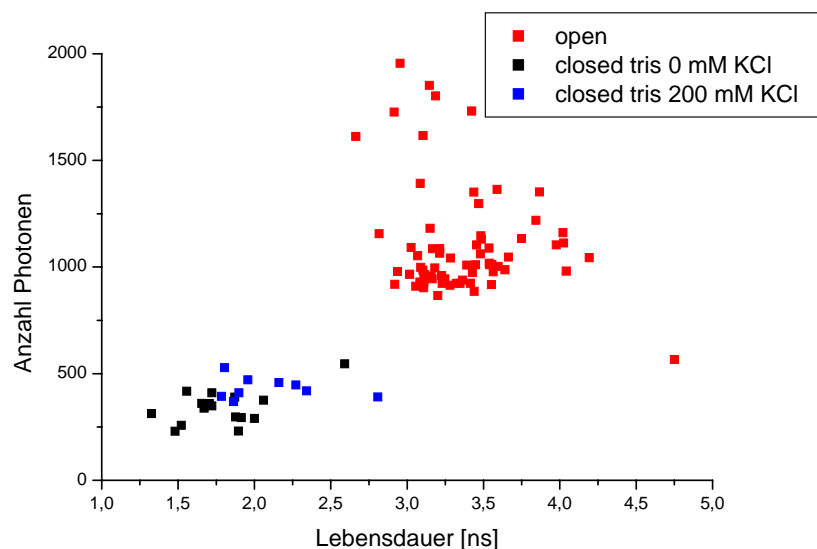


Abbildung 4.4.21: Lebensdauer – Intensitäts- Schaubild des PET-Hairpins

Eine Änderung durch Salzzug ist nicht so deutlich zu sehen wie bei dem FRET-Hairpin.

Durch Zugabe von Gegensequenz erhält man Spuren von geöffneten Hairpins (Abb. 4.4.22).

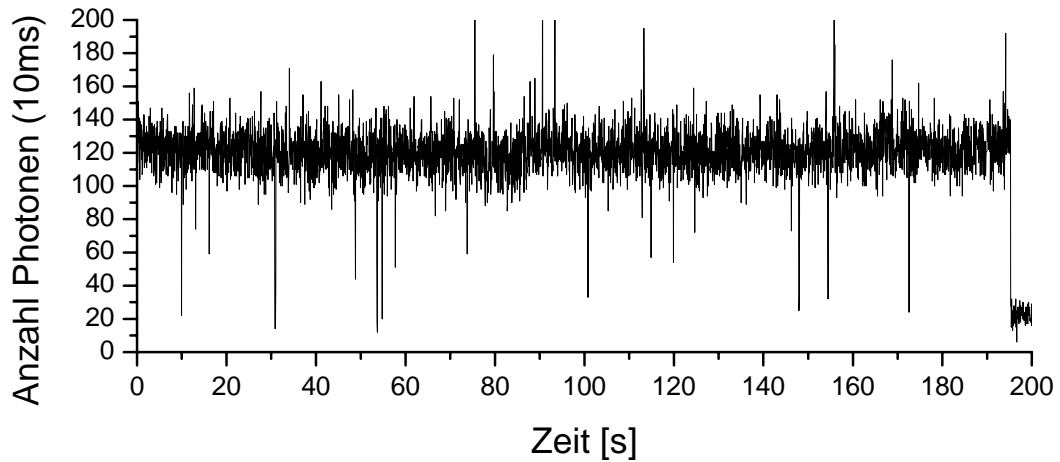


Abbildung 4.4.22: Fluoreszenzspur des mit Gegensequenz geöffneten Hairpins

Die Fluoreszenzlebensdauer ist mit 3,3 ns sehr lang. Die Fluoreszenzabklingkurve zeigt einen monoexponentiellen Abfall (Abb. 4.4.23).

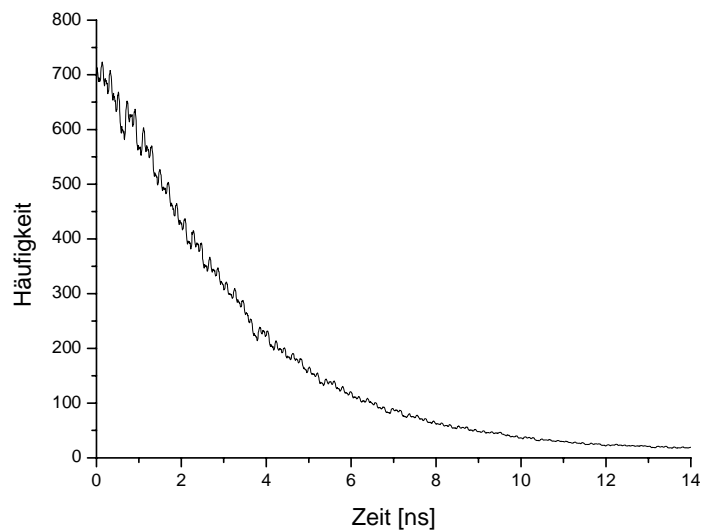


Abbildung 4.4.23: Fluoreszenzabklingkurve des geöffneten Hairpins

Auch im geöffneten Zustand sind Fluktuationen in der Intensität zu beobachten, wie die Autokorrelationskurve in Abb. 4.4.24 zeigt.

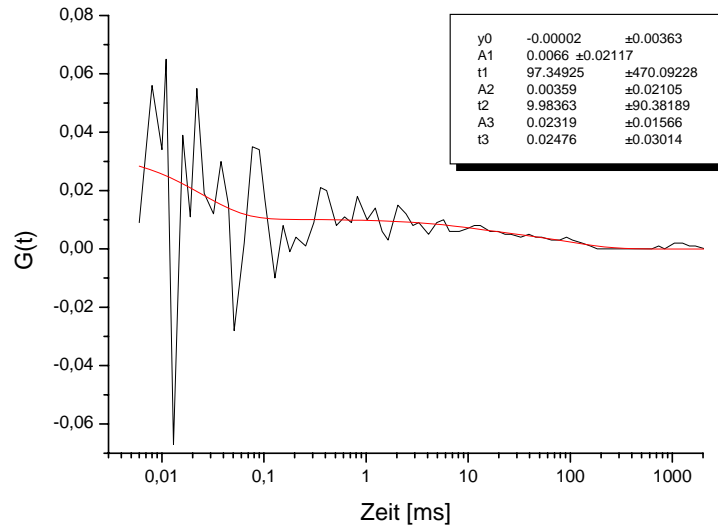


Abbildung 4.4.24: Autokorrelationskurve des geöffneten Hairpins

Um zu bestimmen wie sensitiv das Verfahren zum Nachweis bestimmter Zielsequenzen ist, werden die Hairpins mit Gegensequenz titriert. Dazu wird zur Lösung über dem Hairpin die entsprechende Menge DNA zugegeben und sofort gemessen.

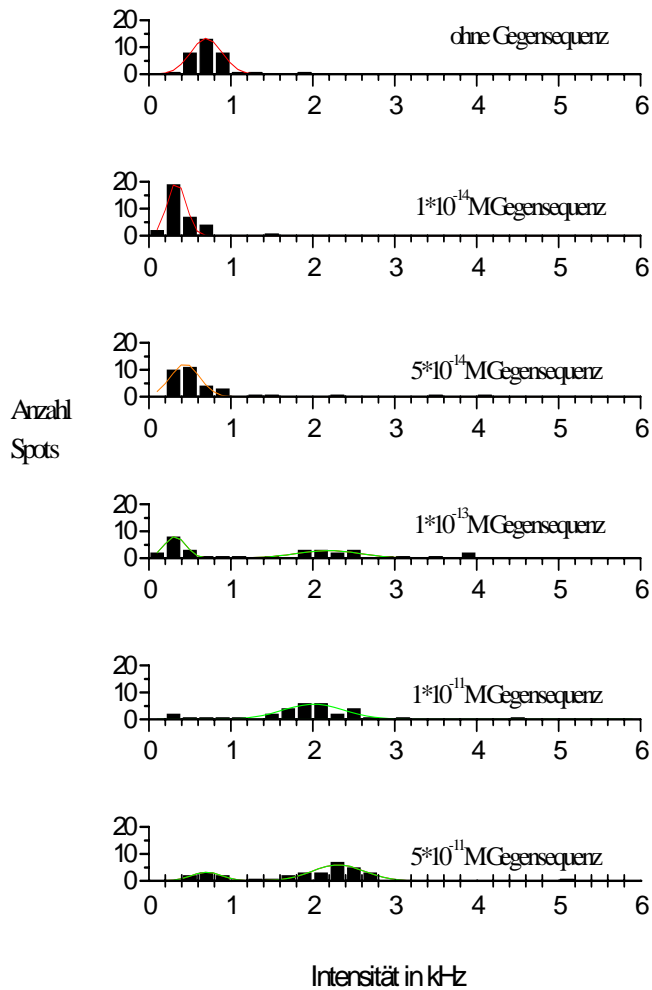


Schaubild 4.4.25: Titration des immobilisierten Hairpins mit Gegensequenz. Es wurde eine Oberfläche für 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von DNA – Gegensequenz inkubiert und anschließend die Oberflächen abgecannt. Die auf der Oberfläche erhaltenen Spots wurden analysiert und das Fluoreszenzintensitätshistogramm dargestellt. Bei $1 \cdot 10^{-14}$ und $5 \cdot 10^{-14}$ erhält man nur einen Peak bei 0,75 kHz. Erhöht man die DNA Konzentration taucht ein weiterer Peak bei 2,25 kHz auf. Dieser zeigt an, dass der DNA – Hairpin geöffnet worden ist.

Der Hairpin wird ab einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-14}$ M Gegensequenz leicht geöffnet, ab $1 \cdot 10^{-13}$ M sieht man deutlich, wie immer mehr Spots eine Intensität von 2,2 kHz annehmen und der Peak bei 0,5 kHz abnimmt.

Die Glaskammer, in der der Hairpin immobilisiert wird, hat eine Grundfläche von $0,6 \times 0,6$ cm. Bei der Immobilisierung ist die Kammer mit 400 μ l PBS-Puffer gefüllt. Daraus ergibt sich eine Oberfläche von 3 cm^2 . Bei ungefähr 100 Spots pro $400 \mu\text{m}^2$ ergibt sich eine Hairpinmenge von $1,3 \cdot 10^{-16}$ mol, d.h. ab einer Gegensequenzkonzentration von $3,3 \cdot 10^{-13}$ M hat man ein Verhältnis von Hairpin zu

Gegensequenz von eins zu eins. Um einen Fluoreszenzanstieg zu sehen, muss man einen 8-fachen Überschuss an Gegensequenz zugeben.

Zur Klärung des Ursprungs der Fluktuationen im Mikrosekundenbereich wurden FCS – Löschungsexperimente von MR 121 mit Guanosin durchgeführt Abb. 2.4.26.

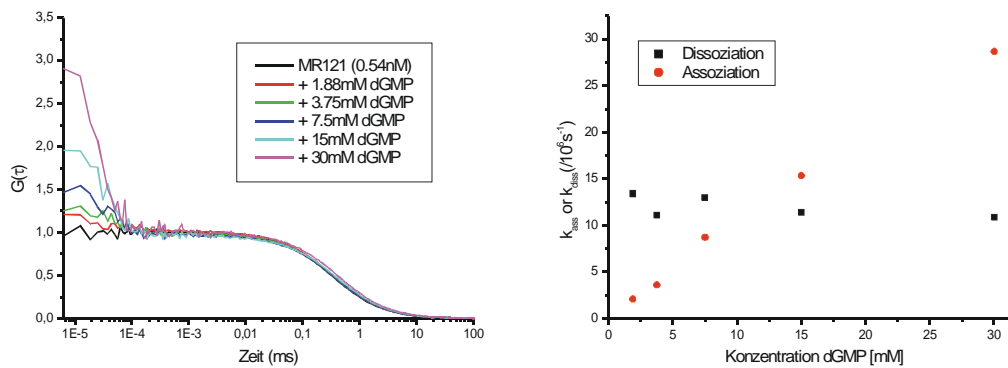


Abbildung 2.4.26: FCS-Kurve und Kinetiken der Komplexbildung von MR 121 mit Guanosinmonophosphat

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Kinetik der Komplexbildung zwischen MR 121 und Guanosinmonophosphat sehr schnell ist. Die Assoziationsrate ist konzentrationsabhängig $1/30$ ns bis $1/1$ μ s. Die Dissoziationskonstante ist nicht konzentrationsunabhängig und liegt bei $1/100$ ns. Die gleichen Experimente mit dem PET –Hairpin ergeben eine um den Faktor 100 verlangsamte Kinetik. Darüber hinaus zeigt der Fit, dass es mehrere Kinetiken im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich gibt (Abb. 2.4.27). Der Grund für die Verlangsamung der Kinetik ist die geringe Flexibilität der DNA.

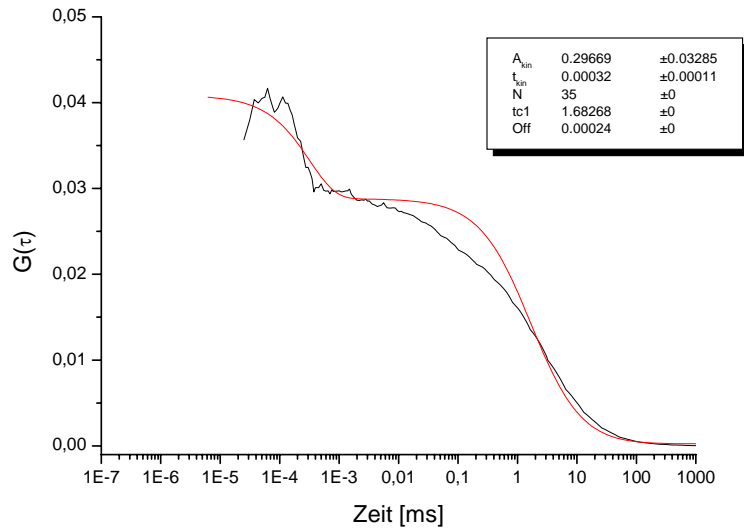


Abbildung 4.4.27: FCS-Kurve des PET-Hairpins. Die Kurve ist an eine biexponentielle Funktion angepasst. Deutlich ist der Unterschied zwischen der gemessenen Kurve und dem Modell zu sehen. Im Bereich zwischen 0,01 und 10 ms sind etliche weitere Komponenten zu sehen.

Schaut man sich die Autokorrelationskurve in Abb. 4.4.27 an, so fällt eine Fluktuation im 100 ns Bereich mit einer großen Amplitude auf. Die große Amplitude zeigt an, dass die Hinreaktion wesentlich schneller ist als die Rückreaktion.

Zusätzlich zu dieser schnellen Fluktuation gibt es eine Reihe von weiteren Kinetiken, die zwischen einer μs und einer ms stattfinden, die aber nicht mehr aufzulösen sind. Die Kinetiken zeigen aber alle eine sehr kleine Amplitude. Das lässt auf eine schnelle Rückreaktion im Vergleich zur Hinreaktion schließen.

k_{hin}	$k_{\text{rück}}$	τ	A
+	+	-	+
+	-	-	+
-	+	-	-
-	-	+	+

Abbildung 4.4.28: Amplituden und Zeiten verschiedener Komplexbildungen

Ist die Geschwindigkeitskonstante sowohl der Hin- als auch der Rückreaktion schnell, so hat man in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie eine geringe Zeit und eine hohe Amplitude. Ist die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion klein und die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion groß, so erhält man eine geringe Korrelationszeit und eine geringe Amplitude (Abb. 4.4.28).

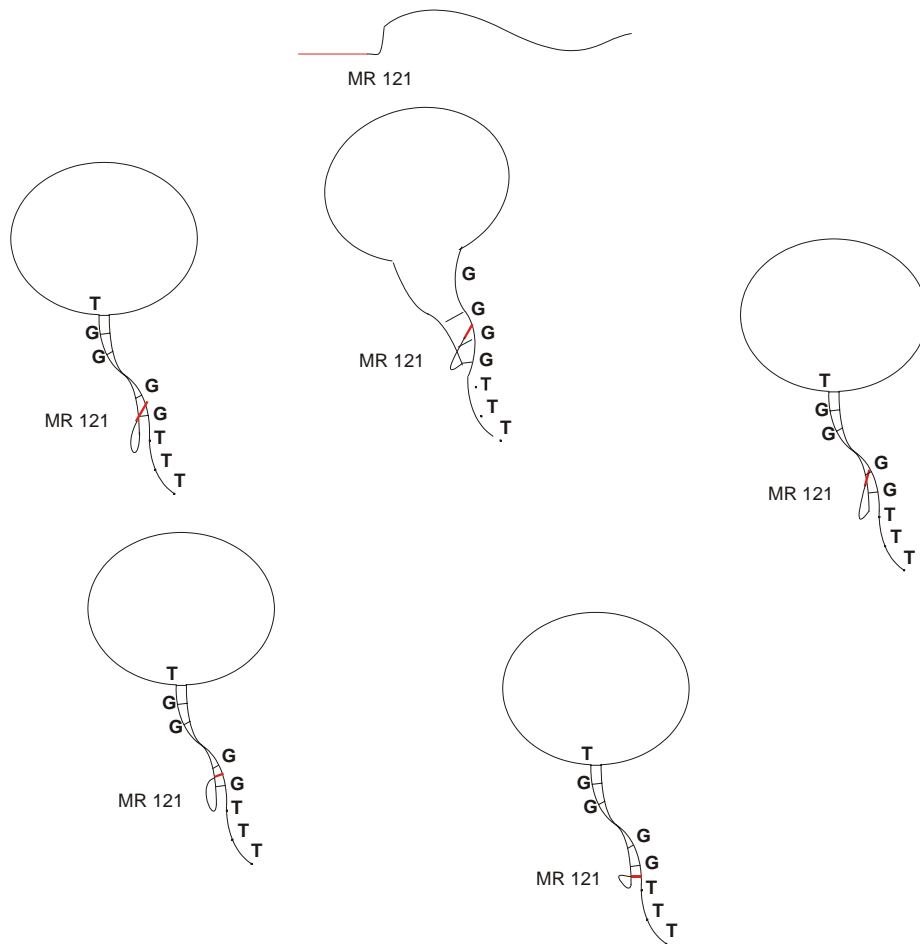


Abbildung 4.4.29: Konformationen des PET-Hairpins

Betrachtet man die Struktur eines Interkalators, so sieht man, dass er eine ähnliche Struktur wie MR 121 hat.

4.5 Vergleich des PET-Hairpins mit bekannten Strukturen

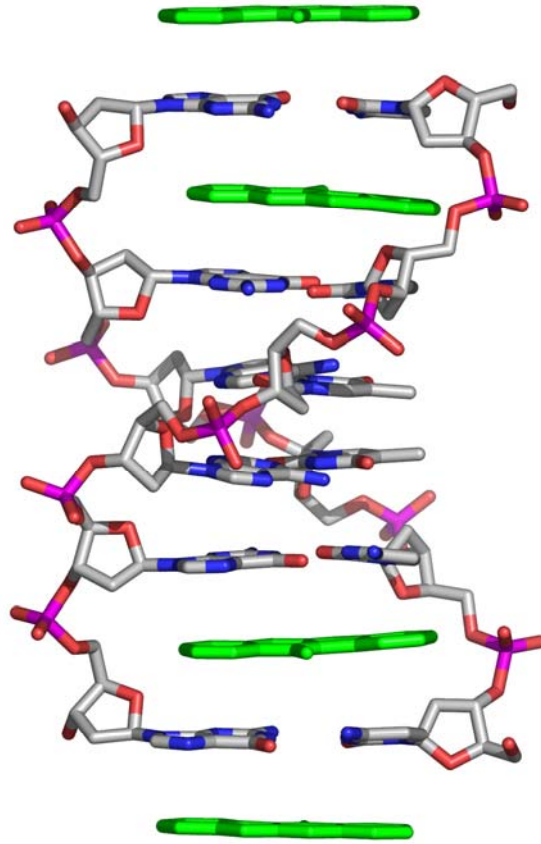


Abbildung 4.5.1: Röntgenstruktur des Interkalators Cryptolepine

Die Röntgenstruktur des Interkalators Cryptolepine [5-methyl-5h-indolo[3,2-b]quinoline] zeigt die Wechselwirkung zwischen DNA – Basen und Farbstoff auf [Lisgarten 2001]. Die einzelnen Nukleotide sind exakt parallel zueinander angeordnet. Zwischen diesen Ebenen befindet sich parallel ausgerichtet der Interkalator. Zustandekommen kann die Interkalation nur durch Parallelverschiebung der Ebene des Interkalator gegen die Nukleotidebene. Bei Endcapping hat man eine ähnliche Geometrie, es fehlt nur das zweite Nucleotidpaar. Dadurch kann sich der Farbstoff aus einer halbkugelförmigen Richtungsverteilung an die DNA annähern und ist damit wesentlich einfacher und schneller zu erreichen, als die Interkalation. Deshalb sollte man zwei verschiedene Kinetikkonstanten für das Interkalieren und Endcapping des Farbstoffes erhalten. Für das Interkalieren erwartet man eine langsame Hinreaktion und eine nur leicht gehinderte Rückreaktion.

Im Gegensatz dazu erwartet man für Endkapping eine sehr schnelle Produktbildung und eine normale Geschwindigkeit der Rückreaktion.

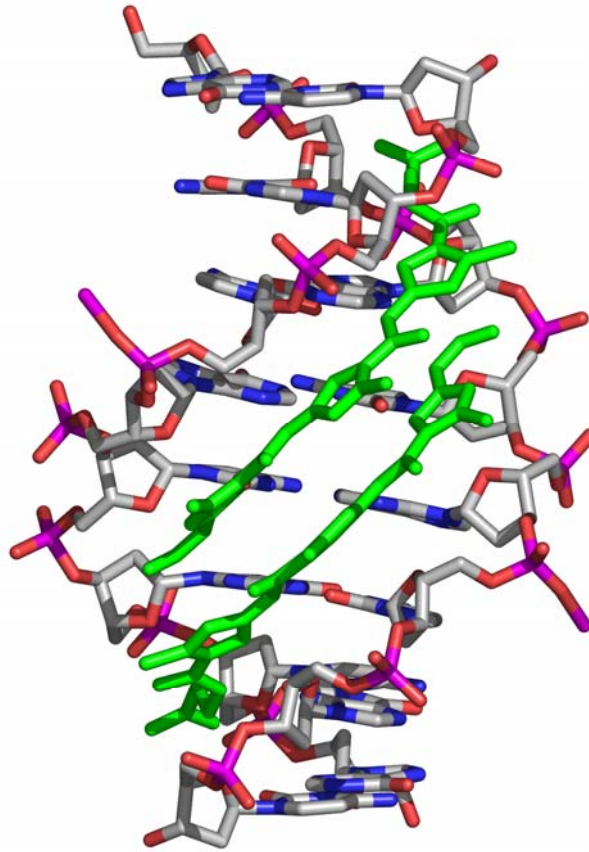


Abbildung 4.5.2: Röntgenstruktur des Groovebinders Distamycin

Die zweite Röntgenstruktur zeigt, dass der Groovebinder in der großen Furche gebunden ist [Chen 1994]. MR 121 hat eine ganz andere Struktur als Groovebinder. Trotzdem wird er hineinpassen. Das Distamycin liegt planar in der Furche. Eine wesentliche Voraussetzung damit MR 121 binden kann, denn das starre Grundgerüst kann nicht verdrillt werden. Der Farbstoff liegt aber als Dimer in der Furche. Da aber nur ein MR 121-Molekül an die DNA gekoppelt ist, fällt dieser Energiebeitrag weg. Dadurch ist eine langsamere Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion zu erwarten. Die Rückreaktion sollte schnell sein. Eine sterische Hinderung der Reaktion ist nicht zu sehen.

