

Struktur und Dynamik
telomerer DNA in Lösung.

Kationenspezifischer Einfluss
auf
intra- und intermolekulare
Wechselwirkungen.

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Mischa Bolten

Bielefeld, 2001

An einem Sonntagmorgen im Labor



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. W. Eimer in der Zeit von Februar 1998 bis November 2001 an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich bei Wolfgang Eimer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, sein fortwährendes Interesse und die sehr angenehme Art der Betreuung bedanken.

Die vielen hellen Augenblicke in einem Meer voller Dunkelheit des Forscheralltags sind vor allem folgenden Personen zu verdanken:

Wolfgang Eimer, Wolfgang Kreutner, Achim Herrmann, Stefan Stechemesser, Edgar Fischer Rivera, Vera Köster, meinen Blockpraktikanten Arne Roth, Johannes Neugebauer und Nadine Herrmann, sowie Harald Waterbör und Werner Mersch. Und letztendlich allen Mitgliedern der PC I.

Der „MW“ und „EW“ danke ich ganz besonders für die stetige Hilfsbereitschaft, unkomplizierte Abwicklung und prompte Erledigung aller Aufträge.

Unvergesslich - im positiven Sinne - sind die Stunden, die ich mit Kirsten Lanfermann und Carsten Voss sowie den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik/technische Fakultät in deren Laborräumen während der CGE Messungen verbracht habe.

Dr. Marc Oliver Schierenberg danke ich für die Aufnahmen der CE Elektropherogramme des 24mers.

Für die Korrektur im Rahmen der neuen deutschen Rechtschreibung und kritische Durchsicht danke ich Maj-Britt Lundström, Wibke Samson, Arne Roth und Edgar Fischer Rivera.

*Was keiner wagt, das sollt ihr wagen
was keiner sagt, das sagt heraus
was keiner denkt, das wagt zu denken
was keiner anfaengt, das fuehrt aus.*

J. W. von Goethe

„...so bitte ich den Leser im Folgenden um seine ganze Aufmerksamkeit, da ich nicht die Kunst besitze, für den unaufmerksamen Leser klar zu sein.“

I. Kant

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND MOTIVATION DER ARBEIT	1
2	THEORETISCHER TEIL	5
2.1	GRUNDSTRUKTUR DER DNA	7
2.2	G-DNA	10
2.2.1	Der Tetraplex	11
2.2.2	Polymorphismus	13
2.2.3	Supramolekulare Nanostrukturen	16
2.3	DYNAMISCHE STREULICHTSPEKTROSKOPIE AN MAKROMOLEKÜLEN IN LÖSUNG	19
2.3.1	Grundlagen der dynamischen Streulichtspektroskopie	19
2.3.2	Dynamische Lichtstreuung	21
2.3.3	Photonenkorrelationsspektroskopie	24
2.3.4	Datenanalyse in der Photonenkorrelationsspektroskopie	25
2.3.5	Fehlerabschätzung in der Photonenkorrelationsspektroskopie	28
2.3.6	Fabry-Perot Interferometrie	29
2.3.7	Datenanalyse in der Fabry-Perot Interferometrie	30
2.3.8	Fehlerabschätzung in der Fabry-Perot Interferometrie	31
2.3.9	Hydrodynamik	32
2.4	HYDRODYNAMISCHE MODELLRECHNUNGEN	33
2.4.1	Modellsysteme	34
2.4.2	Durchführung der Modellrechnungen	35
2.4.2.1	Bildung der Grundstruktur und Hydrathülle (I)	37
2.4.2.2	Berechnung von ASA/CSA (II) und der hydrodynamischen Größen (III)	38
2.4.3	Fehlerabschätzung	39
2.5	UV-SPEKTROSKOPIE	40
2.5.1	Fehlerabschätzung	45
2.6	KAPILLARGELEKTROPHORESE	46
2.6.1	Elektrophoretische Beweglichkeit	46
2.6.2	Trennleistung und Auflösungsvermögen der CGE	47
2.6.3	Fehlerabschätzung	50
3	KOMBINATION DER METHODEN UND ARBEITSPLANUNG	51
4	EXPERIMENTELLER TEIL	55
4.1	MESSMETHODIK – VERSUCHSAUFBAU UND AUSWERTUNG	56
4.1.1	Photonenkorrelationsspektroskopie	56
4.1.2	Fabry-Perot Interferometrie	58
4.1.3	UV-Spektroskopie	61
4.1.4	Kapillargelelektrophorese	62
4.2	PROBENPRÄPARATION	64
4.2.1	Probenvorbereitung für die dynamische Streulichtspektroskopie	65
4.2.2	Probenvorbereitung für die UV-Spektroskopie	65
4.2.3	Probenvorbereitung für die Kapillargelelektrophorese	66
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	67
5.1	MODELLRECHNUNGEN	69
5.1.1	B-DNA und Z-DNA, Duplex- und Hairpinstrukturen	70
5.1.2	G-DNA, intra- und intermolekulare Tetraplexstrukturen	73
5.2	INTRAMOLEKULARE TETRAPLEXE	76
5.2.1	G ₂ T ₂ G ₂ TGTG ₂ T ₂ G ₂ und (T ₂ G ₄) ₄ – dynamische Lichtstreuung und Modellrechnungen	76
5.2.2	G ₂ T ₂ G ₂ TGTG ₂ T ₂ G ₂ und (T ₂ G ₄) ₄ – UV-Spektroskopie und CGE	78
5.3	INTERMOLEKULARE TETRAPLEXE	83
5.3.1	UG ₄ U und T ₂ G ₄ T ₂ – Lichtstreuung und Modellrechnungen	83

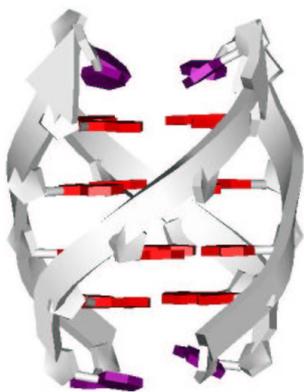
5.3.2	UG ₄ U und T ₂ G ₄ T ₂ - UV-Spektroskopie und CGE	86
5.4	ZUSAMMENFASSUNG INTRA- UND INTERMOLEKULARE TETRAPLEXE	91
5.5	POLYMORPHE SEQUENZEN - INTER-/INTRAMOLEKULARE TETRAPLEXE	95
5.5.1	(T ₂ G ₄) ₄ - intramolekularer Tetraplex vs. intermolekularer tetramerer Tetraplex.....	96
5.5.2	T ₂ G ₄ T ₂ G ₄ T ₂ – dimer-Hairpin Tetraplex vs. tetramerer Tetraplex	101
5.5.3	Zusammenfassung	113
5.6	SUPRAMOLEKULARE STRUKTUREN	116
5.6.1	T ₂ G ₄ TTCT – 10merTCT	118
5.6.2	T ₂ G ₄ TAGA – 10merAGA	120
5.6.3	T ₂ G ₄ TTCT : T ₂ G ₄ TAGA – 10:1 / 4:1.....	124
5.6.4	Zusammenfassung	138
5.7	UV-SPEKTROSKOPIE AN G-DNA	142
5.7.1	Einleitung	142
5.7.2	Vergleich der Daten aus DLS und UV-Spektroskopie	144
5.7.3	Einfluss der DNA-Sequenz und der Gegenionen auf die Stabilität	146
5.7.4	UV-Spektroskopie an der polymorphen Sequenz (T ₂ G ₄ T ₂ G ₄ T ₂) (14mer)	152
5.7.5	UV-Spektroskopie an der polymorphen Sequenz (T ₂ G ₄) ₄ (24mer)	162
5.7.6	Zusammenfassung UV-Spektroskopie an G-DNA.....	167
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE.....	172
7	EPILOG	180
8	LITERATURVERZEICHNIS	181
9	ANHANG	188
9.1	ABBILDUNGEN	189
9.2	TABELLEN	195
9.3	ABKÜRZUNGEN	209
9.4	LEBENS LAUF	211
9.5	VERSICHERUNG	212

1 Einleitung und Motivation der Arbeit

Die Struktur und die Dynamik der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Lösung ist für die Stabilität und Funktion dieses ubiquitären Trägers der Erbinformation von entscheidender Bedeutung. Die mannigfaltigen Anordnungsmöglichkeiten der DNA sowie deren Sensitivität auf die Umgebungsbedingungen zeichnen des Weiteren für die weitreichende Bedeutung dieser in Erkennungs- und Signaltransduktionsprozessen der lebenden Zelle. So haben z.B. die als Telomere bezeichneten Enden linearer chromosomaler DNA eine wesentliche Funktion für die Stabilität von Chromosomen, bei deren Replikation und für die Genregulation. Durch diese Rolle in fundamentalen Stoffwechselprozessen sind sie in den Mittelpunkt aktueller Forschungen gerückt [Bod98][Wil94][Lew98].