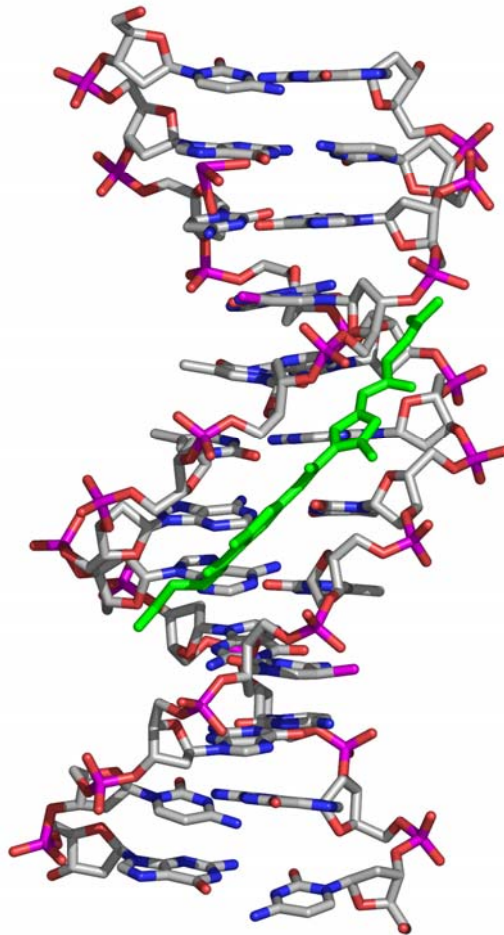


Abbildung 4.5.3: Röntgenstruktur des Interkalators Netropsin

Auch hier ist der Farbstoff planar angeordnet [Goodsell 1994]. Der Abstand zu den Nukleotiden ist gering. Im Gegensatz zum Distamycin, das in der großen Furche bindet, liegt das Netropsin als Monomer vor. Auffallend ist aber die lange DNA – Sequenz. Wesentlich kürzere Sequenzen, wie die des Hairpins, haben eine kaum ausgeprägte kleine Furche. Deshalb sollte die Geschwindigkeit der Hinreaktion gering sein. Die Rückreaktion ist kaum sterisch gehemmt und damit sicherlich schnell.

Durch FCS konnte eine schnelle Reaktion aufgelöst werden, die eine hohe Amplitude hat. Durch Betrachtung von Röntgenstrukturen von DNA – Doppelsträngen mit Farbstoffen konnte diese Fluktuation dem Endcapping zugeordnet werden. Desweiteren konnten mehrere Konformationen gefunden werden, die, wie die FCS-Kurve zeigt, eine langsame Hinreaktion und eine schnelle Rückreaktion haben, wie das Interkalieren und Groovebinding.

4.6 Fluktuationen des FRET-Systems

Nachdem die Art der Fluktuationen im PET-Hairpin geklärt ist, bleibt nur noch eine Frage offen: Woher kommen die Fluktuationen im FRET-Hairpin?

Um sicher zu gehen, dass sie nicht von der Öffnungskinetik des Hairpins stammen, wird ein DNA-Doppelstrang-System konstruiert, das sich nicht öffnen kann bzw. das sich nach dem Öffnen nicht mehr schließen kann.

Dazu wird die Sequenz des Stammes TCCCCA genommen. An dem T wird der Farbstoff Cy5 gekoppelt und am T des Gegenstranges der Farbstoff Cy3. Um keine weitere Wechselwirkung mit Guanosen zu erhalten, das zwar nur MR 121 quencht, nicht aber Cy3 und Cy5, werden auf jeder Seite 6 Adenine hinzugefügt. Durch Rechnungen mit dem Programm m-fold wird die Schmelztemperatur des Systems ermittelt. Ohne weitere Nucleotide würde die Schmelztemperatur 45°C betragen. Durch weiteres Anhängen von Cytosinen auf beiden Seiten, kann die Sequenz weiter stabilisiert werden. Die Ergebnisse der Rechnung mit m-fold sind in Abbildung 4.6.1 wiedergegeben.

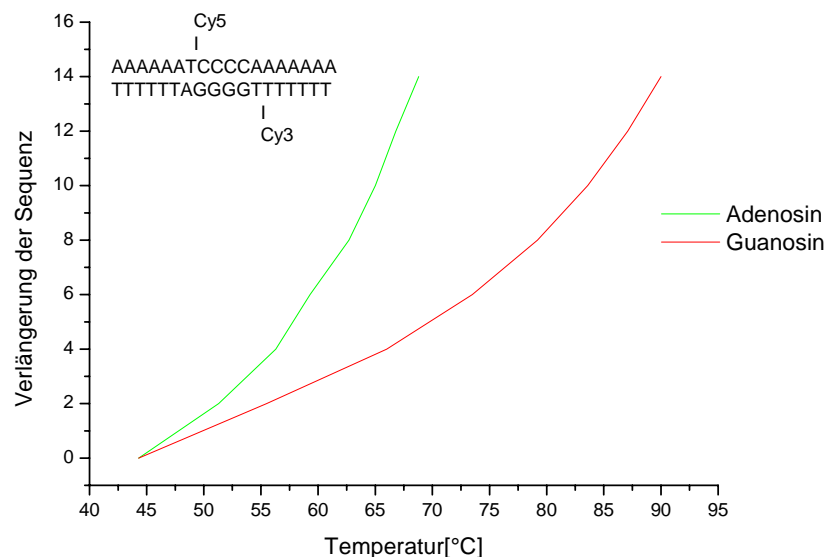


Abbildung 4.6.1: Schmelztemperaturen bei Verlängerung des Stammes mit Adenosinen bzw. mit Guanosen

Durch Anhängen von 8 Cytosinen ist die Schmelztemperatur von 45°C auf fast 80°C gestiegen. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit zur Öffnung des Doppelstrangs sehr gering.

Der DNA-Doppelstrang wird auf der Biotin-Streptavidin-Oberfläche immobilisiert und anschließend vermessen. Die Oberfläche hat eine Größe von 10 x 10 µm bei einer Auflösung von 50 nm. Die Integrationszeit pro Pixel beträgt 1ms.

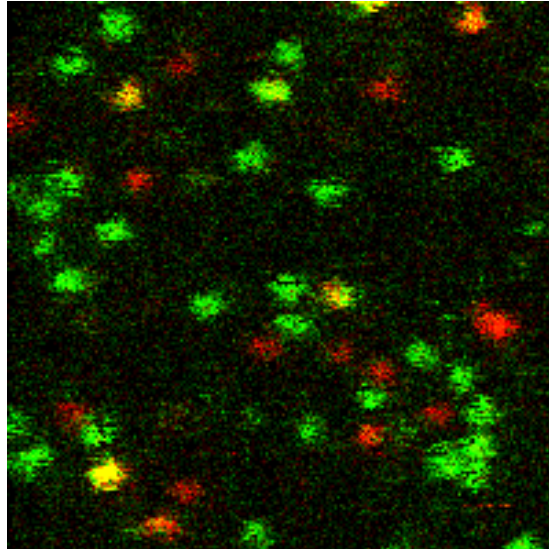
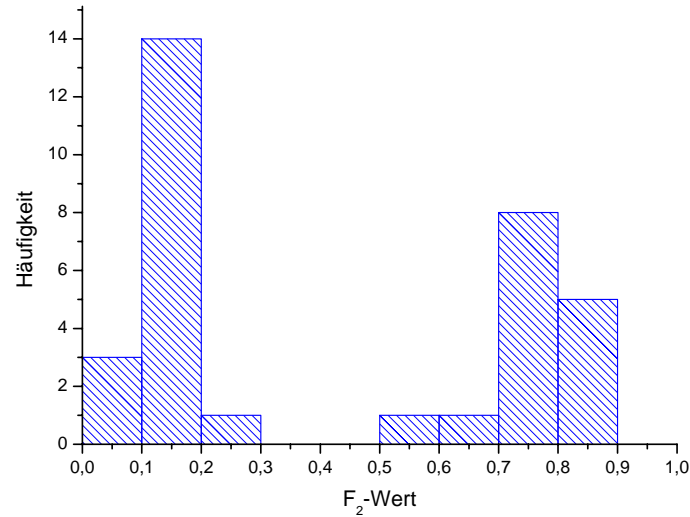


Abbildung 4.6.2: Oberfläche mit einem FRET-DNA-Doppelstrang, 10 * 10 µm, 200 Pixel, 532nm Anregung, 1ms Integrationszeit

Man erkennt einige rote Spots auf der Oberfläche. In der Lösung über der Oberfläche befindet sich keine DNA. Trotzdem bleiben die roten Spots auch noch nach 24h erhalten. Das bedeutet, dass der Doppelstrang stabil ist und es nur sehr langsam zur Ablösung des Gegenstranges kommt. Das F_2 -Wert-Histogramm zeigt zwei verschiedene Spezies. Eine mit einem F_2 -Wert von 0,8 und eine andere mit einem F_2 -Wert von 0,15.

Abbildung 4.6.3: F₂-Wert Verteilung der Oberfläche 4.6.2

Verfolgt man die Fluoreszenz im Verlauf der Zeit, erhält man die folgende Spur:

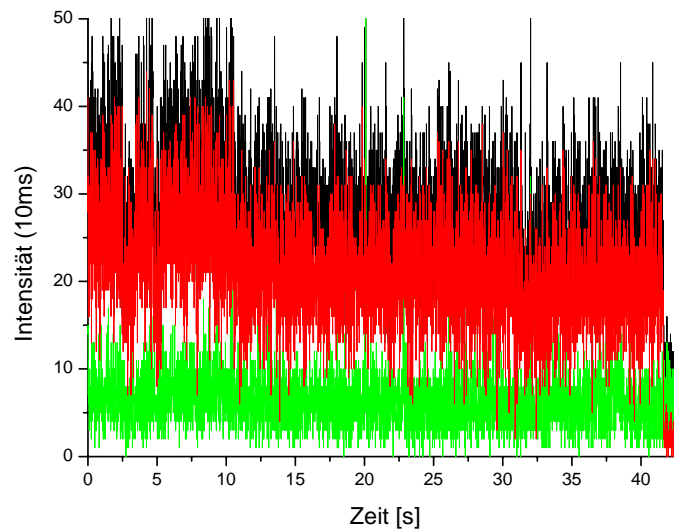


Abbildung 4.6.4: Einzelmolekülspur des FRET-Doppelstranges

Bis zu Photozerstörung nach 42 s ist der DNA - Doppelstrang die ganze Zeit geschlossen. Die beiden grünen Bursts stammen wahrscheinlich von der Glukoseoxidase. Auffällig sind die verschiedenen Intensitätslevels, die in der roten Spur zu sehen sind. Die Fluoreszenzintensität schwankt im Durchschnitt zwischen

3 kHz am Anfang und 2,5 kHz gegen Ende des Diagramms. Dies bedeutet eine Änderung um 20%. Die Zeit bis zum Wechsel der Intensität ist sehr lange.

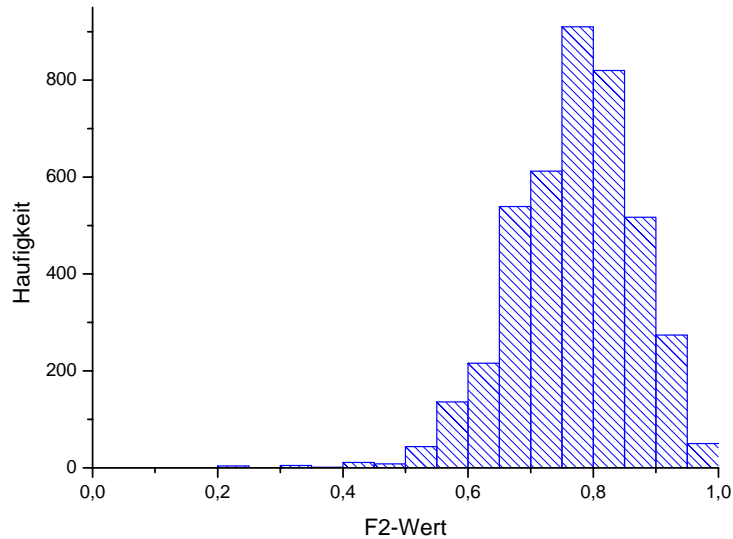


Abbildung 4.6.5: F₂-Wert Histogramm der Spur 4.6.4

Das F₂-Wert-Histogramm zeigt eine breite Verteilung um 0,8. Diese Verbreiterung kommt durch die Schwankungen der Intensität zustande.

Die Autokorrelation der Daten zeigt auch wieder Fluktuationen im Millisekunden- bis Mikrosekundenbereich.

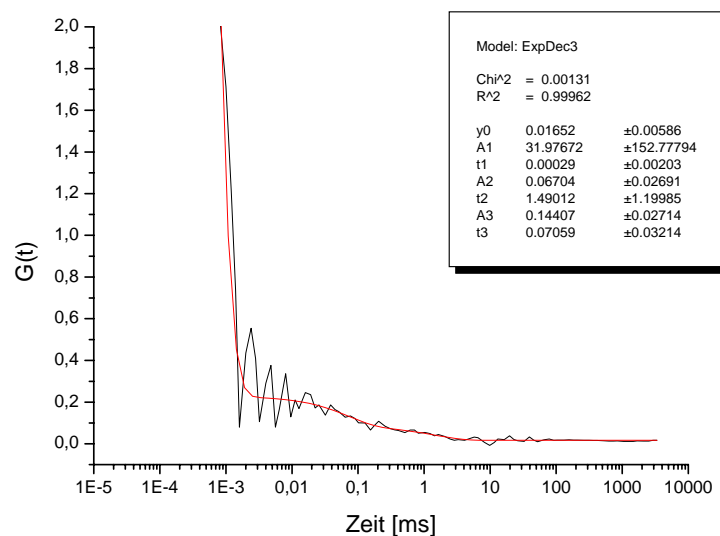


Abbildung 4.6.6: Autokorrelation der Spur 4.6.4

Betrachtet man die Zeitskala auf der die Intensitätsschwankungen stattfinden, so sind diese im gleichen Bereich wie die Intensitätsschwankungen bei dem PET-Hairpin. Können diese Schwankungen nicht die gleiche Ursache haben, wie die Intensitätsschwankungen und Fluktuationen des PET-Hairpins?

MR 121 wird durch Guanosin gelöscht - Cy3 und Cy5 nicht. Um solche Schwankungen sehen zu können, müsste sich die Quantenausbeute von Cy3 und Cy5 während der Interaktion mit der DNA ändern. Zur Klärung wird die Quantenausbeute in Wasser und in Ethanol gemessen. Die konzentrationsbereinigten Spektren sind in Abbildung 4.6.7 dargestellt.

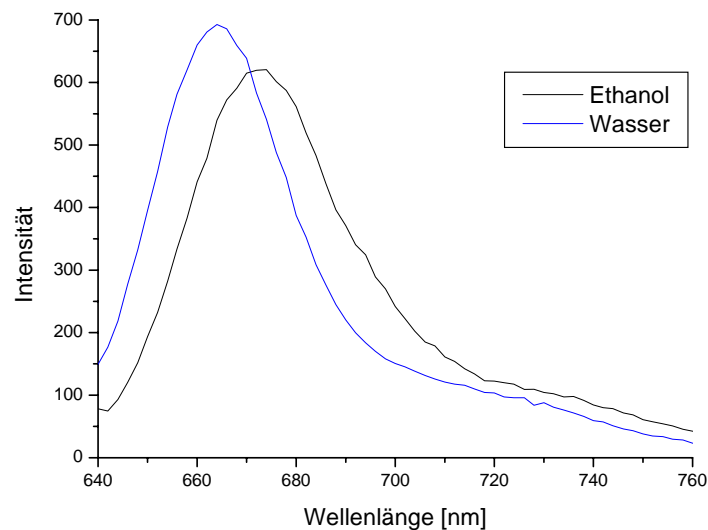


Abbildung 4.6.7: Fluoreszenzspektrum von Cy5 in Wasser und Ethanol

Bemerkenswert ist nicht nur der Blaushift des Fluoreszenzspektrums in Wasser, sondern auch die Zunahme der Fluoreszenzintensität um 13 %. Das bedeutet, dass sich durch Interkalation, Endcapping und oder Minor Groovebinding die Fluoreszenzintensität ändert und dadurch die gleichen Autokorrelationszeiten ergeben wie bei dem PET-Hairpin.

5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FRET – Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer und PET – Photoinduzierter Elektronen Transfer - zwei komplementäre Techniken zur Bestimmung von Abstandsänderungen in Biomolekülen sind. Es konnte gezeigt werden, dass PET-Hairpins gelöscht werden und dadurch ein Öffnen und Schließen des Hairpins zu beobachten ist.

Diese Änderung der Konformation spielt sich im Sekundenbereich ab. Für die Schließung des Hairpins konnte eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 1,3 \pm 0,13 \text{ } ^1/\text{s}$ bei 22°C bestimmt werden. Die Öffnungskinetik ist wesentlich langsamer, sie beträgt $k^* = 10,8 \pm 2 \text{ } ^1/\text{s}$. In dieser langsamen Gesamtkinetik spiegelt sich die Funktion als Informationsspeicher wider. Damit die Informationen gegen eine Veränderung geschützt sind, ist die DNA ein starres Molekül, das die Information gegen Veränderung schützt. Wird die Information benötigt, müssen die DNA-Stränge separiert und getrennt gehalten werden. Deshalb ist die Rückreaktion auch ziemlich langsam.

Bei der Untersuchung von DNA-Hairpins konnten zusätzliche, im Vergleich zur Öffnung und Schließung des Hairpins, schnelle Fluktuationen gefunden werden. Diese haben nichts mit dem Öffnen und Schließen des Hairpins zu tun, vielmehr sind konformative Änderungen der Wechselwirkung von Farbstoff mit DNA die Ursache für diese Veränderungen der Fluoreszenz. Diese sind wesentlich schneller als die Konformationsänderungen der DNA (Öffnen/Schließen) und finden im Milli- bis Mikrosekundenbereich statt. Vorherige Studien in Lösung, die eine maximale Zeitauflösung bis in den Millisekundenbereich hatten, interpretierten diese Kinetik als den Konformationswechsel des Hairpins. Der größte Unterschied zwischen Lösungsmessungen und diesen Untersuchungen ist die Immobilisation der Proben. Wechselwirkungen der Oberfläche mit dem Hairpin könnten die Kinetik beeinflussen. Aber in beiden Fällen sieht man die schnellen Konformationswechsel des Farbstoffes, die sich auf der gleichen Zeitskala abspielen. Des Weiteren hat polarisationsmodulierte Anregung des Farbstoffes gezeigt, dass, wenn überhaupt keine starken Wechselwirkungen vorhanden sein können. [Piestert]

Konformationsänderungen können mithilfe von FRET verfolgt werden. In meiner Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass auch PET in der Lage ist Konformationsänderungen aufzuzeigen. Der Vorteil von PET ist die starke Abstandsabhängigkeit. Konformationsänderungen, vor allem in Proteinen, führen zu wesentlich geringeren Abstandsänderungen, aber gerade die Konformation von Proteinen ist wichtig zum Verständnis ihrer Funktion und Reaktivität. Grundsätzlich kann jede Polypeptidkette in einer nahezu unbegrenzt großen Anzahl von Konformationen vorliegen. Im Allgemeinen wird allerdings jedes Molekül eines bestimmten Proteins die gleiche Konformation einnehmen. PET bietet nun aufgrund der geringeren Abstandsabhängigkeit die Möglichkeit Konformationsänderungen und Gleichgewichtsfluktuationen von Proteinen genauer zu untersuchen.

Mit Hilfe dieser Technik konnten nicht nur Fluktuationen untersucht, sondern auch DNA bis zu einer Konzentration von 10^{-13} M nachgewiesen werden. Damit ist es möglich, spezifische Gene von Krankheitserregern nachzuweisen. Für die Behandlung eines Patienten ist es außerordentlich wichtig zu wissen, ob er von einem Virus oder von einem Bakterium befallen ist. PET-Hairpins erlauben aber nicht nur die Unterscheidung dieser beiden Arten, sondern ermöglichen die genaue Bestimmung der Spezies und durch Identifikation bestimmter Gene ist es sogar möglich, Resistenzen gegenüber Antibiotika in kürzester Zeit nachzuweisen und dadurch die Behandlungsstrategie zu wechseln. In letzter Zeit häufen sich die Fälle, bei denen Antibiotika ihren Dienst versagen. Oft ist es dann aber schon zu spät, um andere Mittel auszuprobieren. Dies unterstreicht die Notwendigkeit nach neuen Diagnosemethoden.

Aber nicht nur Krankheitserreger können nachgewiesen werden, sondern auch genetisch bedingte Krankheiten können erfasst werden, wie z.B. eine Veranlagung zu Darmkrebs. Durch diesen Wissensvorsprung können rechtzeitig geeignete Maßnahmen ergriffen werden, um einen Ausbruch der Krankheit zu verhindern.

Des Weiteren gibt es viele erst zum Teil verstandene Prozesse in der Natur, bei denen DNA-Doppelstränge getrennt werden. Eine sicherlich interessante Anwendung ist die Beobachtung der Öffnungs- und Schließungskinetik von Polymerasen (Abb. 5.1).

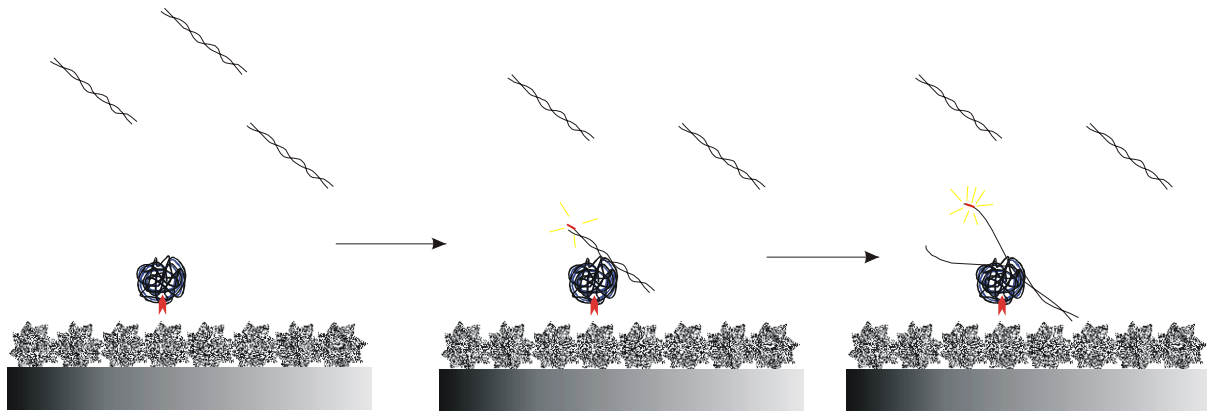


Abbildung 5.1: Öffnung des DNA – Doppelstrangs durch die Polymerase

Die RNA-Polymerase T7 hat eine bestimmte Erkennungssequenz, an die sie bindet und anschließend den DNA-Strang öffnet.

```

taatacgcactcactatagggagaccacaacggttccctctagaaataatTTTgtttaactttaagaaggagatataccat
gtctggttctcatcat
  
```

Abbildung 5.2: Erkennungssequenz der RNA-Polymerase T7

Immobilisiert man die markierte RNA-Polymerase auf einer Oberfläche, so könnte man nicht nur die Bindungskinetik der DNA und der Polymerase verfolgen, sondern auch die Öffnung des Doppelstrangs und anschließend die Synthese der RNA, wodurch schrittweise die Guanosine wieder im RNA-Gegenstrang eingebaut werden. Danach löst sich die RNA von der DNA ab. Im letzten Schritt fällt die DNA von der Polymerase ab. Durch Beobachtung auf Einzelmolekülebene könnten all diese Prozesse beobachtet und deren Kinetik bestimmt werden.

Auch für diagnostische Anwendungen kann das System weiter optimiert werden. Je größer der Unterschied zwischen gequenchtem (geschlossenen) und ungequenchtem (geöffnetem) Zustand des Hairpins ist, desto sensitiver wird die Diagnostik. Öffnen sich nur 1% aller Hairpins, da nicht mehr Gegensequenz vorhanden ist und hat man einen 5-fachen Anstieg der Fluoreszenz, so erhält man eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um 5%. Dies ist fast nicht mehr messbar. Hat man dagegen einen 100-fachen Anstieg, würde sich die Fluoreszenzintensität verdoppeln. Deshalb besteht ein Bedarf an Optimierung, um geringere Spuren einfacher nachweisen zu können. Die Autokorrelation hat gezeigt, dass der Farbstoff

nur kurz mit den Nukleotiden in eine Wechselwirkung tritt, die aber notwendig ist, um gelöscht zu werden. Deshalb muss der Farbstoff in die Konformation gebracht werden, in der er gelöscht ist. Dies könnte man erreichen, indem man den C₁₂-Linker zwischen dem Farbstoff und der Ribose entfernt. Danach kommt es zu einer permanenten Komplexbildung zwischen dem Farbstoff und dem Guanosin (Abb.5.3).

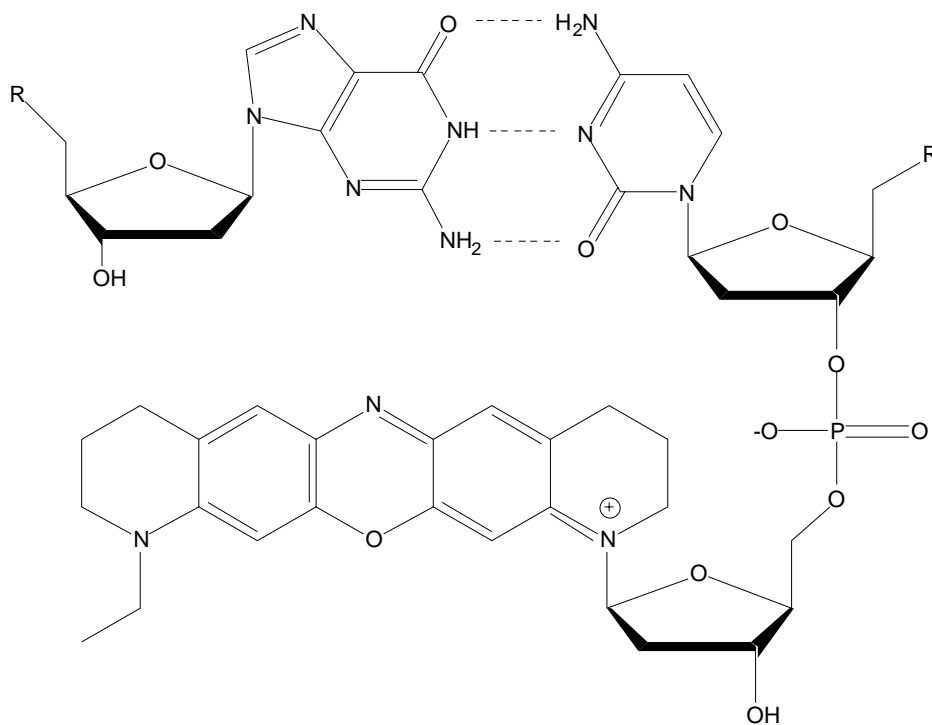


Abbildung 5.3: Optimale Farbstoff – DNA Konformation

Dadurch wird nicht nur der Farbstoff wesentlich besser gelöscht, sondern auch die Möglichkeit genommen, unterschiedlich stark gequenchte Konformationen einzunehmen und dadurch viele verschiedene Intensitätsniveaus auf Einzelmolekülebene zu erzeugen, wodurch die Dateninterpretation wesentlich erleichtert würde.

6. Literatur

- [Atkins 1990] P. W. Atkins – Pysikalische Chemie; korrigierter Nachdruck, 1990, der 1. Auflage 1987
- [Axelrod 1989] D. Axelrod, E.H. Hellen. "Emission of fluorescence at an interface. In Fluorescence microscopy of living cells in culture" D.L. Tayler, Y.L. Wang, Eds.; Academic Press, Vol. Part B, **1989**, 399.
- [Bowe 2005] M. E. Bowe, K. Weninger, J. Ernst, S. Chu, A. T. Brunger „Single Molecule Studies of Synaptotagmin and Complexin Binding to the SNARE Complex" Biophys J. **2005**, ASAP
- [Chen 1994] X. Chen, B. Ramakrishnan, S. T. Rao, M. Sundaralingam, "Binding of two distamycin A molecules in the minor groove of an alternating B-DNA duplex", The RCSB Protein Data Bank (PDB), **1994**, 159D, <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [Demtröder 1993] Demtröder, Laserspektroskopie Grundlagen und Techniken, 4.Auflage, Springer

- [Dovichi 1983] N. J. Dovichi, J. C. Martin, J. H. Jett, R. A. Keller, *Science*, **1983**, 219, 845-847
- N. J. Dovichi, J. C. Martin, J. H. Jett, M. Trkula, R. A. Keller, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 348-354
- E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, 174, 553-557
- [Goodsell 1994] D. S. Goodsell, M. L. Kopka, R. E. Dickerson, "Refinement of netropsin bound to DNA: bias and feedback in electron density map interpretation" The RCSB Protein Data Bank (PDB), **1994**, 101d, <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [Ha 1999] T. Ha, X. Zhuang, H. D. Kim, J. W. Orr, J. R. Williamson, S. Chu, "Ligand-induced conformational changes observed in single RNA molecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 9077-9082
- [Ha 2002] T. Ha, I. Rasnik, W. Cheng, H. P. Babcock, G. H. Gauss, T. M. Lohman, S. Chu "Initiation and re-initiation of DNA unwinding by Escherichia coli Rep helicase, *Nature*, **2002**, 419, 638-641.
- [Heinlein 2003] T. Heinlein, J. P. Knemeyer, O. Piestert, and M. Sauer "Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes in DNA-hairpins" *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7957-7964.
- [Hell 2005] Toward Fluorescence Nanoscopy
S. W. Hell, Vortrag

- [Kim 1995] Kim, J., Fuller, J.H., Kuusk, V., Cunane, L., Chen, Z., Mathews, F.S., W.S. McIntire,
J. Biol. Chem., **1995**, 52, 31202-31209.
- [Hirschfeld 1976] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.*, **1976**, 15, 2965-2966
- [Lakowicz 1999] J.R. Lakowicz
Principles of Fluorescence Spectroscopy
[Second Edition] **1999**
- [Lisgarten 2001] J. N. Lisgarten, M. Coll, J. Portugal, C. W. Wright, J. Aymami "Crystal Structure Of The Complex Of Cryptolepine-D(Cctagg)₂" The RCSB Protein Data Bank (PDB), **2001**, 1K9G, <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [Lodish 2004] H. Lodish, W H Freeman "Molecular Cell Biology" **2004**
- [Marras 2004] SAE Marras, B. Gold, F. R. Kramer, I. Smith, S. Tyagi, " Real-time measurment of in vitro transcription" *Nuc. Acids. Res* , **2004**, 32
- [Nie 1994] Nie, S., Chiu, D. T., and Zare, R. N., *Science* **1994**, 266, 1018–21
- [Park 2003] Dissertation C.W. Park
- [Rehm 1969] Rehm, D., Weller, A. Kinetik und Mechanismus der Elektronenübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril. *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* **1969**, 73, 834.

- [Perkin Elmer] <http://optoelectronics.perkinelmer.com/content/RelatedLinks/photodiode,%20phototransistor,%20ired%20data%20book.pdf>
- [Piestert 2003] O. Pistert, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, K. D. Weston, M. Sauer „A Single-Molecule Sensitive DNA Hairpin System Based on Intramolecular Electron Transfer, *Nano Letters*, **2003**, 3,7,979-982
- [Rigler 1990] R. Rigler, J. Widengren, B. Klinge, C. Owman, *BioScience* Vol. 3, **1990**, 180
- R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.*, 22, **1993**,169-175
- Ü. Mets, R. Rigler, J. Fluoresc, **1994**, 4, 259-264
- [Schwille] Fluorescence Correlation Spectroscopy
P. Schwille, E.Haustein. *Biophysics Textbook Online (BTOL)*.
<http://www.biophysics.org/education/schwille.pdf>
- [Tittmann 2000] K. Tittmann, R. Golbik, S. Ghisla G. Hübner
J. Biol. Chem. **2000**, (39), 10747-10754
- [Twyman 2004] Twyman, R. M. **2004**. Principles of proteomics.
BIOS Scientific Publishers, New York

- [Tyagi1996] Tyagi S and Kramer FR, Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. *Nature Biotechnology* **1996**,14, 303-308.
- 2 Tyagi S, Bratu DP and Kramer FR, Multicolour molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology*, **1998**,16, 49-53.
- 3 S.A.E. Marras, and S. Tyagi, Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, **1999**,14, 151-156.
- 4 Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A and Kramer FR, Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci* 96:6171±6176 (1999).
- [Voet 2002] D. Voet, J.G. Voet C.W. Pratt, Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH
- [Wallace 2001] M. Wallace, L. Ying, S. Balasubramanian, D. Klenerman " Non-Arrhenius kinetics for the loop closure of a DNA hairpin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 98, 5584-5589.

[Wohlfahrt 1999]

Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg,
D., Kalisz, H. M., Hecht, H. J.

<http://www.rcsb.org/pdb/> : Research

Collaboratory for Structural Bioinformatics

(RCSB) 1CF3, **1999**

Danksagung

Ich danke allen, die diese Arbeit durch ihre Unterstützung ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum und Prof. Dr. Markus Sauer für die interessante Themenstellung und ihre stetige Unterstützung,

Richard Parlitz für die anregenden Diskussionen biochemischer Problemstellungen

Dr. Volker Buschmann, Dr. Philip Tinnefeld und Dr. Jörg Enderlein für die Einführung in die Welt der Einzelmolekülspektroskopie

Dr. Chris Bieler für viele hilfreiche Diskussionen chemischer Fragestellungen,

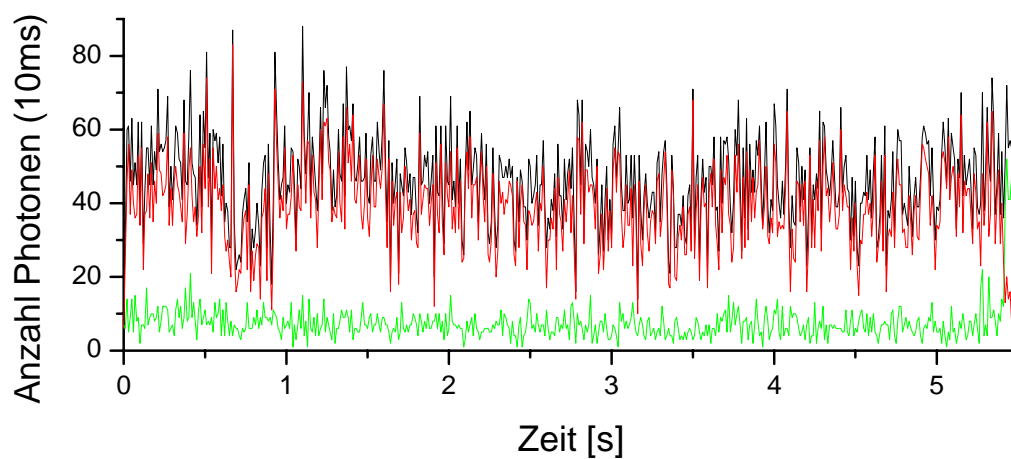
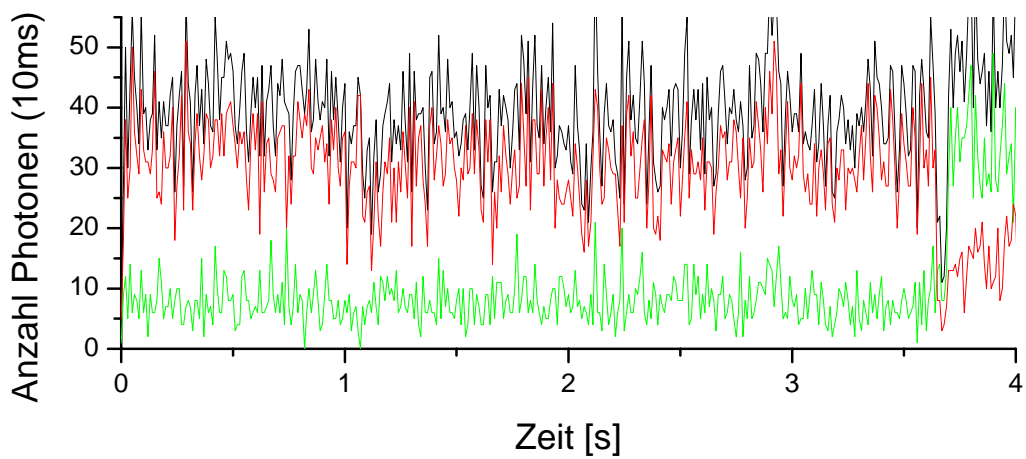
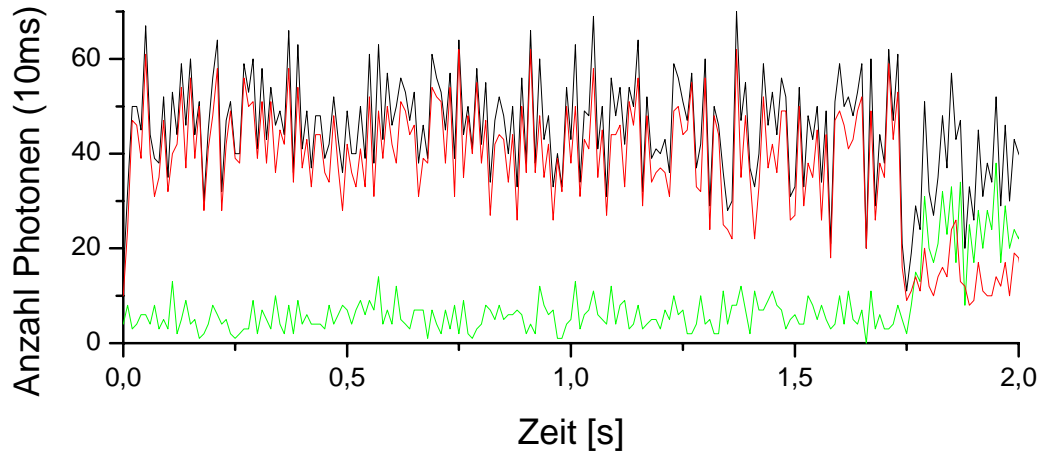
Prof. Dr. David Nesbitt und Jose Hodak für die Möglichkeit den Umgang mit RNA zu erlernen.

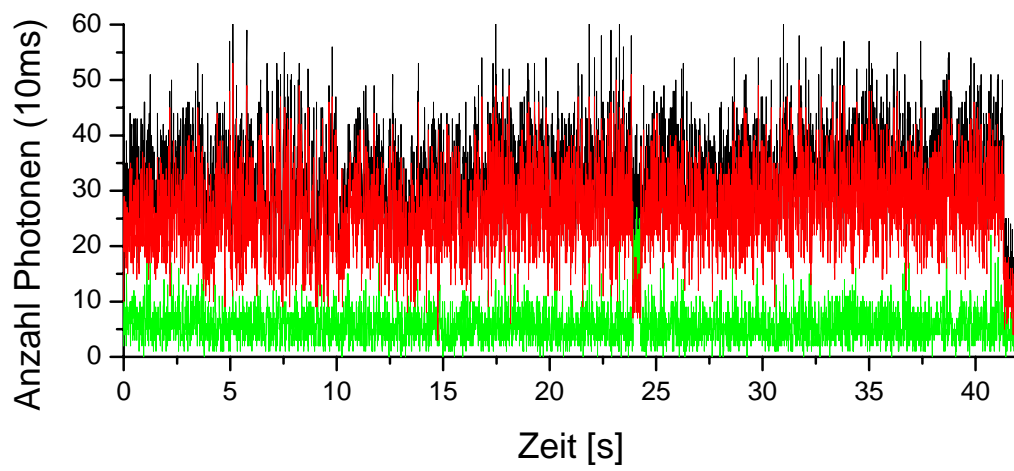
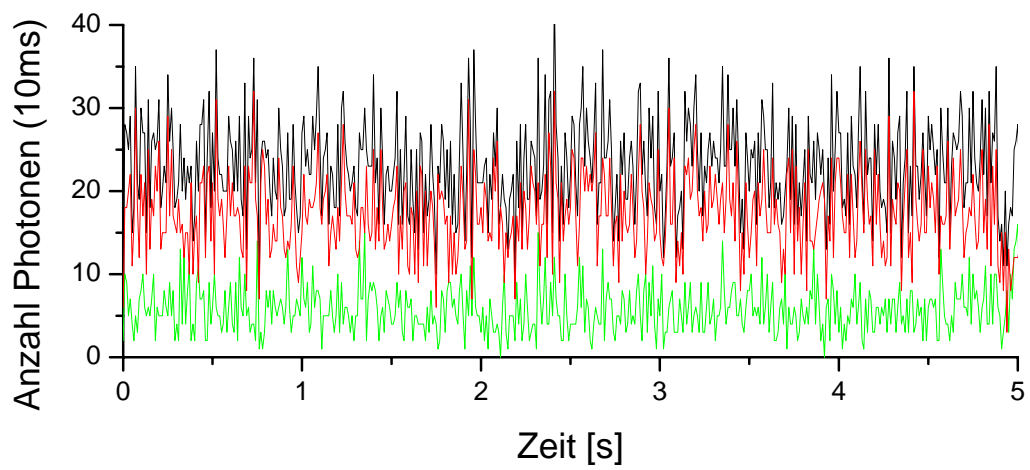
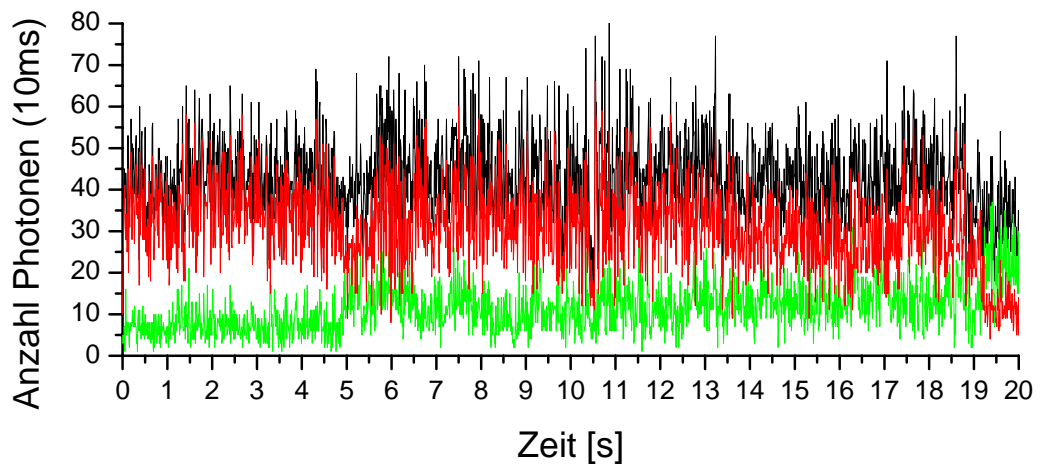
Prof. Dr. Kenneth Weston und Dr. Dirk-Peter Herten für die Einführung in die LabView-Programmierung und die Programmierung eines Teils des Messprogramms.

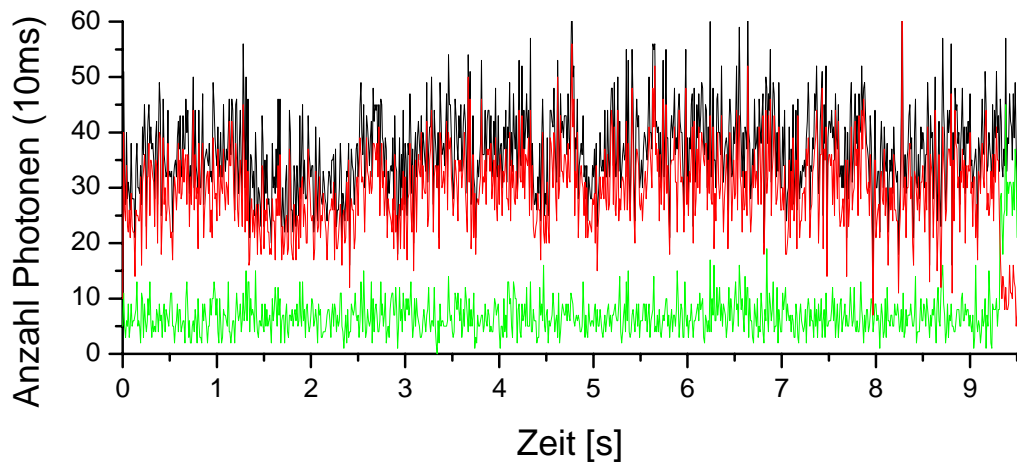
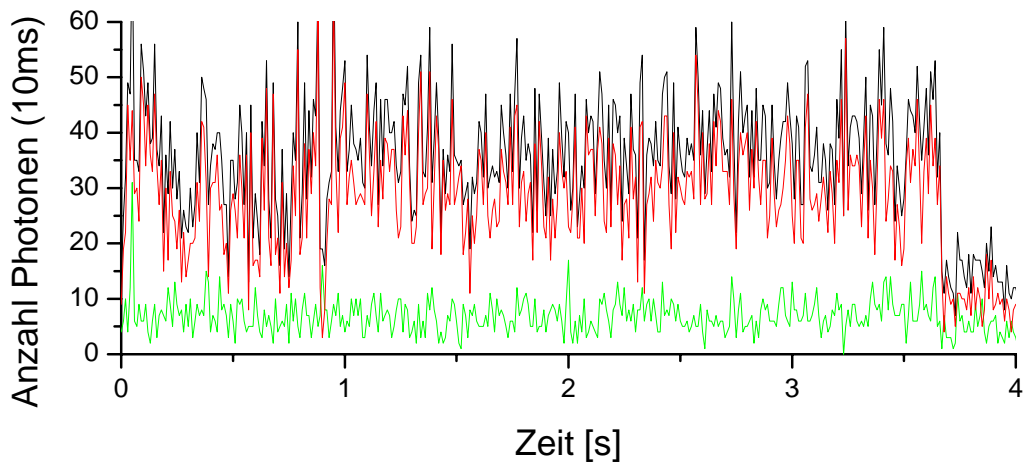
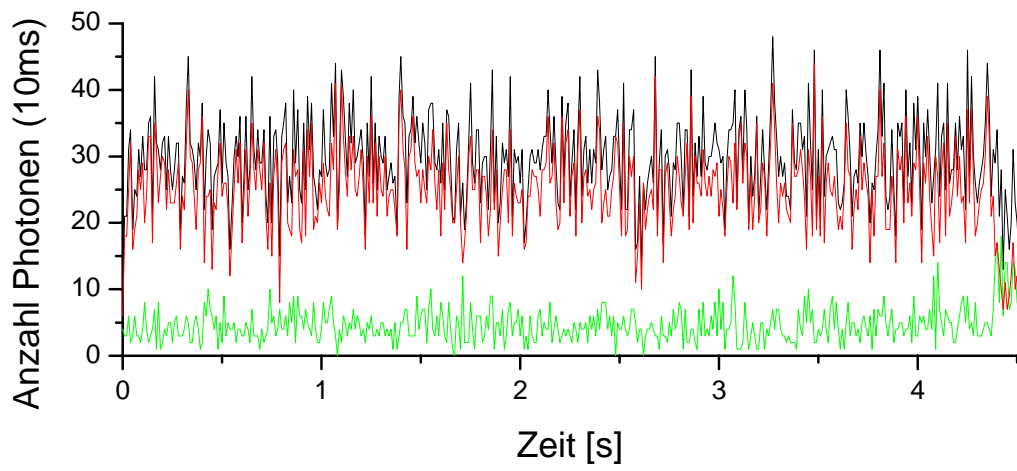
Hannes Barsch, Dr. Kyung-Tae Han, Mike Heilemann, Dr. Thomas Heinlein, Alexander Kiel, Dr. Christian Müller, Dr. Hannes Neuweiler, Christian Roth, Pia Schlüter, Daniel Siegberg und Katharina Stöhr für ihre freundliche Zusammenarbeit,