Für den möglichen technischen Einsatz der DNA sind neben dem strukturellen Polymorphismus und der dynamischen Interaktion mit der Umgebung auch die hohe strukturelle Integrität bezüglich Persistenzlänge und spezifischer Basenpaarung (Selbstorganisation) interessant. Hier bieten sich gerade auf dem Gebiet der Nanotechnologie neue Perspektiven bezüglich (bioverträglicher) Werkstoffe.

An den Enden der Chromosomen werden Guanin-reiche Sequenzen (G-DNA) der Art $d[T_{1-3}-(T/A)-G_{3-4}]_n$ beobachtet, die ungewöhnliche, als Quadruplexe bezeichnete, tetramere



helikale Strukturen bilden können (Abbildung links). Parallel dazu wurde bei Mischungen entsprechender synthetischer Mono- und Oligonukleotide ebenfalls die Entstehung höhergeordneter tetramerer helikaler Anordnungen nachgewiesen [Eim92]. Da sowohl die Bildung, als auch die Morphologie durch zugesetzte Alkali- und Erdalkalitionen reproduzierbar beeinflusst werden können, eröffnet sich hier neben fundamental wichtigen biologischen Fragestellungen (Zellalterung, Krebstherapie

[Mey97]) auch die Möglichkeit, selbstorganisierende, „intelligente“ Nanocluster zu synthetisieren und die hohe strukturelle Integrität dieser Konstrukte für technische Anwendungen zu entwickeln.

Eben diese Beobachtungen, Teilergebnisse und Postulate bedingen STRUKTUR UND DYNAMIK TELOMERER DNA IN LÖSUNG zu erforschen und den KATIONENSPEZIFISCHEN EINFLUSS AUF INTRA- UND INTERMOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN zu beschreiben. Es gilt die Auswirkung der Ionenart und Ionenstärke auf die Strukturbildung, gerade der polymorphen G-DNA Sequenzen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden synthetische Modellsbstanz eingesetzt, deren Basensequenzen sich in biologischen Systemen (telomere Sequenzen) wiederfinden, bzw. auf Grund theoretischer Vorüberlegungen die Bildung bestimmter Strukturen ermöglichen. Als Kernsequenz wird dabei das Motiv $(T_2G_4)_x$ mit $x = 1-4$ gewählt. Damit ist immer nur eine begrenzte Anzahl an Strukturen kombinatorisch möglich, die sich zudem mit den eingesetzten Methoden gut identifizieren und unterscheiden lassen. Gleichzeitig muss nicht von den biologisch relevanten Motiven $d[T_{1-3}-(T/A)-G_{3-4}]_n$ abgerückt werden.

Alle biologischen Prozesse und der überwiegende Teil der technisch-naturwissenschaftlichen Anwendungen finden in Lösung statt. In der Gasphase, dem Festkörper oder in der Lösung sind a priori andere strukturbildende intra- und intermolekulare Wechselwirkungen möglich. Auf Grund der hohen Sensitivität auf die Umgebungsparameter ist die Durchführung von Untersuchungen unter physiologischen Rahmenbedingungen zwingend erforderlich, wenn Aussagen über biologisch-medizinisch/technisch relevante Systeme getroffen werden sollen. In dieser Arbeit wird durch die Kombination verschiedenster Methoden die Charakterisierung Guanin-reicher DNA in Lösung ermöglicht. Aus oben genannten Gründen (Sensitivität auf Umgebungsbedingungen) werden bei den experimentellen Methoden immer *identische* Lösungsbedingungen eingestellt und nur die DNA-Konzentrationen dem Experiment angepasst.