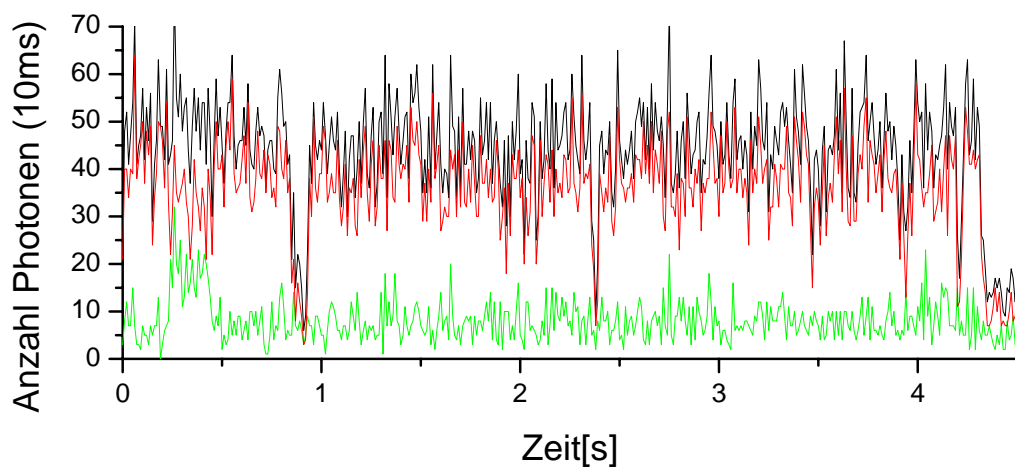
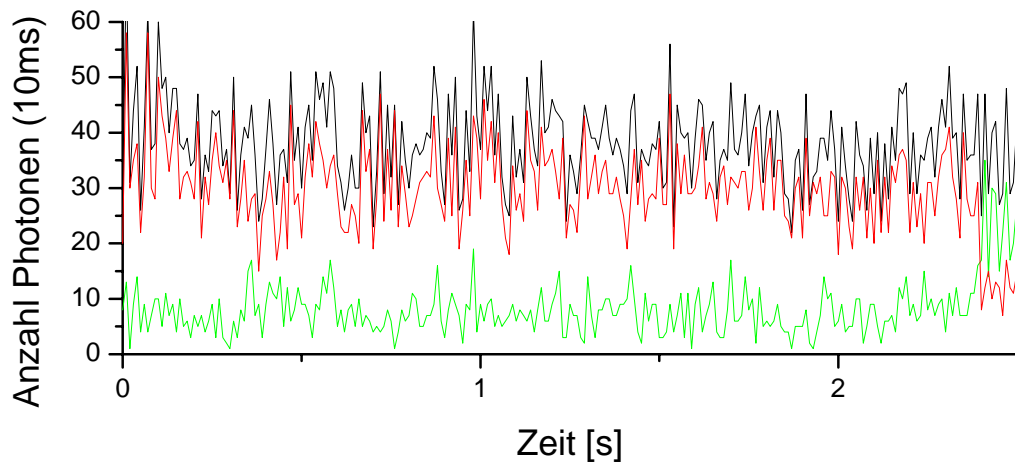
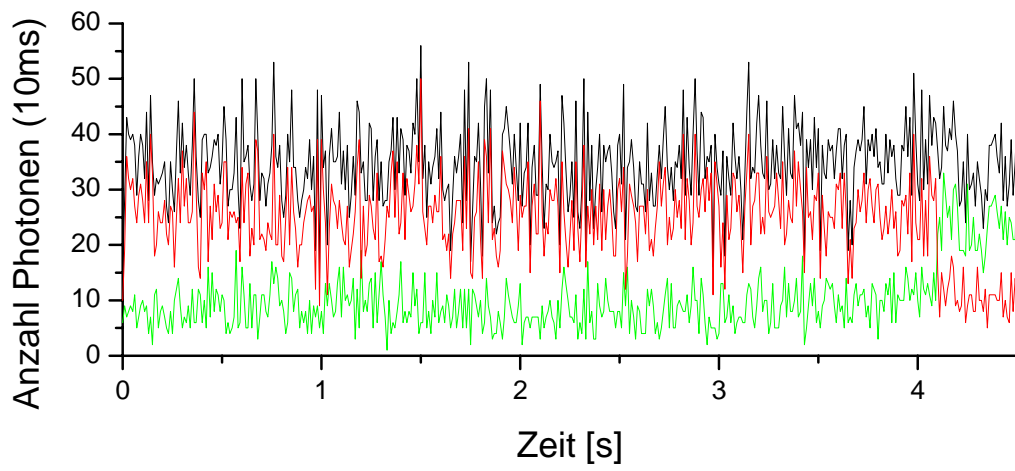
Meiner Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

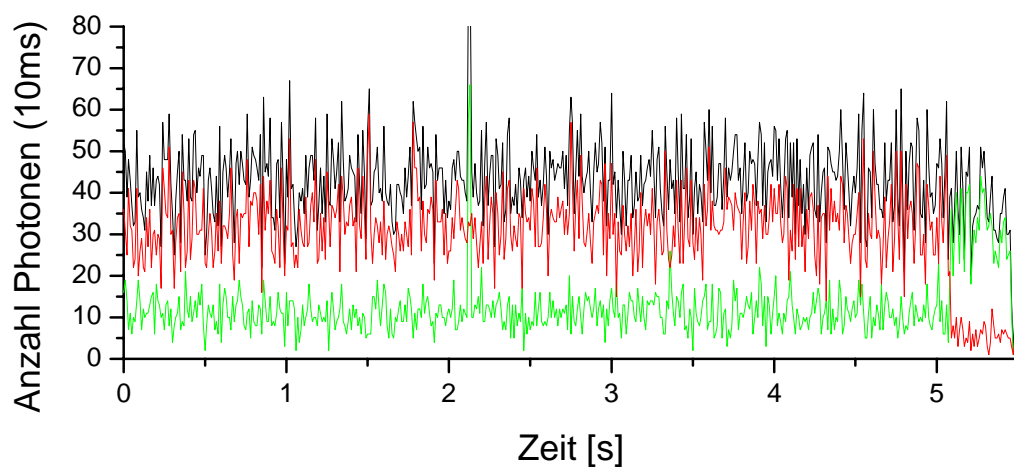
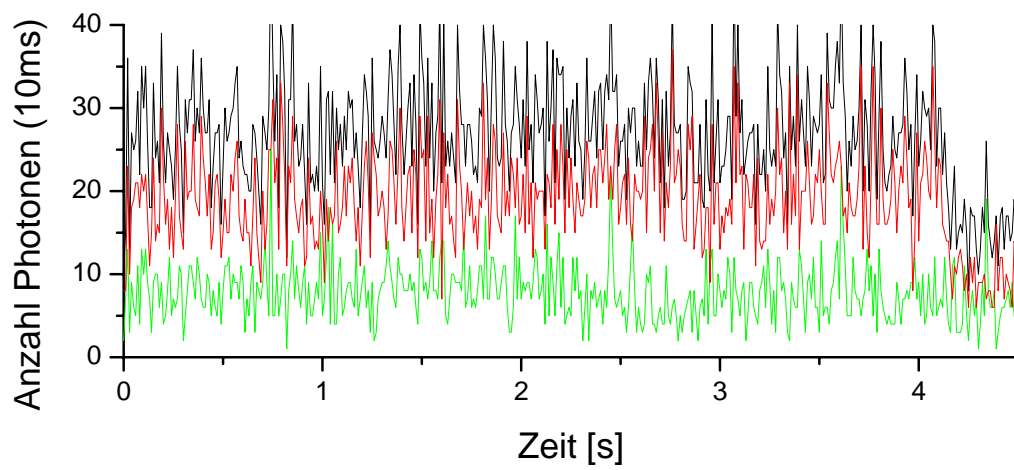
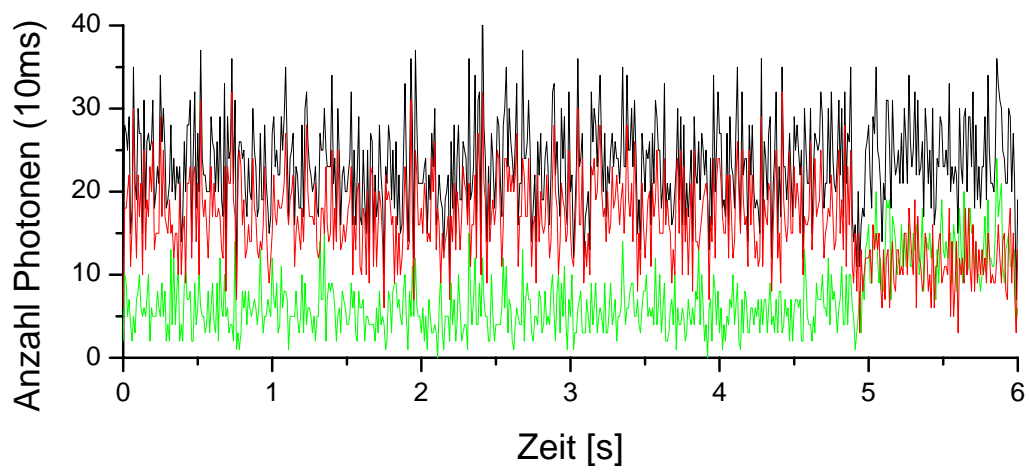
FRET-Hairpin in Tris-Puffer 200 mM KCl



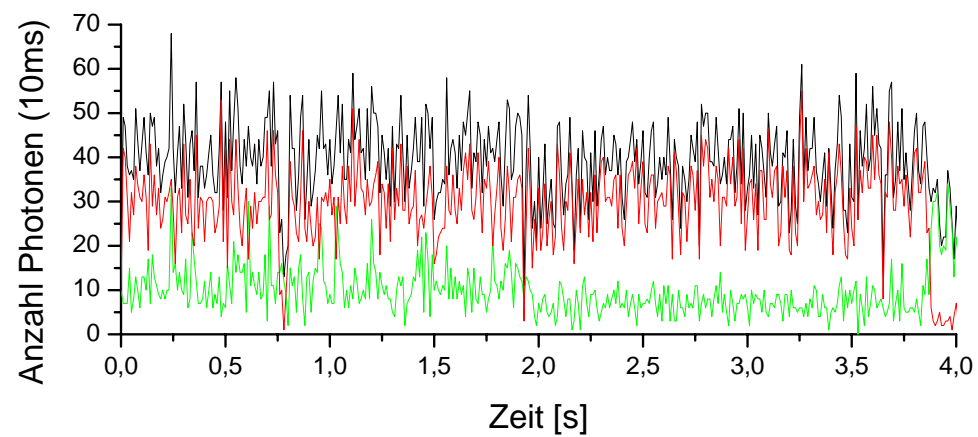
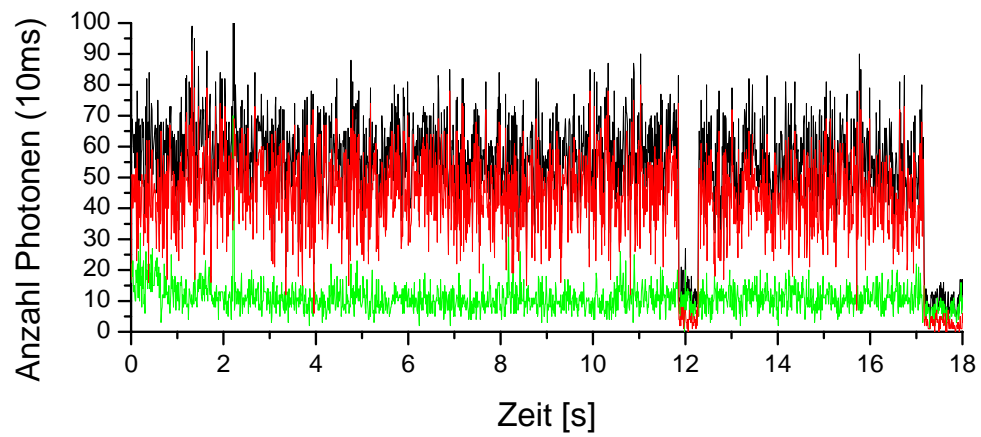
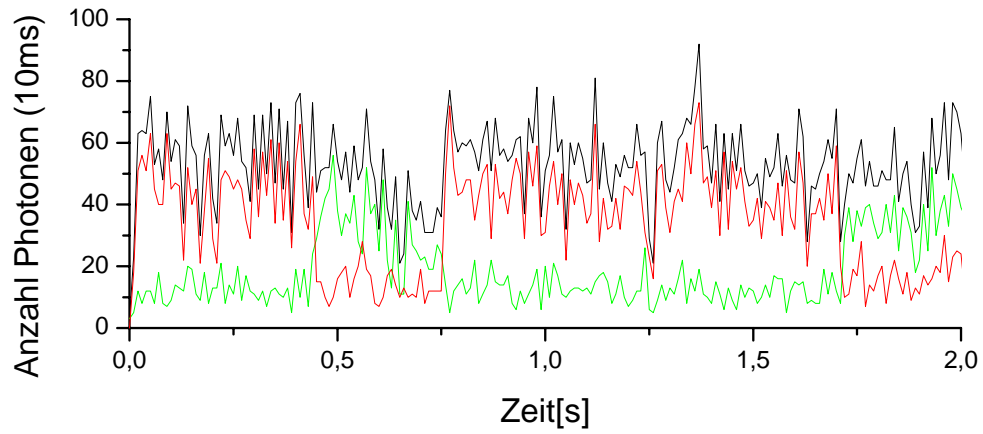


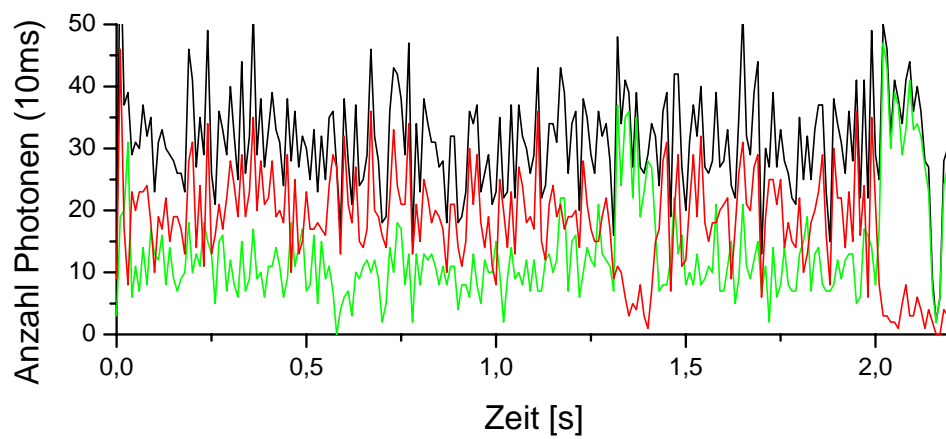
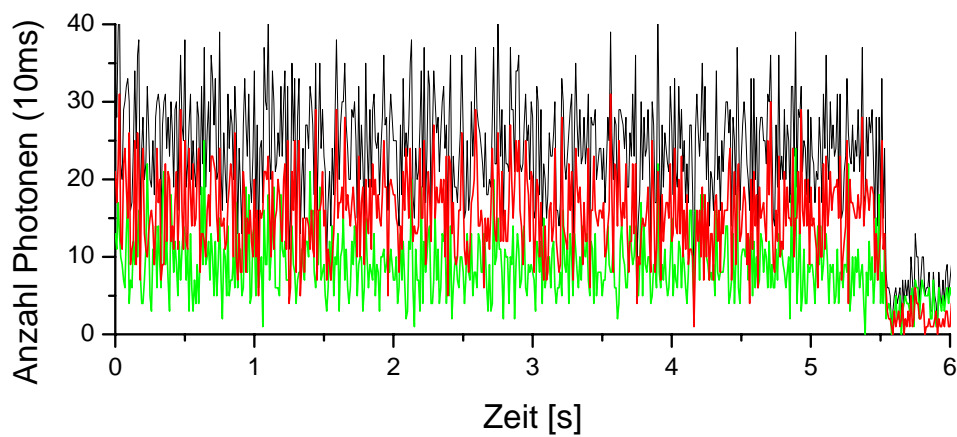
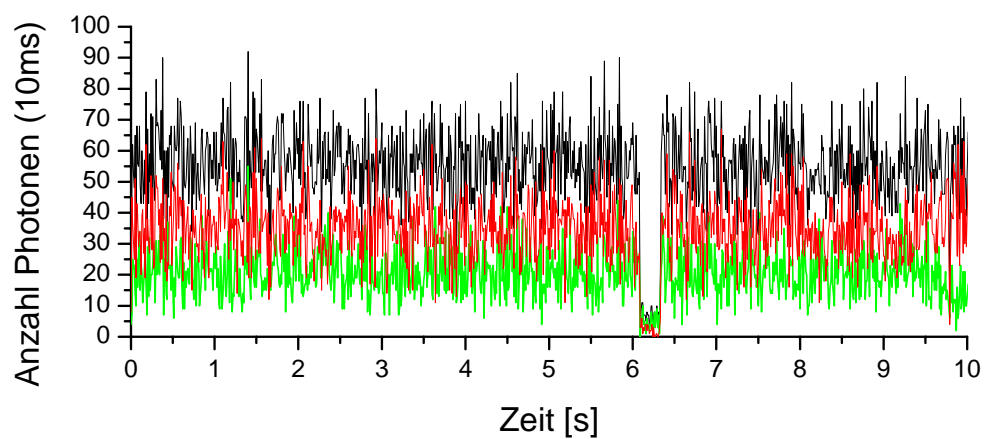


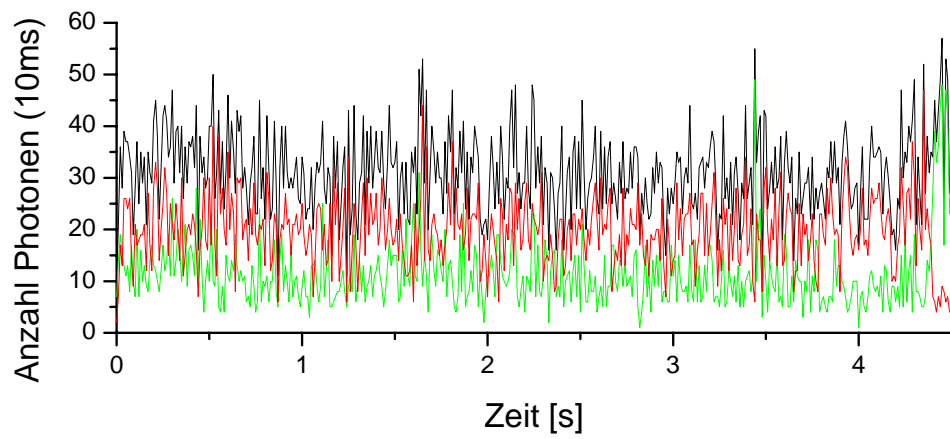
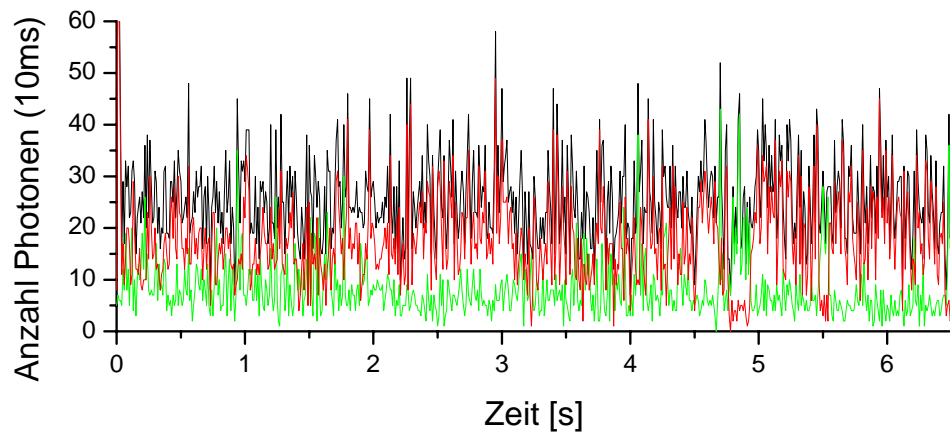
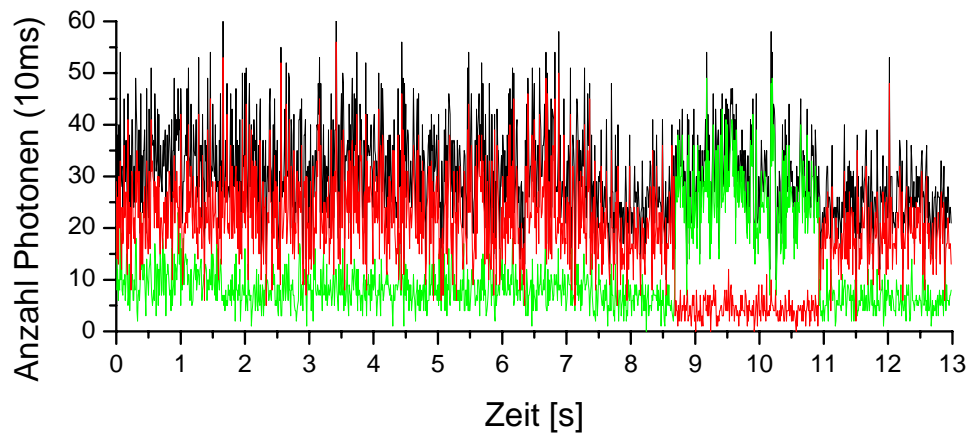


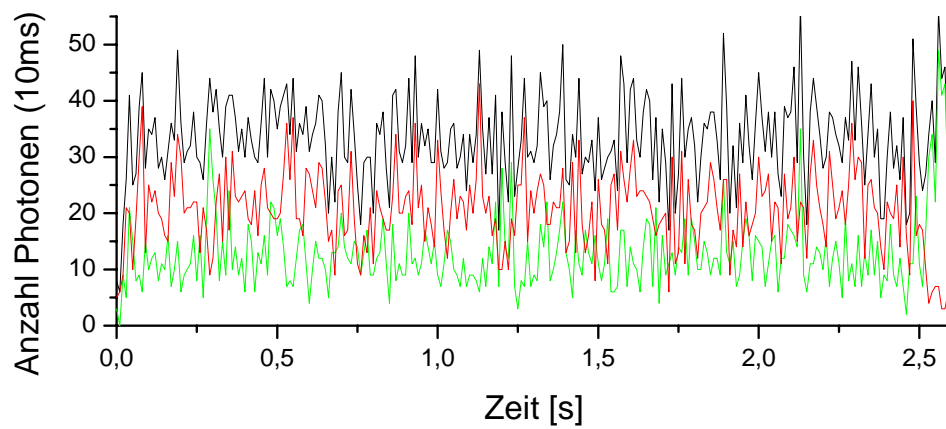
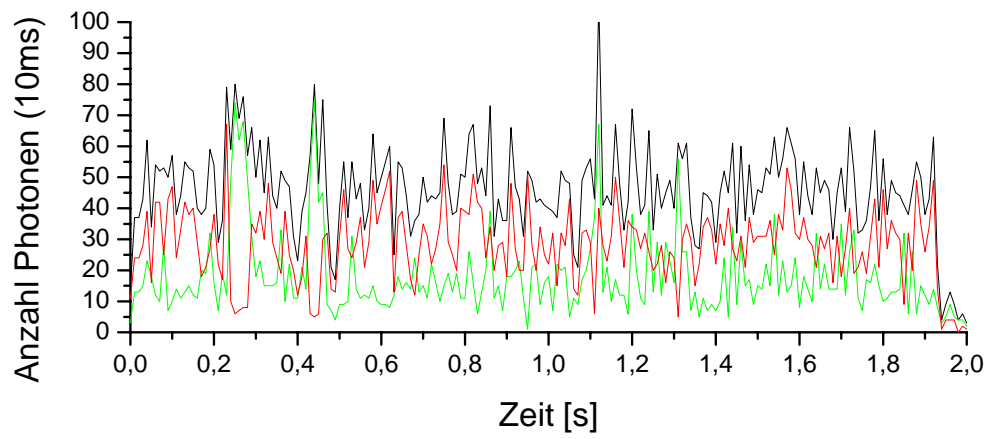
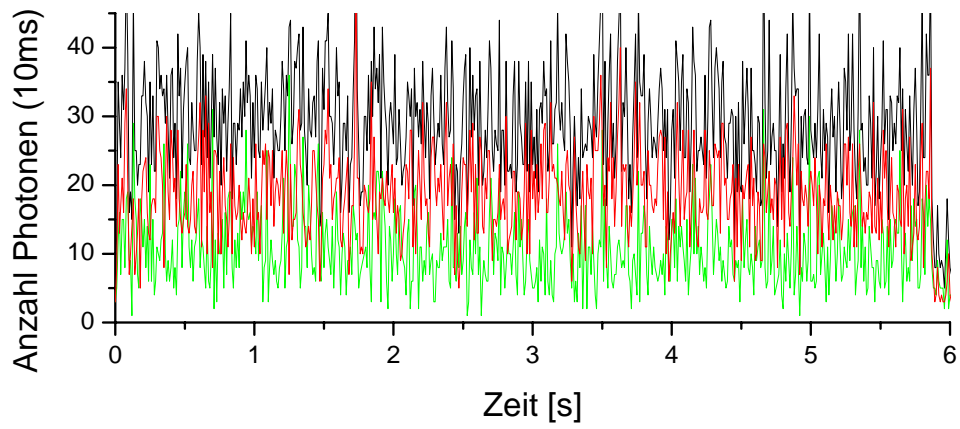


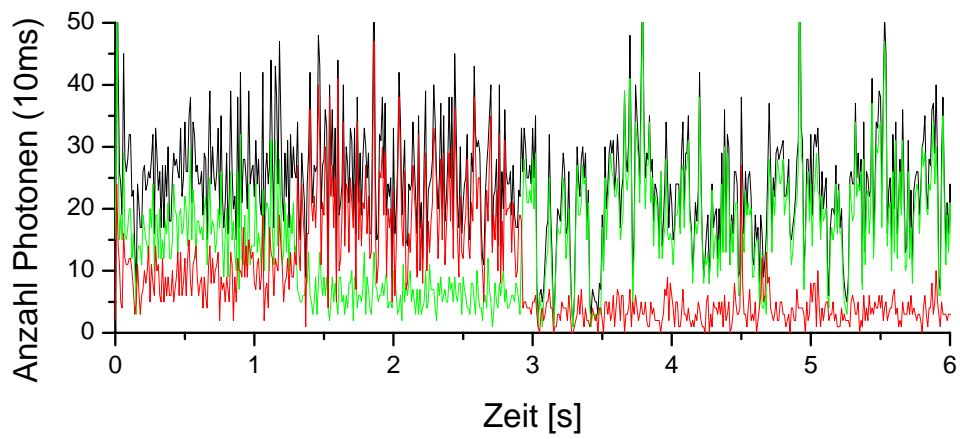
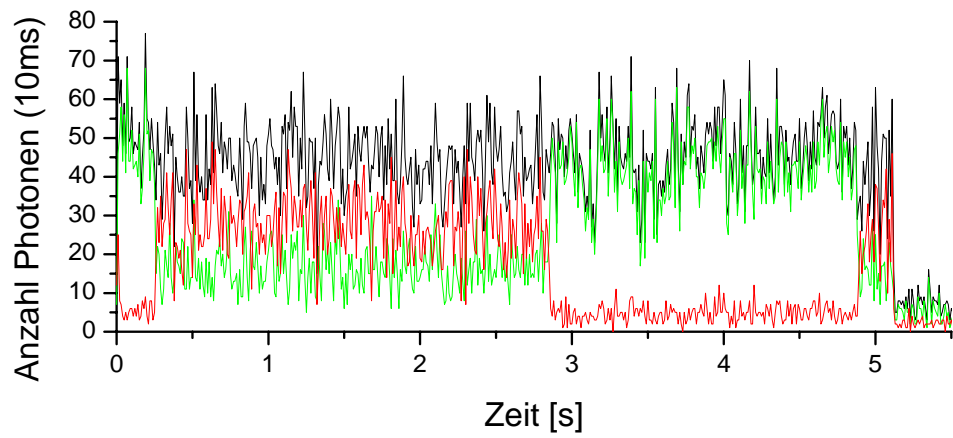
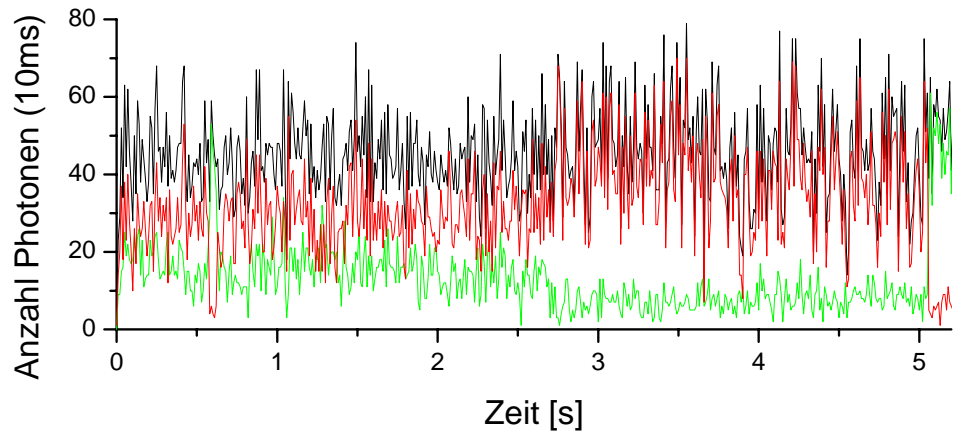
FRET-Hairpin in Tris-Puffer 0 mM KCl



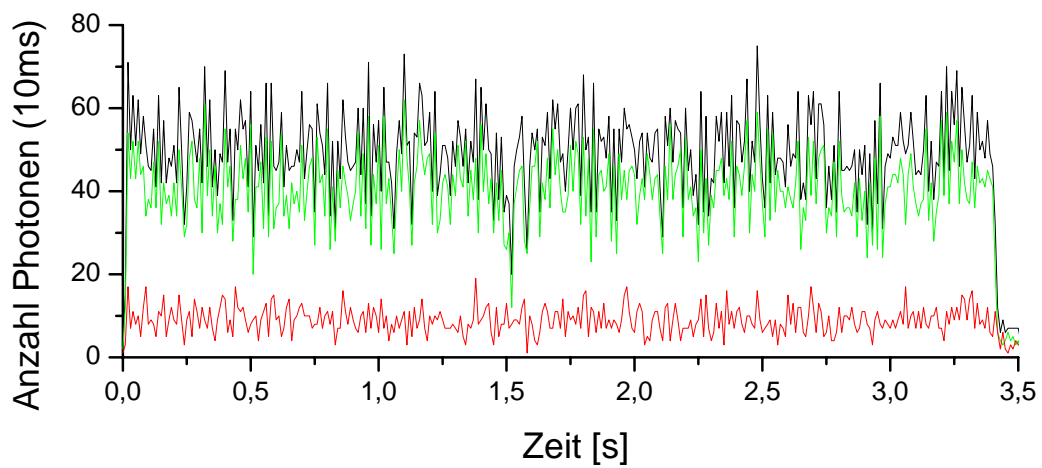
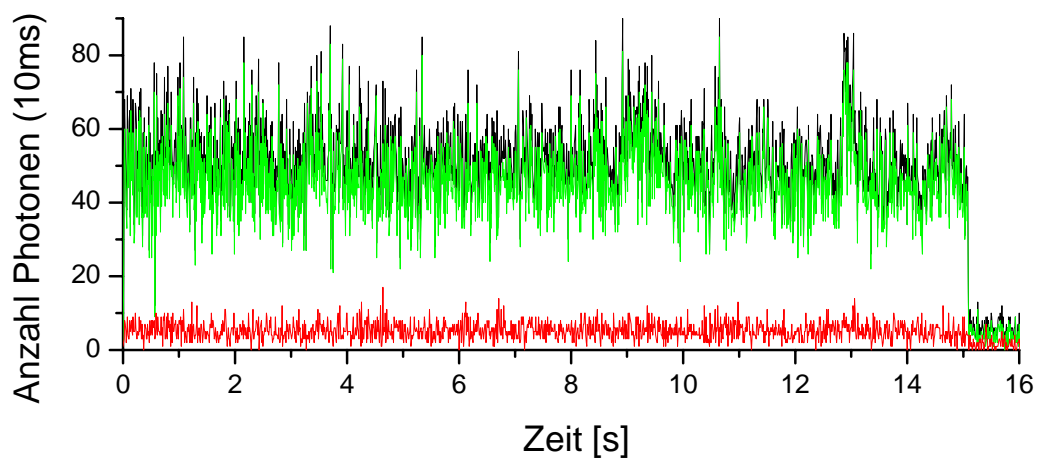
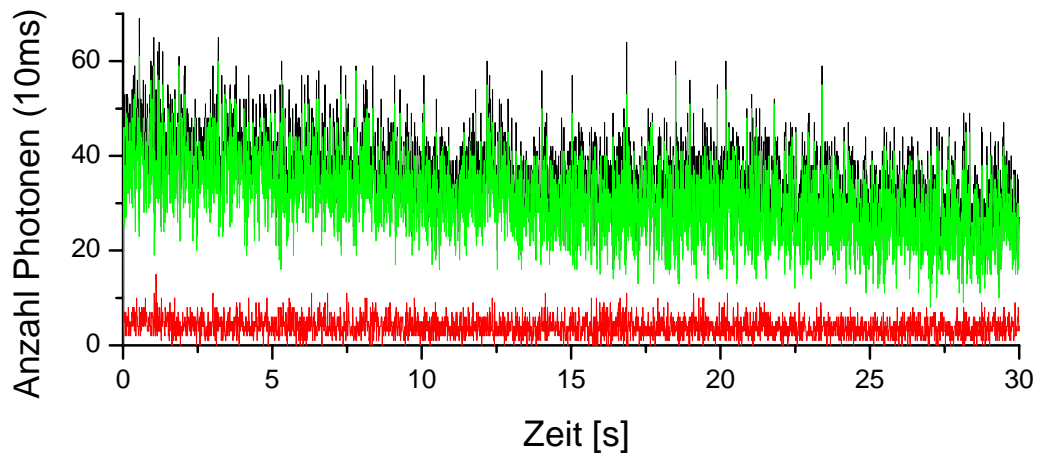


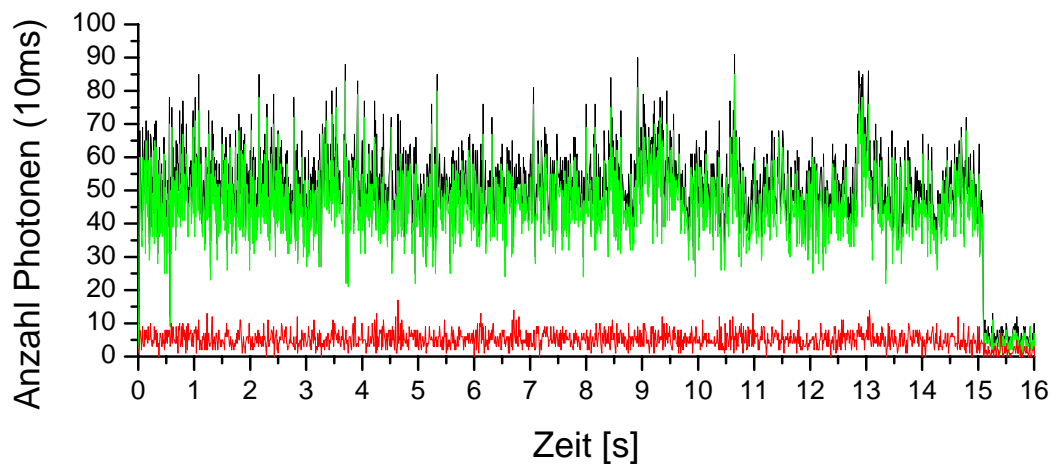
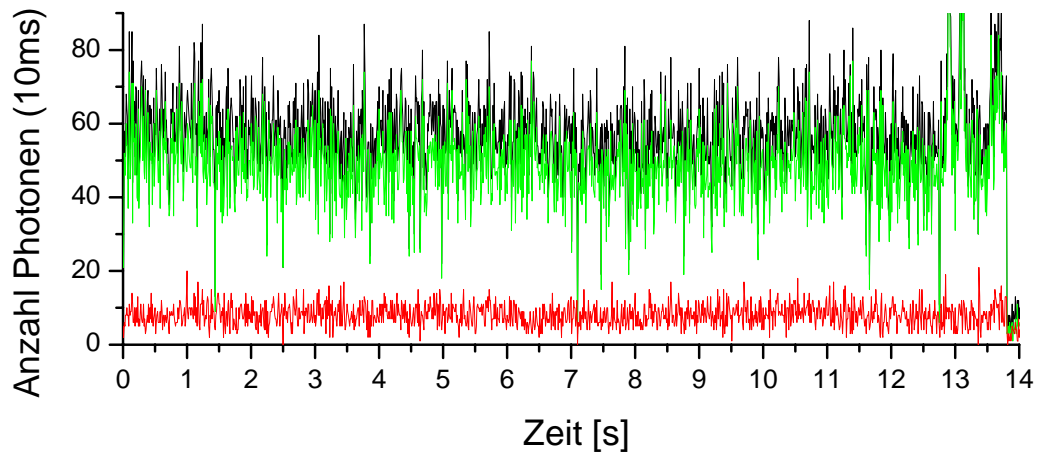
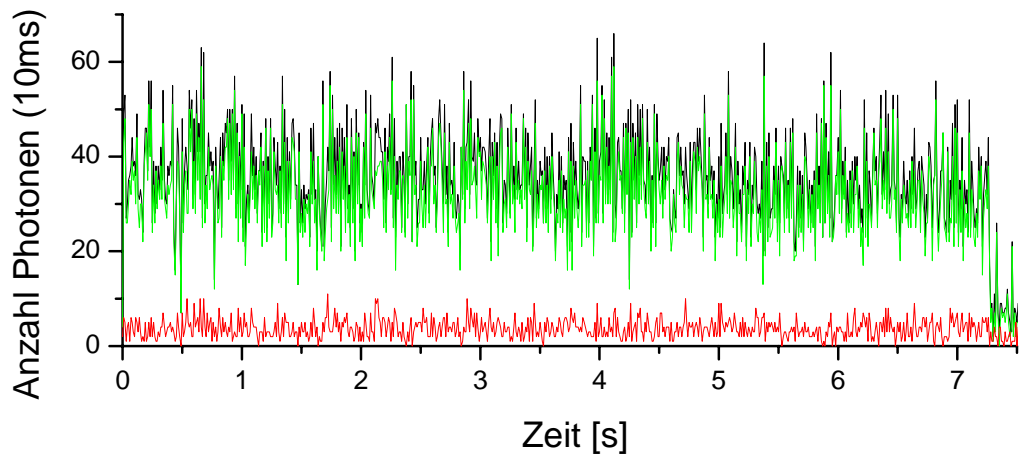


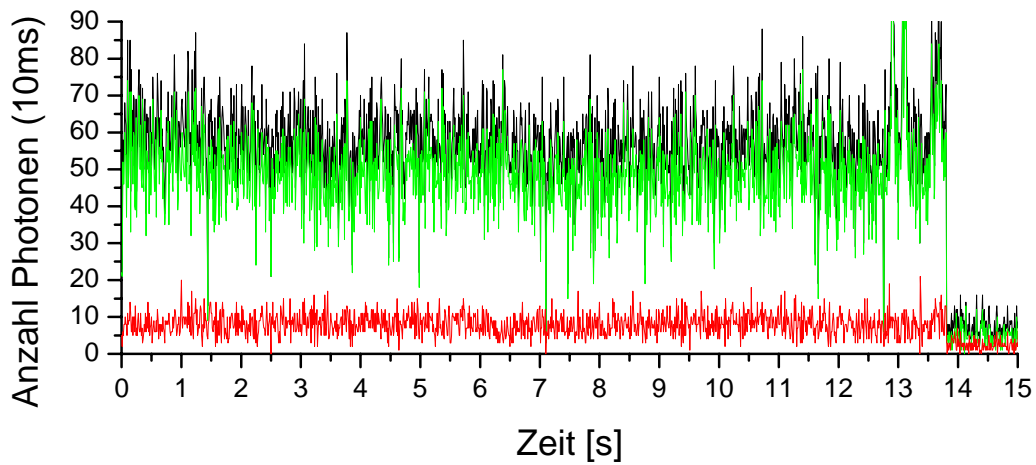
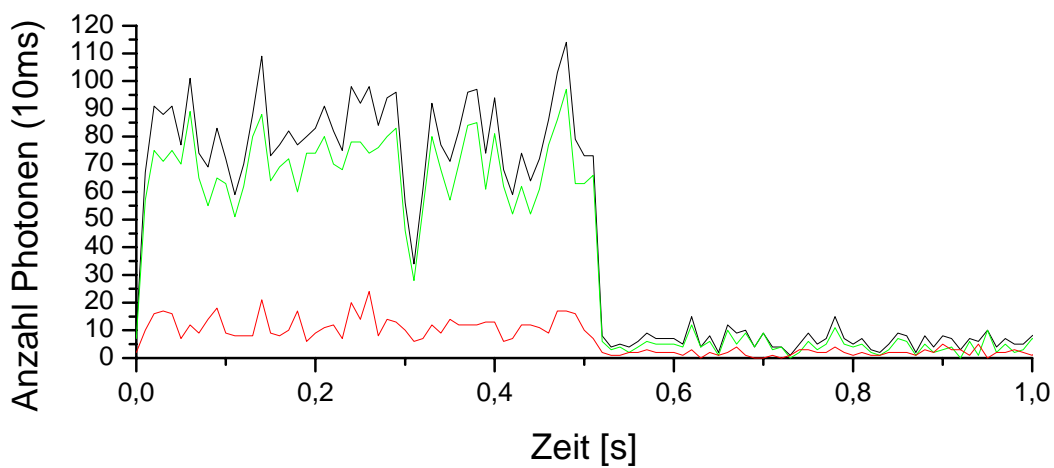
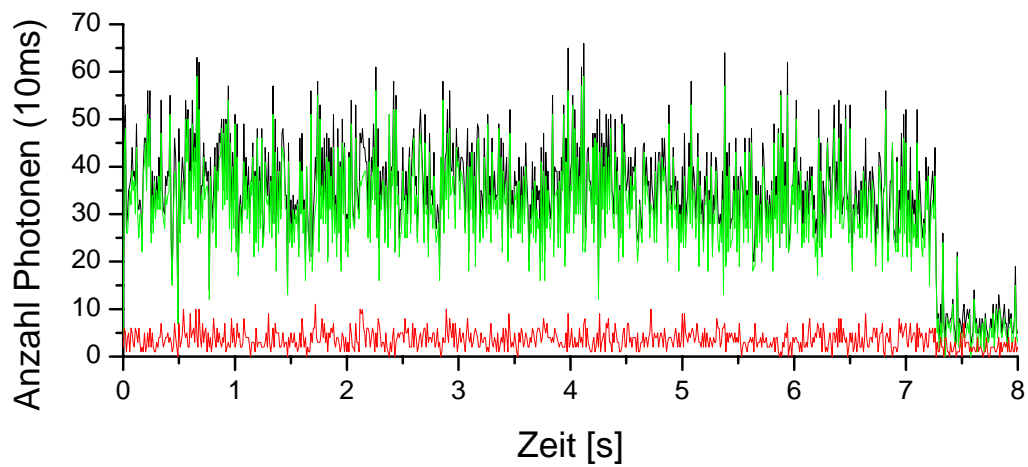




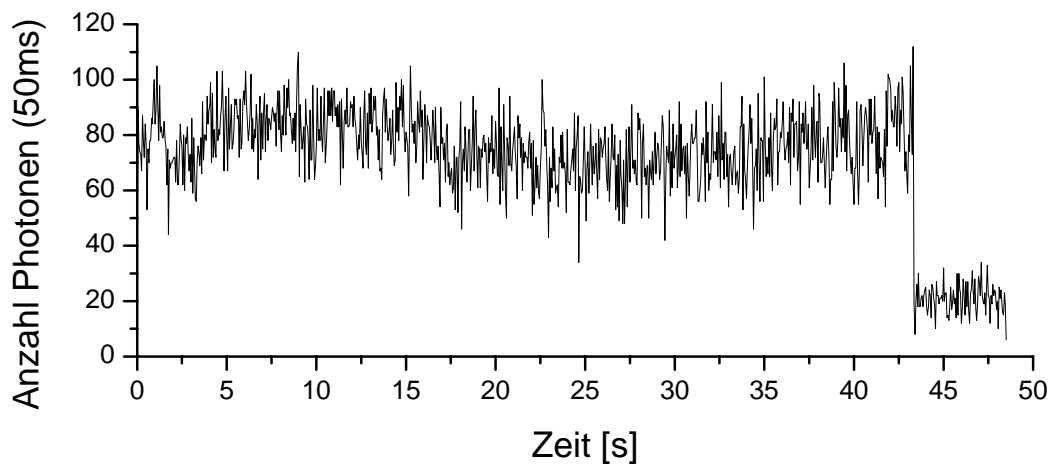
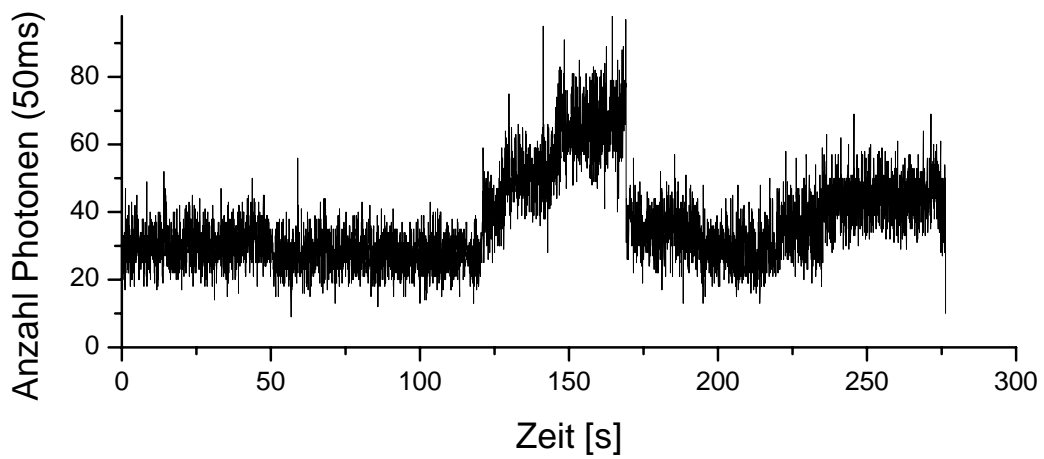
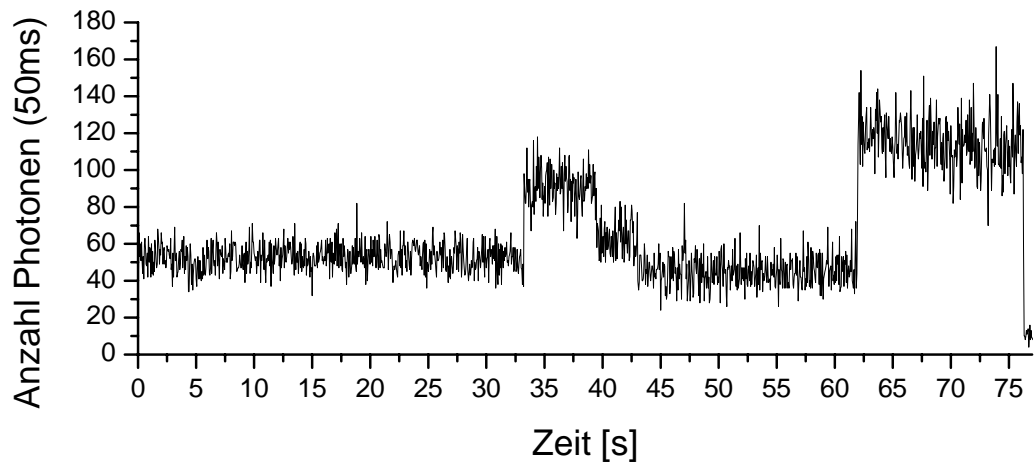
FRET – Hairpin mit Gegensequenz geöffnet