Mit Hilfe der dynamischen Streulichtspektroskopie (DLS) können hydrodynamische Größen von Makromolekülen in Lösung ermittelt werden. Durch Kombination von Photonenkorrelationsspektroskopie und Interferometrie, sowie Vergleich mit hydrodynamischen Modellrechnungen sind weitreichende Aussagen über die Transportgrößen und damit Morphologie der betrachteten Spezies möglich. Die hochspezifische Basenpaarung reduziert die kombinatorisch möglichen Anordnungen und lässt dezidierte Aussagen über die gebildeten Strukturen zu; auch ohne Kenntnis der genauen Atompositionen, wie sie nur mit hochauflösenden Untersuchungsmethoden (z.B. der Röntgenstrukturanalyse) zugänglich sind.

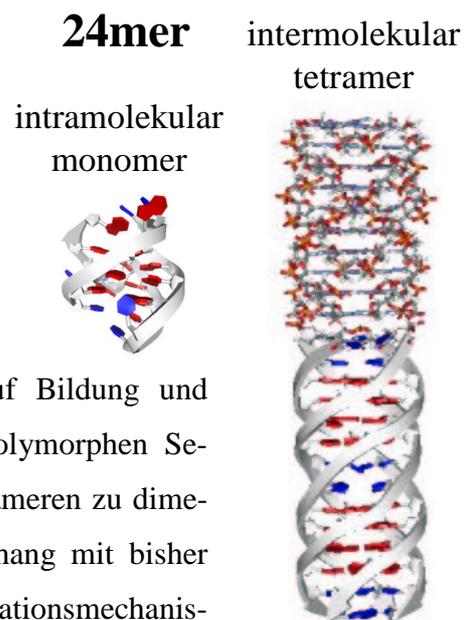
1 EINLEITUNG UND MOTIVATION DER ARBEIT

Gerade in der dynamischen Streulichtspektroskopie können die Untersuchungsbedingungen, wie z.B. die Konzentration der Makromoleküle, die Ionenstärke und die Temperatur in einem weiten Bereich variiert werden. Dies ermöglicht den Vergleich mit Literaturdaten wie z.B. aus der NMR-Analytik, so dass für die Verifizierung der hier angewandten Methodik Vergleichsdaten aus der Literatur herangezogen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit werden erstmalig umfangreiche UV-spektroskopische Untersuchungen an Guanin-reichen DNA-Sequenzen und potentiell polymorphen Oligonukleotiden durchgeführt. Die Kombination dieser Ergebnisse mit denen der vorgenannten Methoden (DLS und Modellrechnungen) erlaubt es, den für Strukturuntersuchungen in Lösung zugänglichen Konzentrationsbereich um drei Dekaden in den μM Bereich zu erweitern.

Die Kapillargelelektrophorese (CGE), die sich als Standardmethode in der DNA-Analytik etabliert hat [Vos01], soll mit ihrer hohen Trennleistung weiteren Aufschluss über Gleichgewichtslagen zwischen polymorphen Quadruplexstrukturen geben. Da mit dieser Methode Neuland in der Analytik bezüglich viersträngiger DNA-Strukturen betreten wird, sind zunächst nur ergänzende Messungen geplant. Die Ergebnisse können dann auf Basis der Erkenntnisse anderer theoretischer (Modellrechnungen) und experimenteller Methoden (DLS und UV-Spektroskopie) diskutiert werden.

Im Zentrum der Arbeit stehen, nach vorhergehender Verifizierung der verwendeten Untersuchungsmethodik an einfachen Sequenzen, zwei Oligonukleotide: das 14mer ($d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2]$) [Bol98] und das 24mer ($d[\text{T}_2\text{G}_4]_4$). Betrachtet man die Strangstöchiometrie der gebildeten Quadruplexe, so sind neben den spannungsfreien tetrameren Tetraplexen, durch zunehmend komplexere Rückfaltungen, auch dimere oder monomere Spezies möglich. Hierbei gilt es, den Einfluss der Ionenart und der Ionenkonzentration auf Bildung und Gleichgewichtslage zwischen den Strukturen dieser polymorphen Sequenzen zu untersuchen. Gerade der Übergang von tetrameren zu dimeren oder monomeren Quadruplexen ist im Zusammenhang mit bisher ungeklärten, entscheidenden Teilbereichen der Replikationsmechanis-