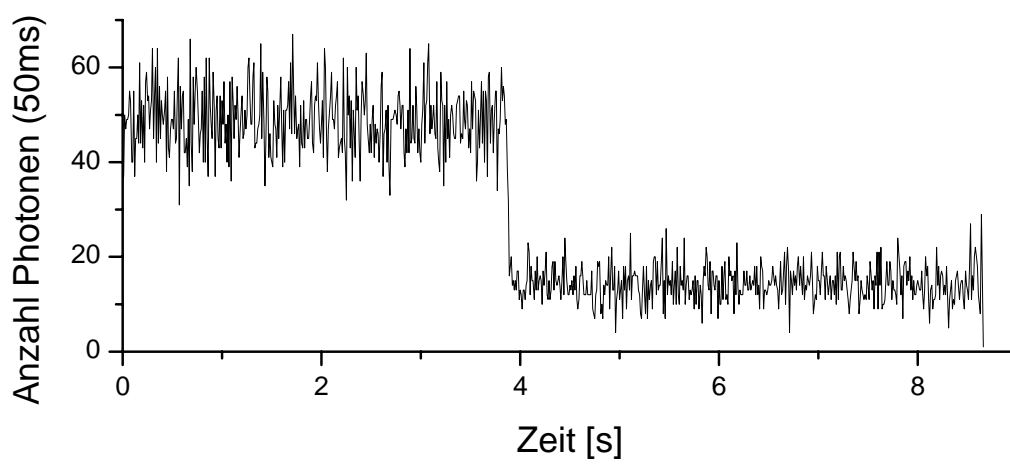
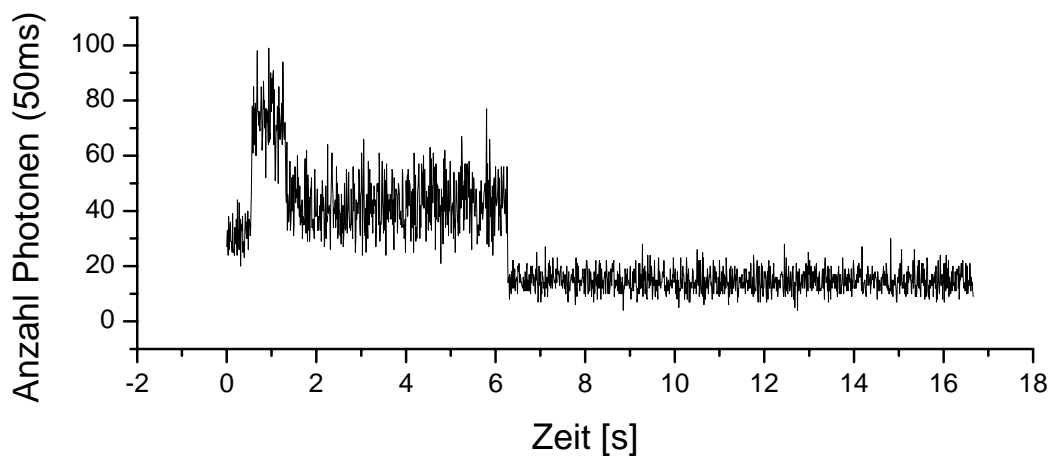
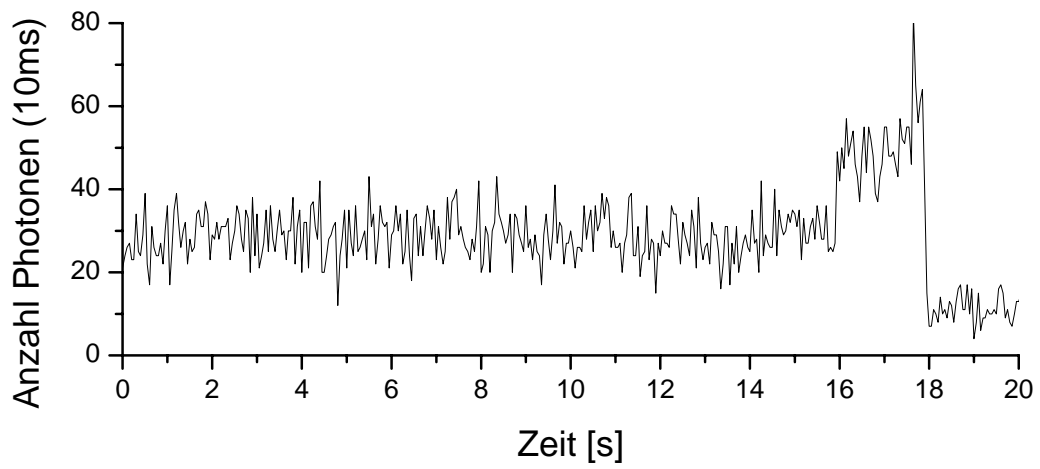


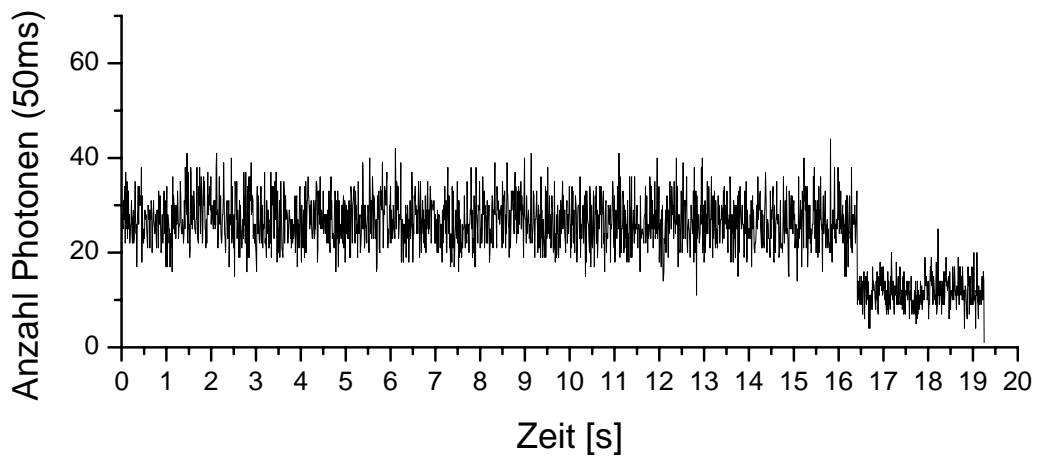
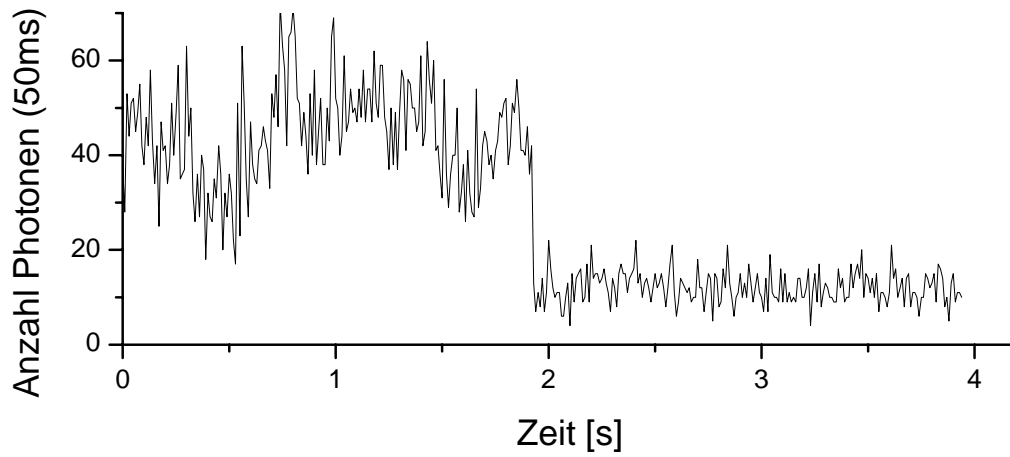
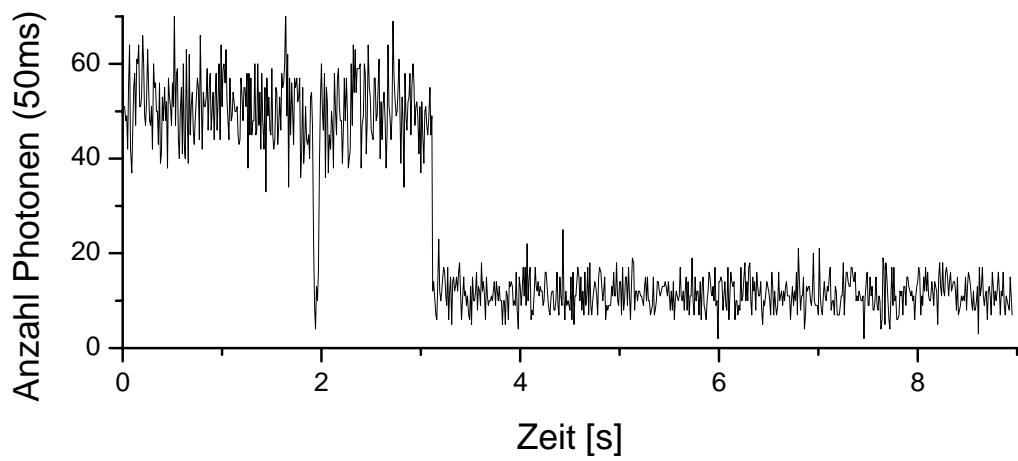


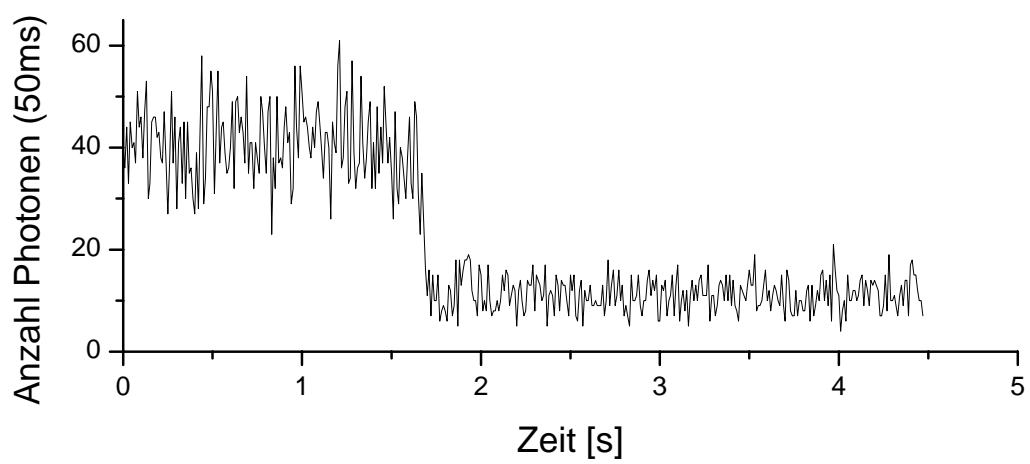
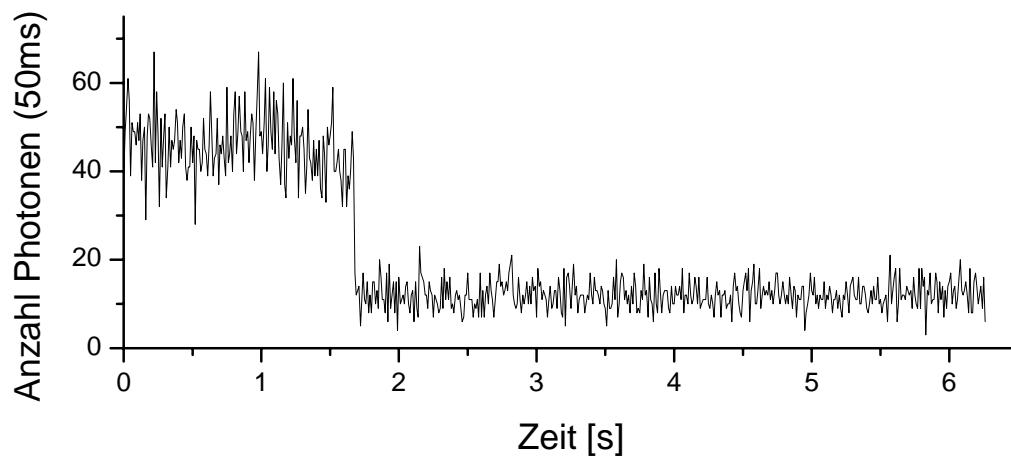
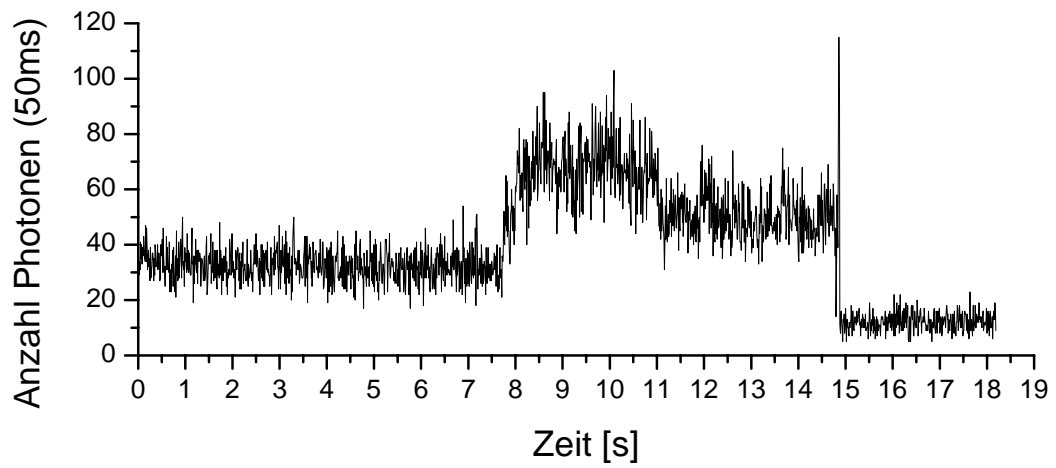


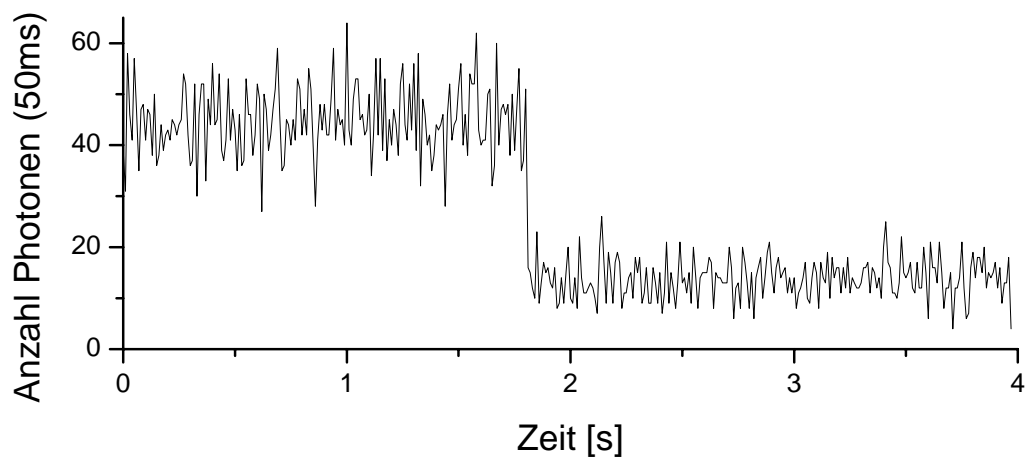
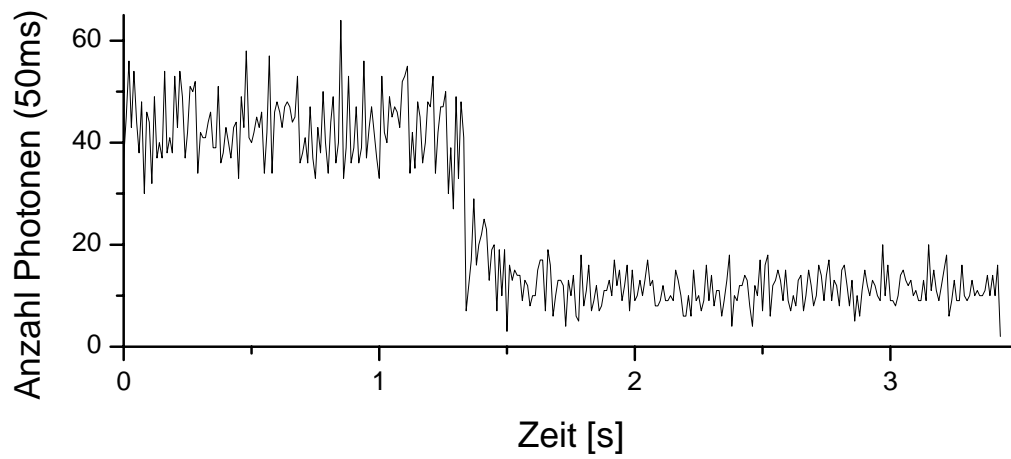
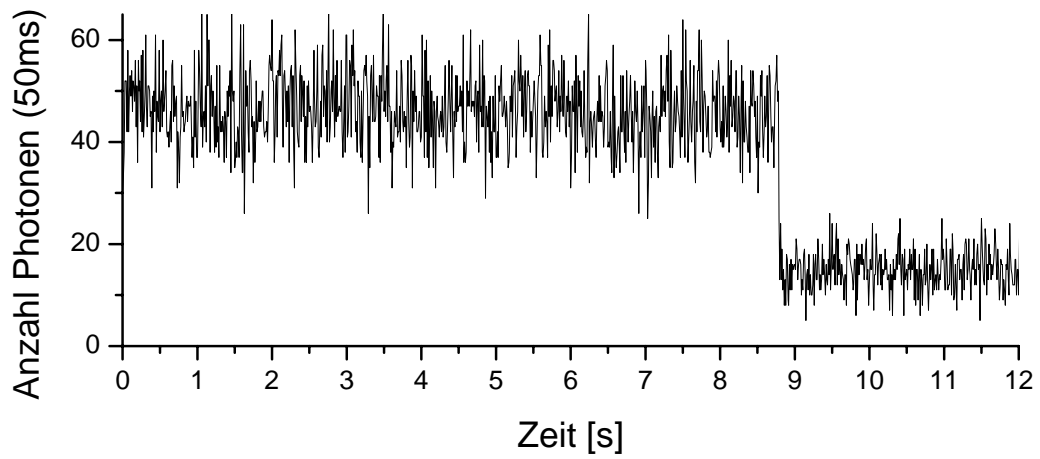
PET-Hairpin in Tris-Puffer 200 mM KCl



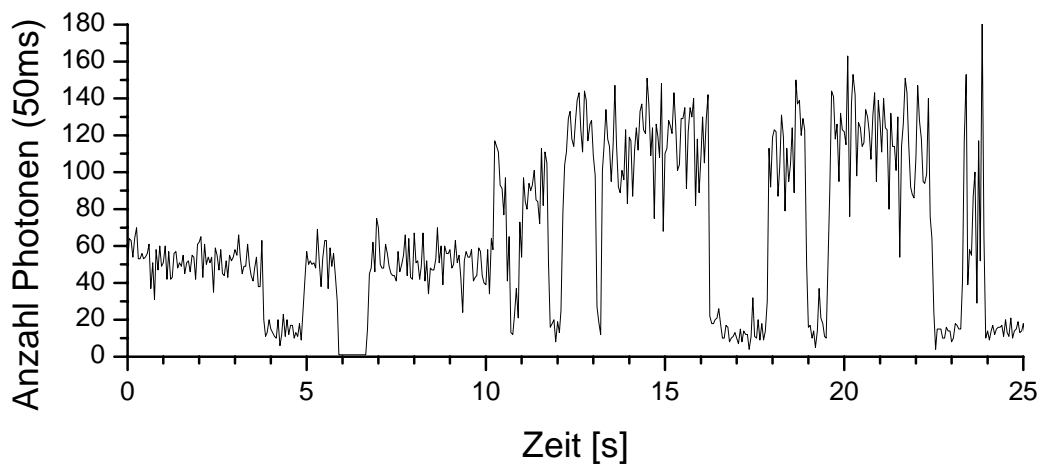
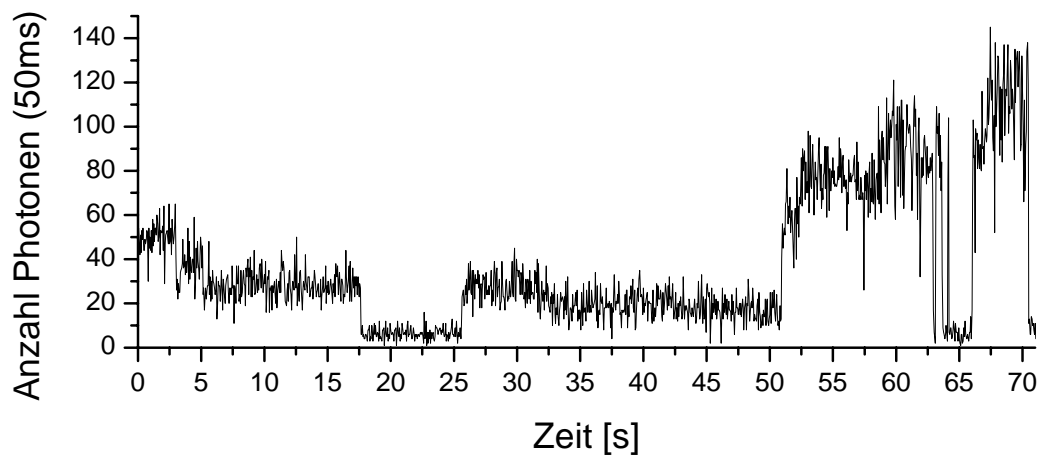
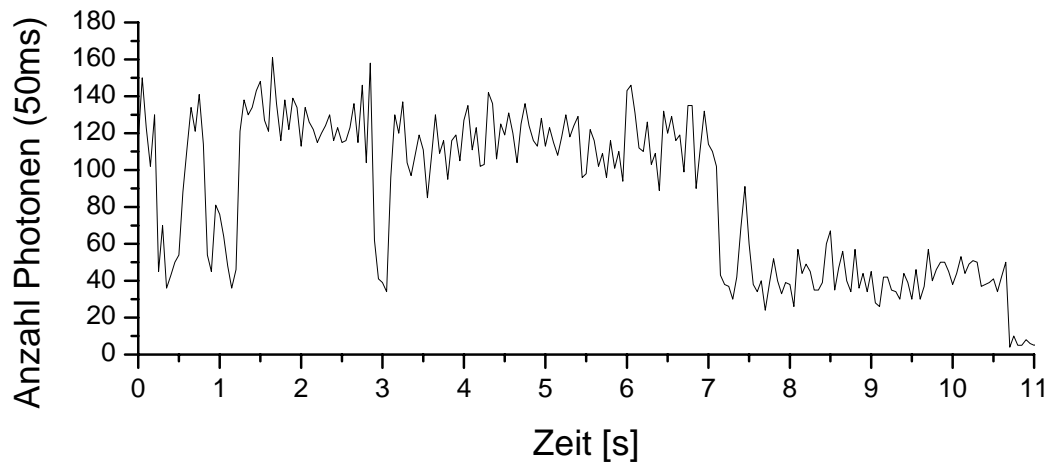


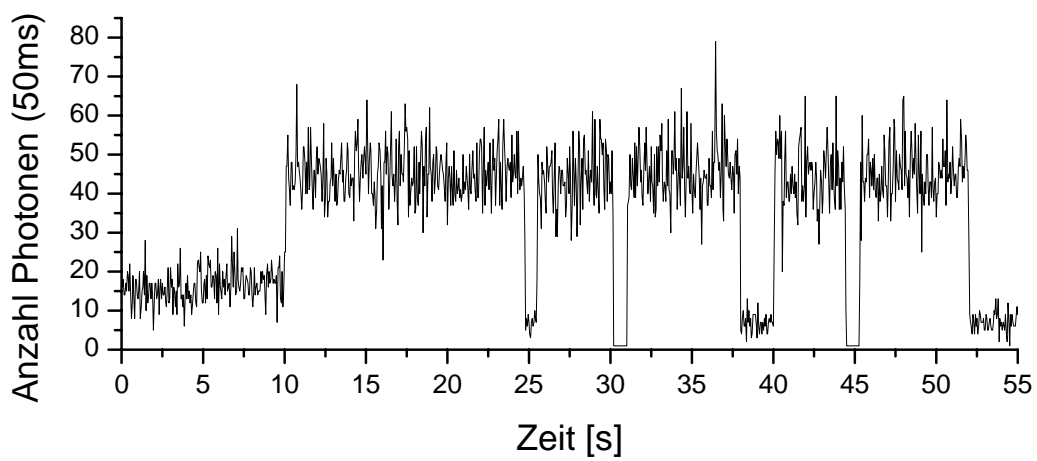
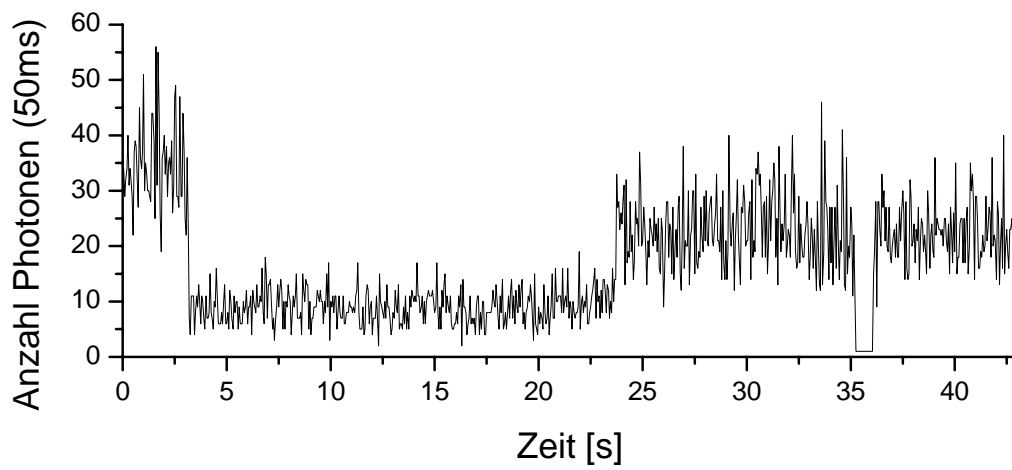
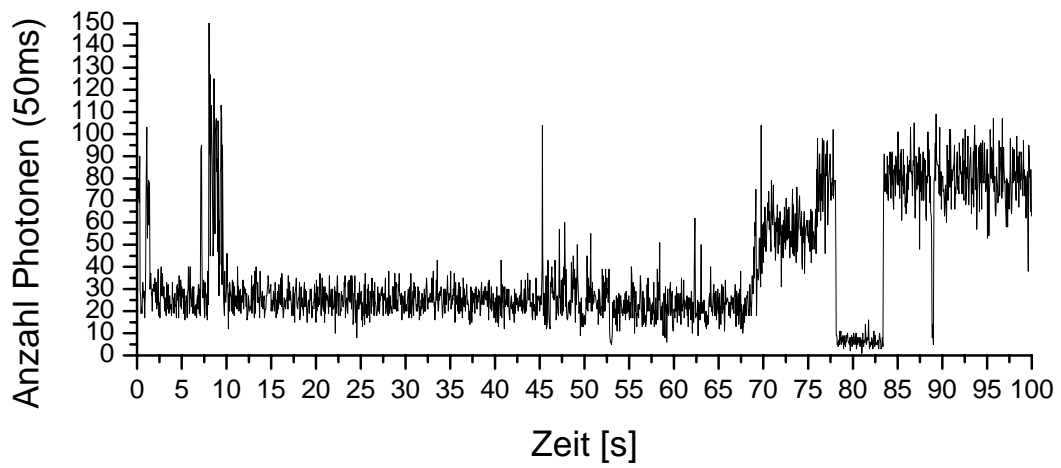


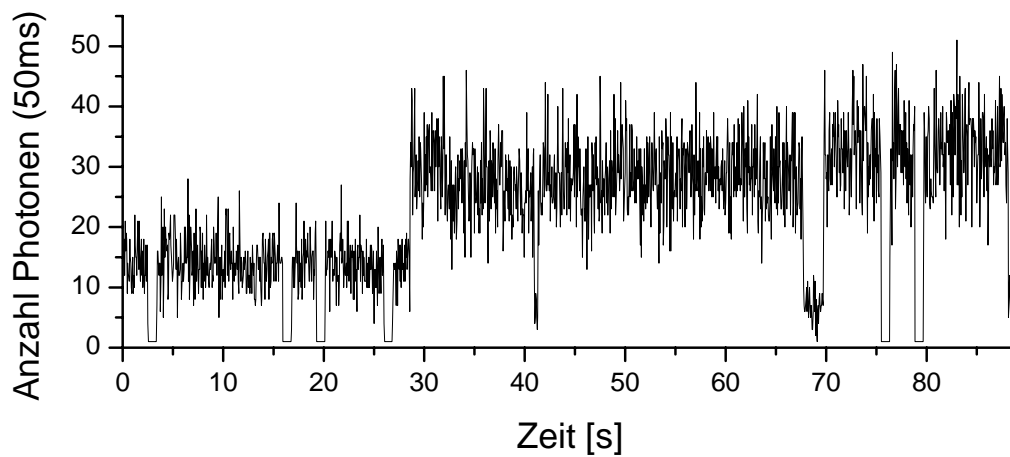
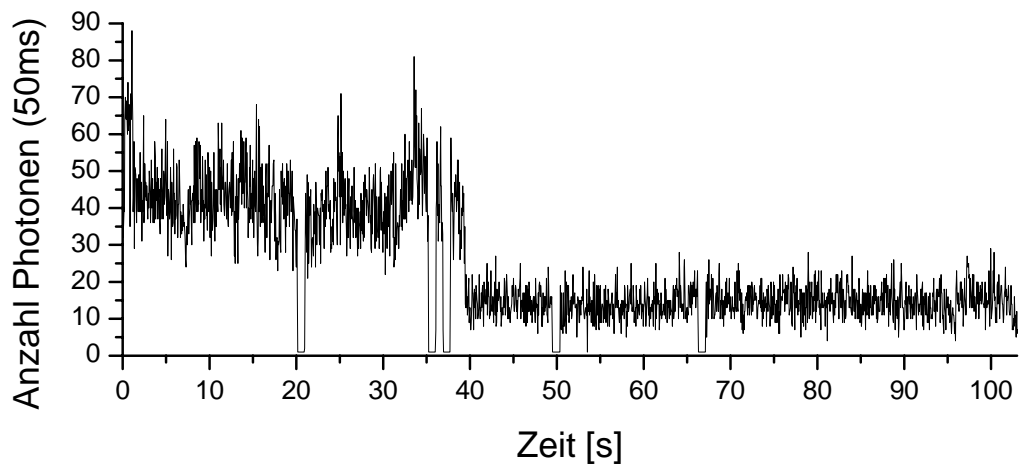
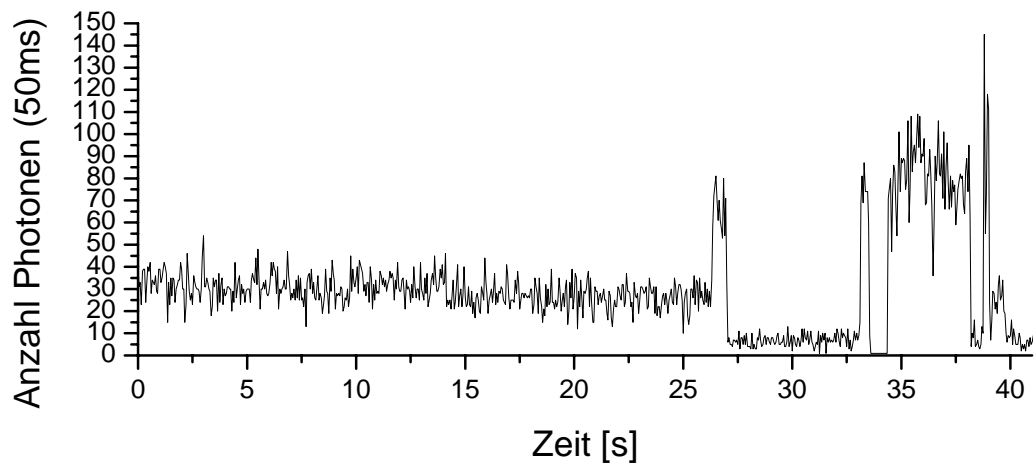


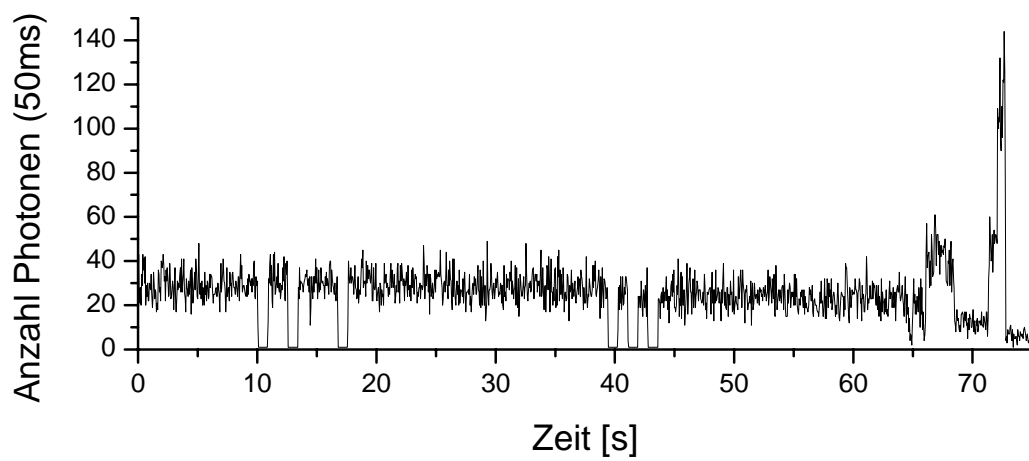
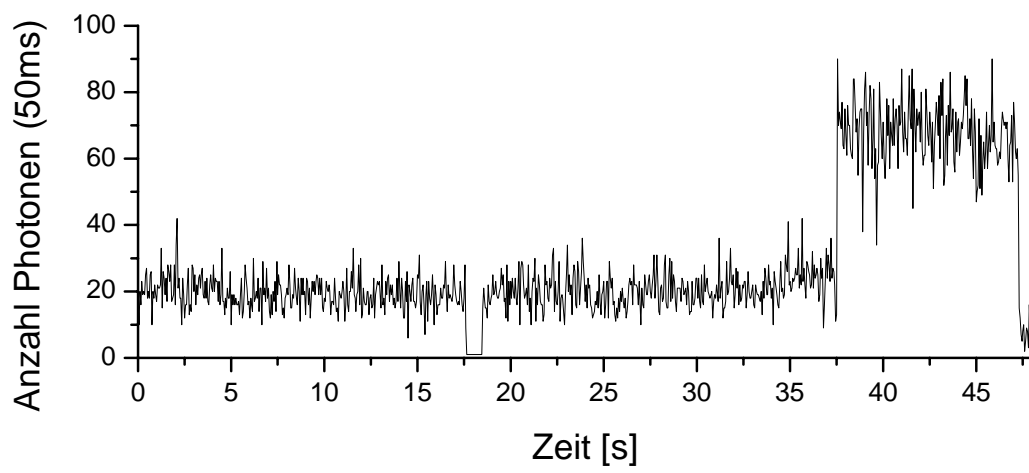
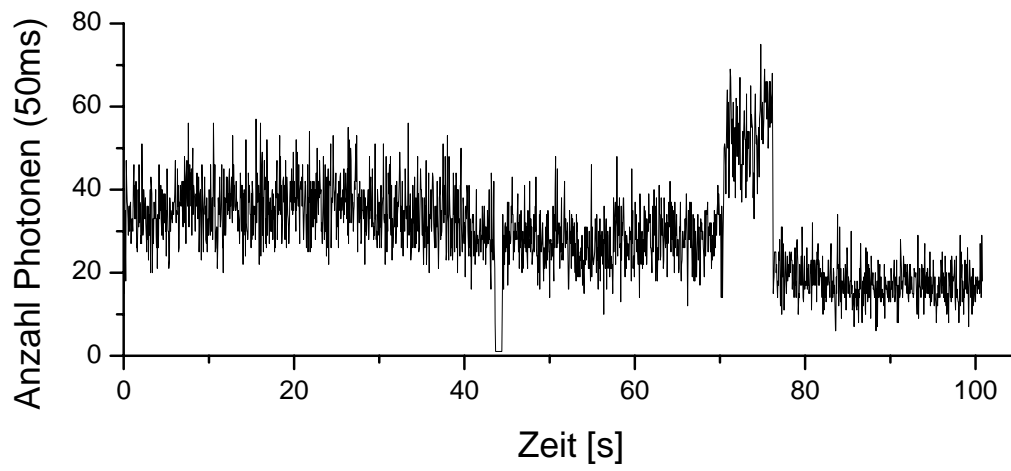


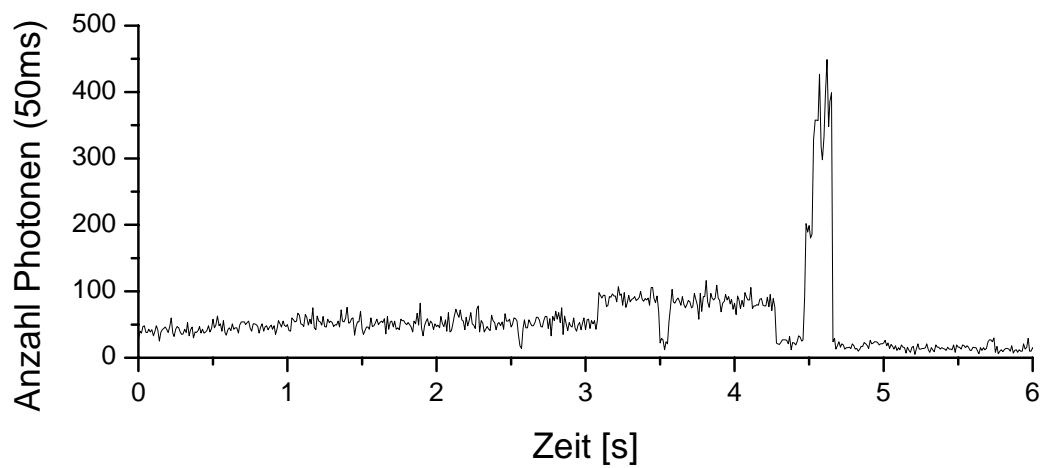
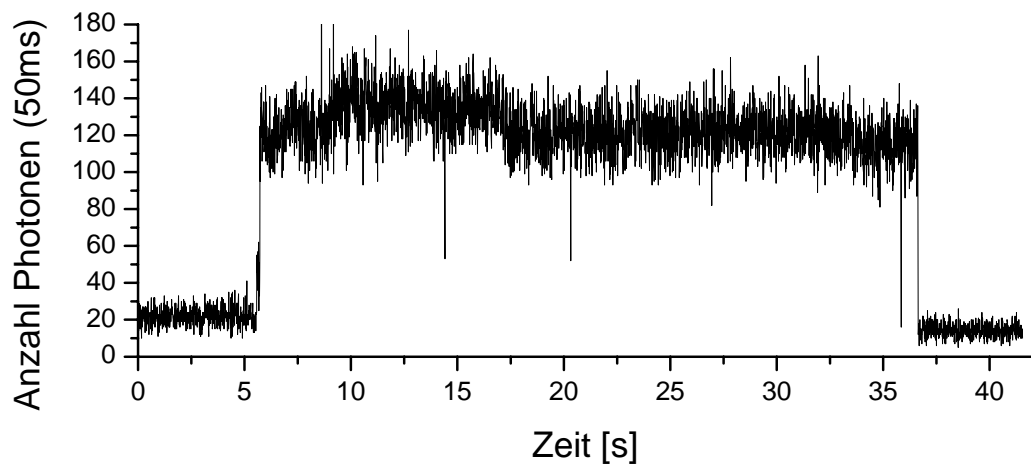
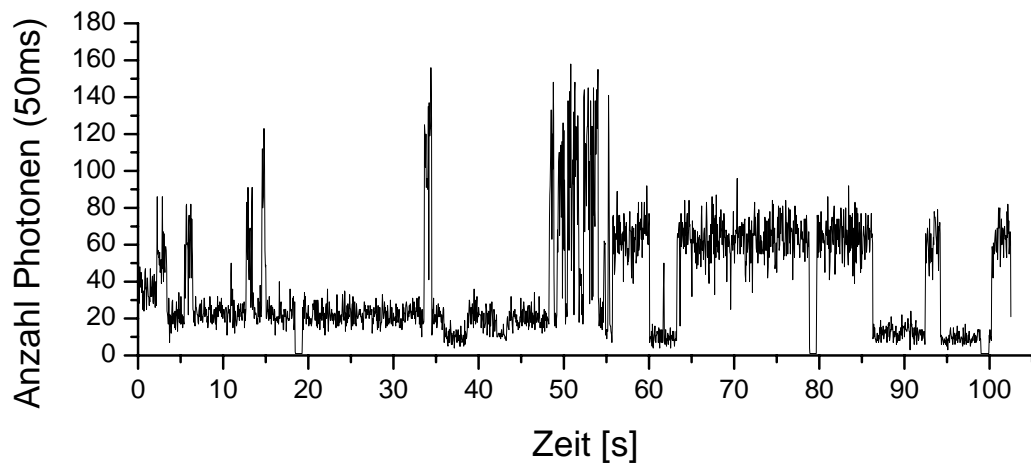
PET-Hairpin in Tris-Puffer 0 mM KCl



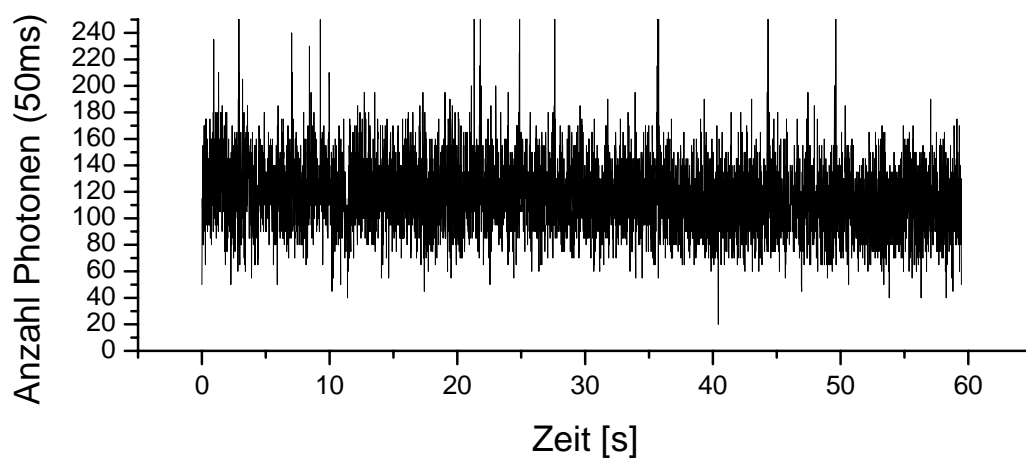
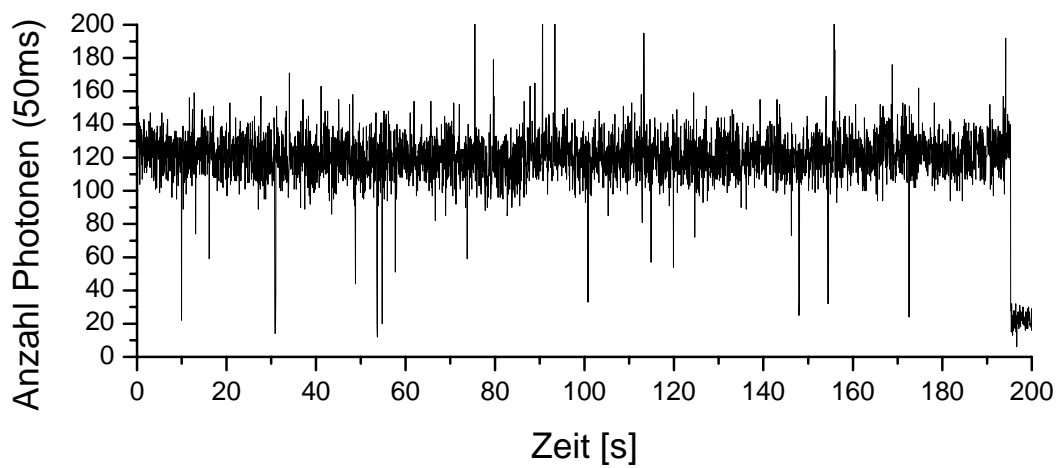
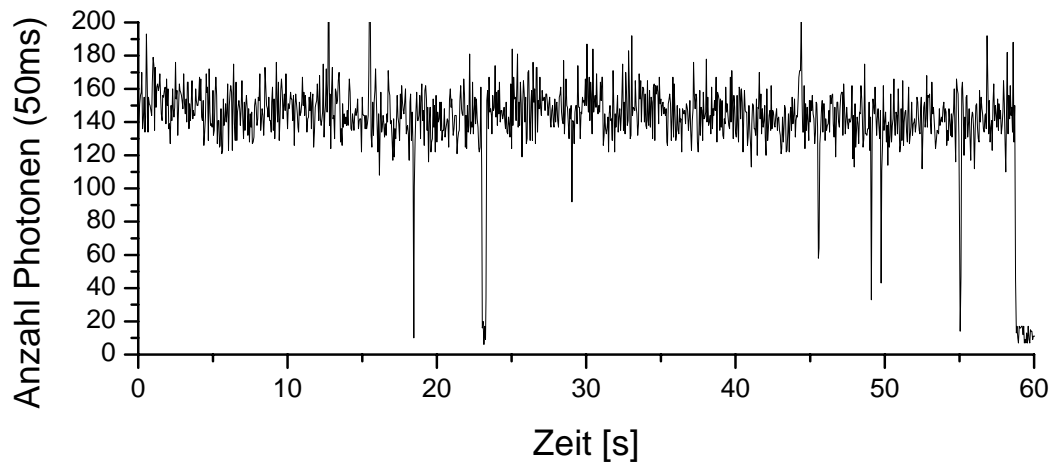


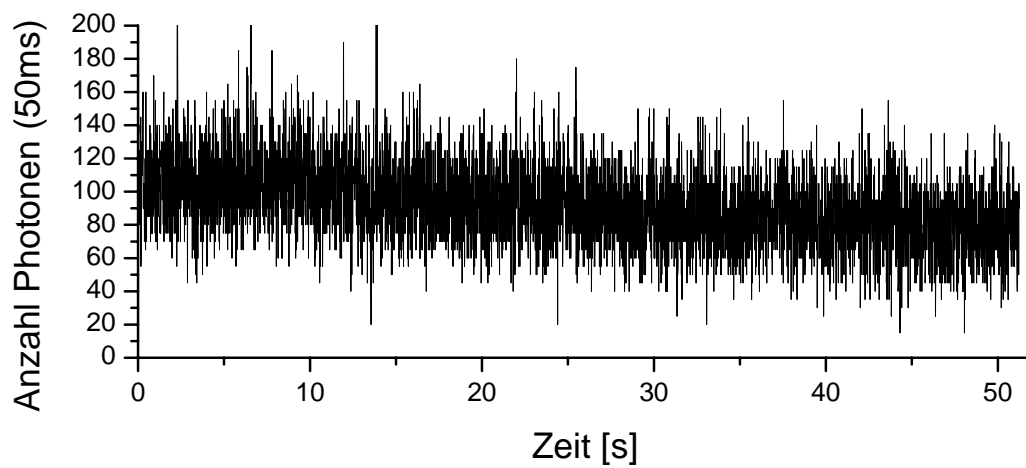
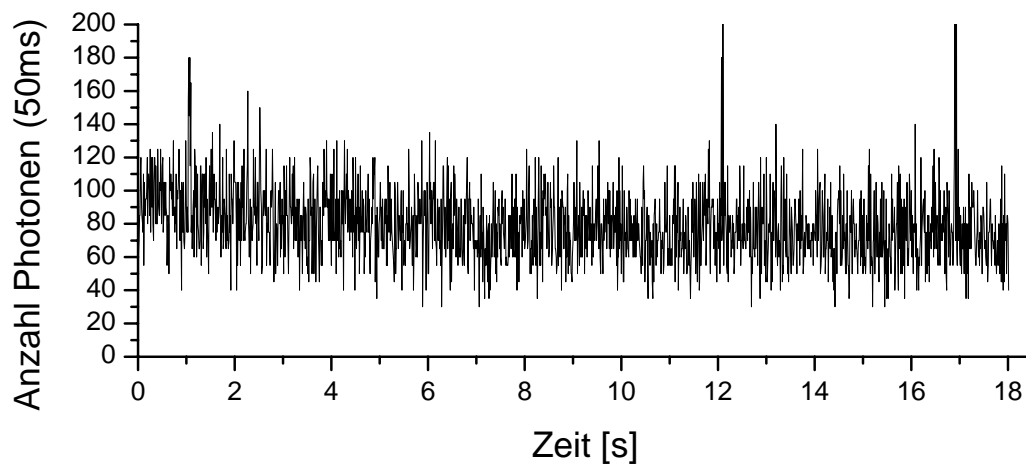
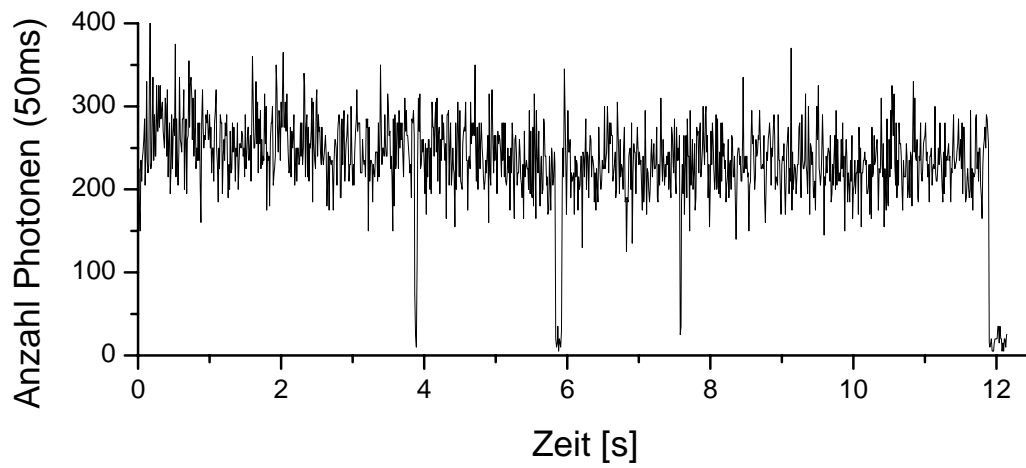


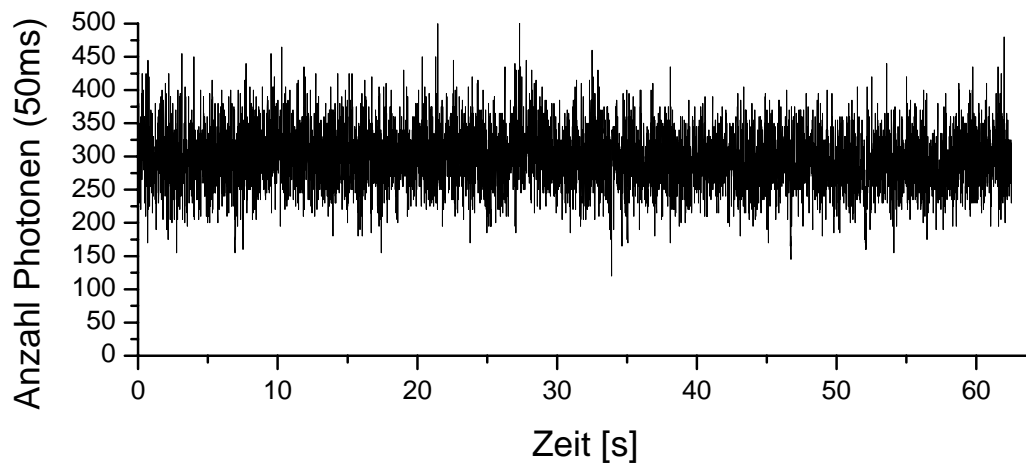
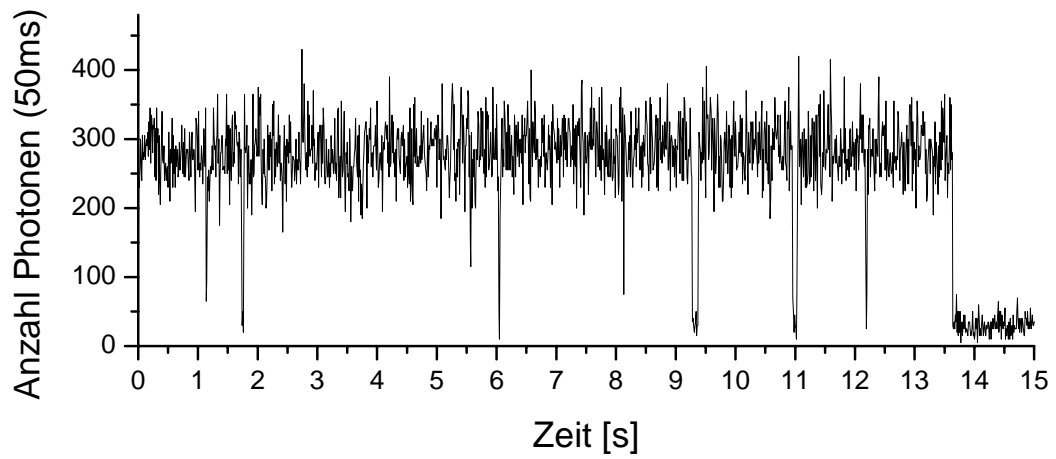
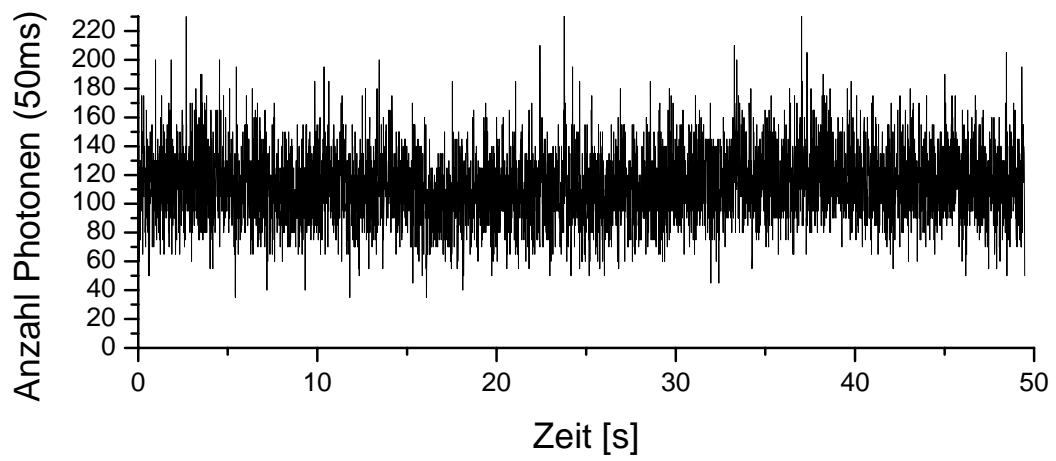




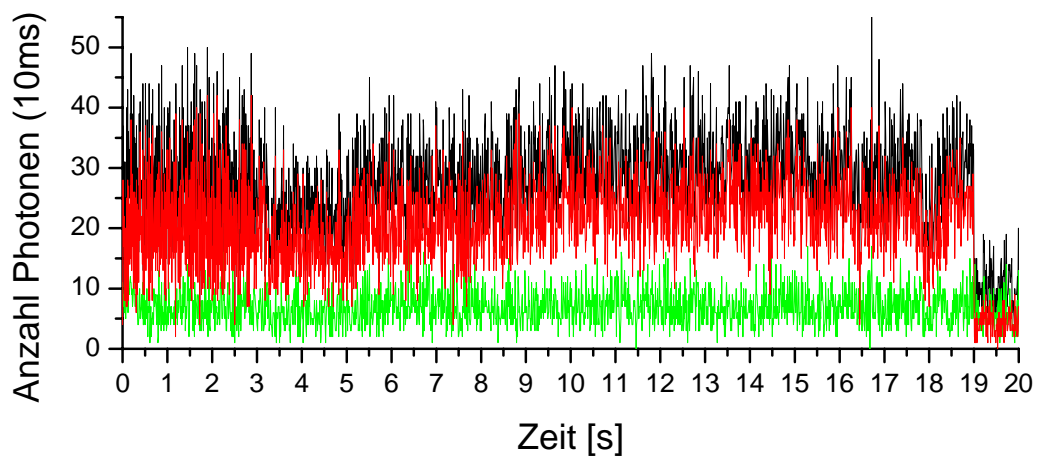
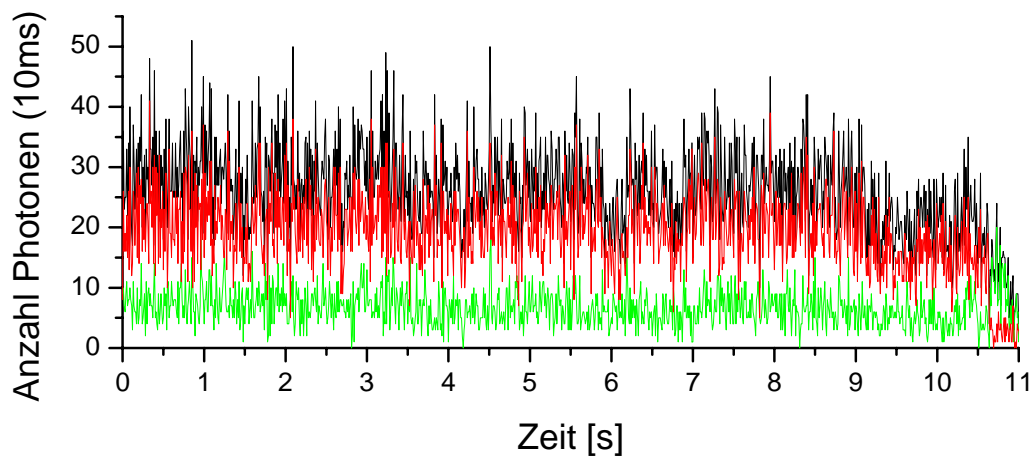
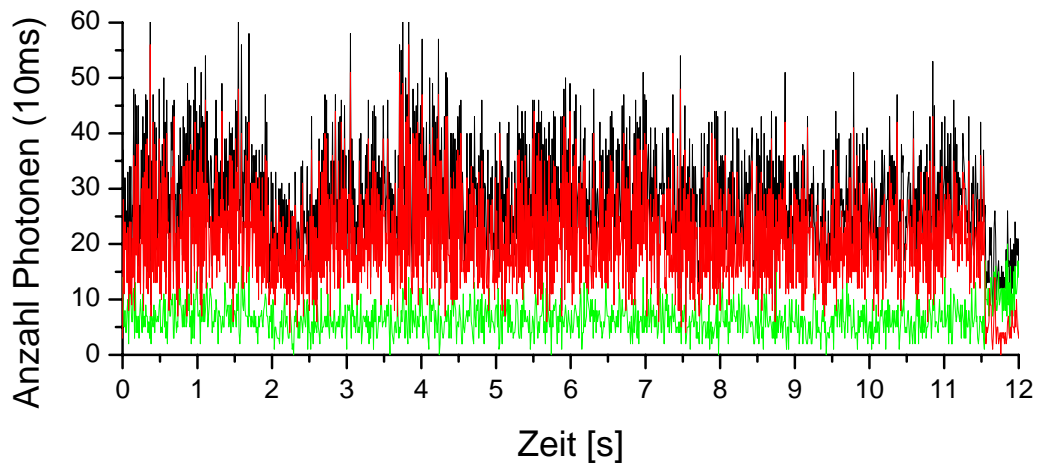
PET-Hairpin mit Gegensequenz geöffnet

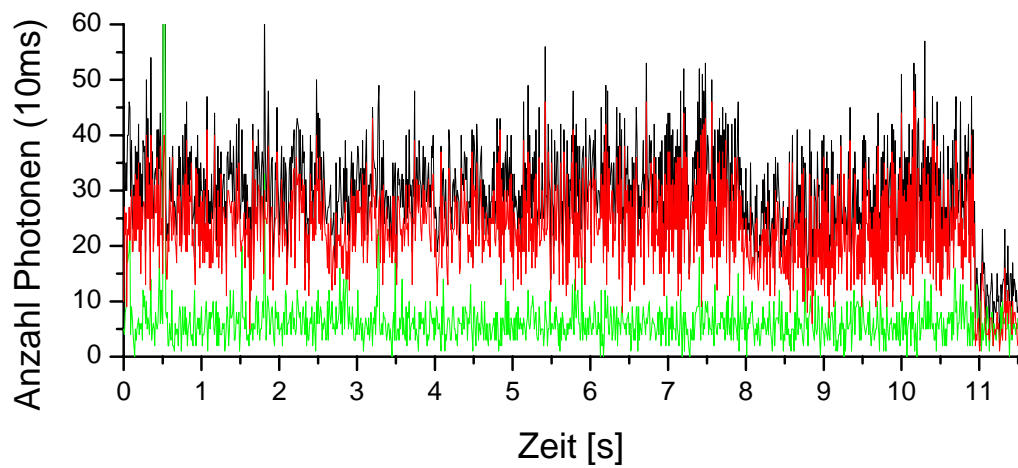
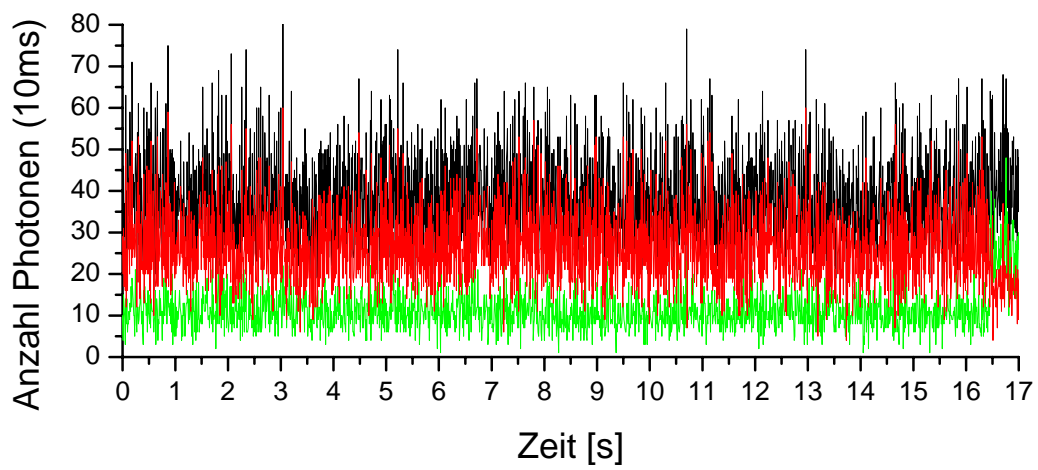
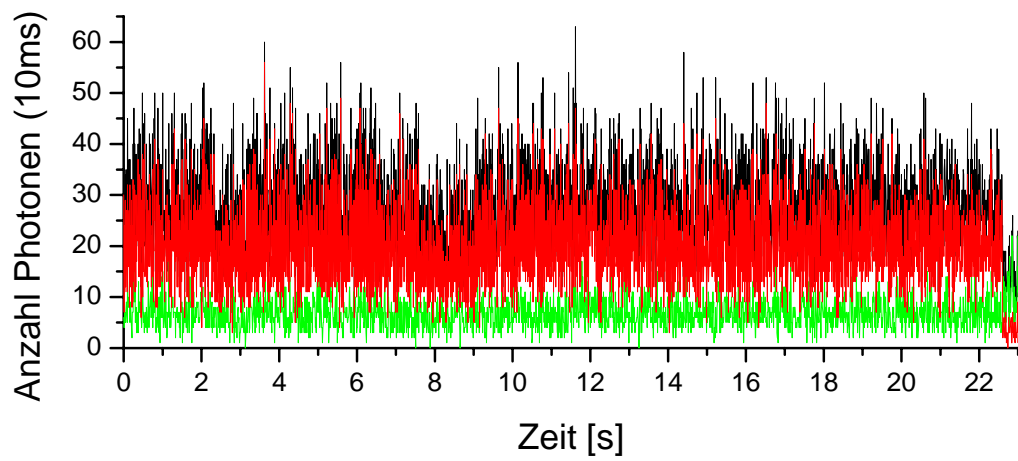


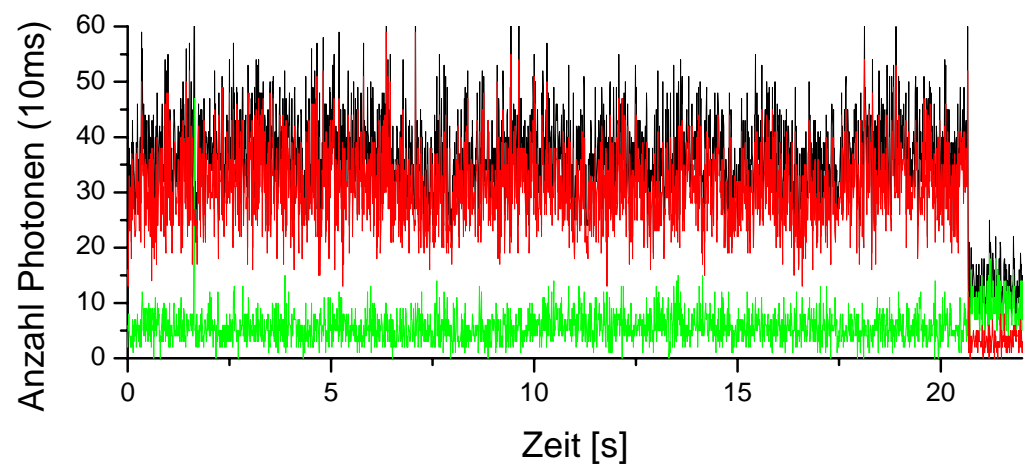
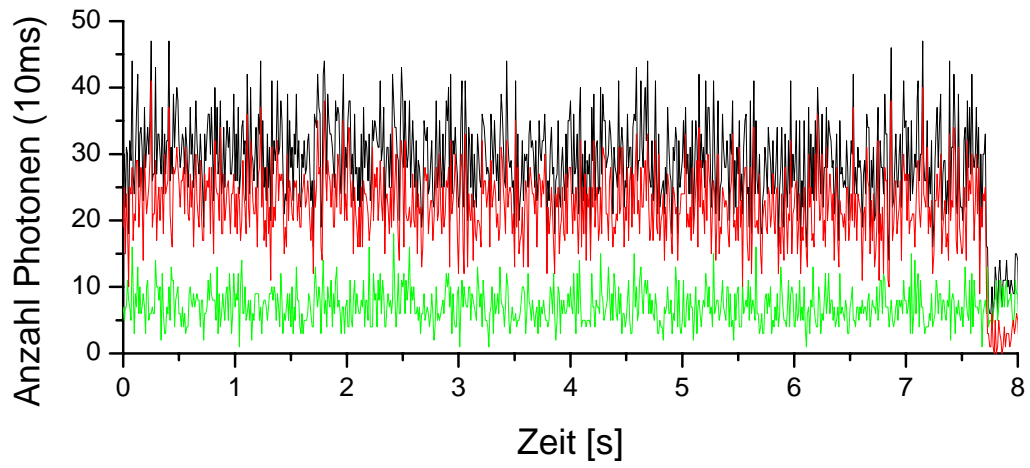
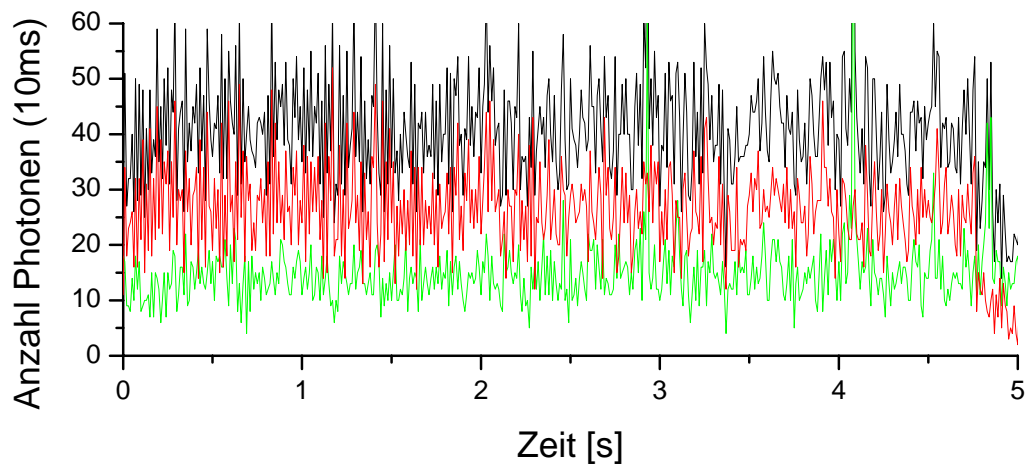




FRET-Doppelstrang







Stern – Volmer Plot von Flavin-Adenosin Dinucleotid

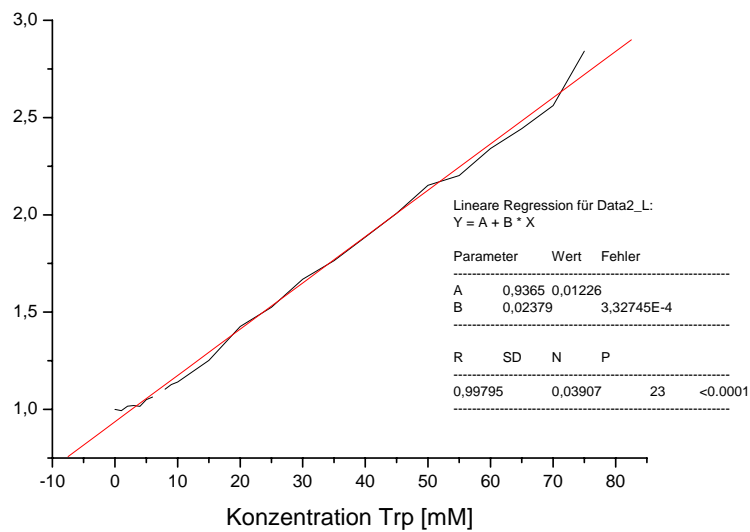


Abbildung 1: Stern – Volmer Plot von Flavin-Adenosin Dinucleotid mit Tryptophan

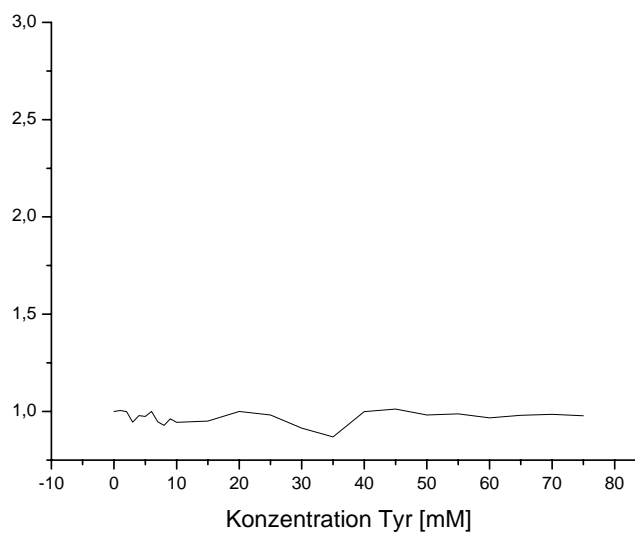


Abbildung 2: Stern – Volmer Plot von Flavin-Adenosin Dinucleotid mit Tyrosin

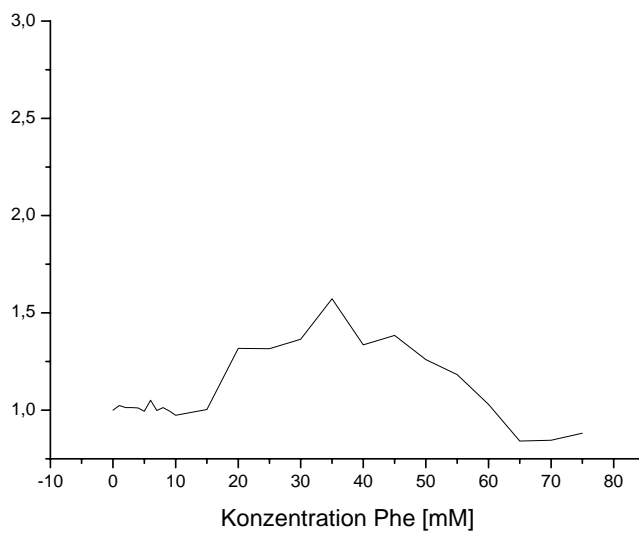


Abbildung 3: Stern – Volmer Plot von Flavin-Adenosin Dinucleotid mit Phenylalanin

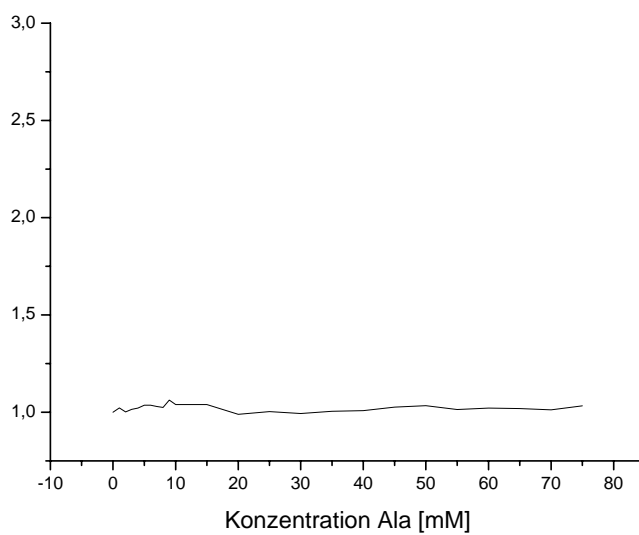


Abbildung 4: Stern – Volmer Plot von Flavin-Adenosin Dinucleotid mit Alanin.

„Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unerlaubte Hilfe durchgeführt habe.“

Heidelberg, Mai 2005

Oliver Piestert