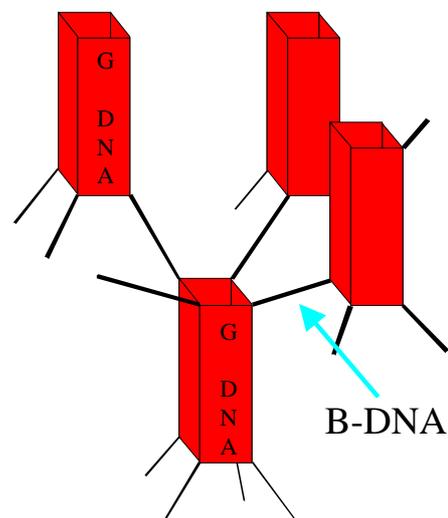


men der DNA während der Mitose wahrscheinlich von fundamentaler Bedeutung [Str99].

Die DNA als stabiles Speichermedium der genetischen Erbinformation weist Eigenschaften auf, die auch für technische Anwendungen interessant sind. Neben vieldiskutierten Ansätzen in Richtung Datenträger [See00] wird die Verwendung als „Baustoff“ für Nanostrukturen immer wieder in den Mittelpunkt von Forschungsinteressen [See98] gerückt. Die einfache Synthese bestimmter Sequenzen, höchste reproduzierbare Präzision bei den sich bildenden selbstorganisierenden Strukturen auf Grund der spezifischen Basenpaarung und grundsätzliche biologische Verträglichkeit bei Verwendung als Wirkstoffträger in der Medizin sind nur einige der besonderen Merkmale dieses Grundstoffes. Dabei sind durch die unterschiedlichen Temperaturstabilitäten [Lew98] der Basenpaare GC und AT thermosensitive Strukturen realisierbar, die in engen Temperaturbereichen massiven Strukturveränderungen unterliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll neben den oben genannten allgemeinen Ursache-Wirkungszusammenhängen (Einfluss DNA-Sequenz, der Ionenart und -konzentration auf die Strukturbildung (Polymorphismus)) auch untersucht werden, inwieweit sich Guanin-reiche DNA und die daraus entstehenden tetrameren Strukturen für die Verwendung in selbstorganisierenden Nanostrukturen eignen. In diesem Zusammenhang wird erstmalig das G-DNA CORE - B-DNA JUNCTION Konzept entwickelt und vorgestellt.

An der durch mit B-DNA bildenden Sequenzen funktionalisierter G-DNA sollen erste systematische Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei werden an den Enden der DNA-Abschnitte, die tetramere helikale Strukturen bilden, Sequenzen angesetzt, die normale B-DNA-Basenpaarung mit entsprechend doppelhelikaler Strukturbildung zeigen (Abbildung rechts). Neben der deutlich größeren Persistenzlänge der G-DNA-Bereiche sind zum einen durch die Ionenart und die Ionenstärke beeinflussbarer Polymorphismus und zum anderen die deutlich variablere Temperaturstabilität die entscheidenden Vorteile dieses Konzeptes gegenüber der ausschließlichen Verwendung von doppelhelikaler DNA für Netzwerkkonstrukte.



2 Theoretischer Teil

An den als Telomere bezeichneten Enden linearer chromosomaler DNA wurde Anfang der 80'er Jahre die Ausbildung besonderer Strukturen beobachtet [Dug80]. Diese tetrameren helikalen Strukturen unterschieden sich deutlich von den bis dahin im Zusammenhang mit der DNA bekannten doppelhelikalen Anordnungen¹. Gerade die mit dieser Entdeckung nochmals erweiterten Möglichkeiten der dynamischen dreidimensionalen Strukturbildung zeigen auf, dass die DNA nicht nur als Speicher der Erbinformation fungiert, sondern auch komplexe Regulations- und Steuerfunktionen ausübt [Bla96][Wil94]. Insbesondere da in allen biologischen Prozessen die dreidimensionale Struktur und die elektronischen Oberflächentopologie für intermolekulare Erkennungsmechanismen (Targeting), Signalverarbeitungs- und transduktionsvorgänge entscheidend ist [Jan97][Lew98][Str99].

Die Sequenzanalysen der betroffenen telomeren Abschnitte offenbarten ein immer wiederkehrendes Motiv, geprägt von dem überdurchschnittlich häufigen Auftreten einer bestimmten Base, dem Guanin. Da die Bereiche der DNA, in denen diese Strukturen beobachtet wurden, entscheidend an vitalen Funktionen [Mey97][Bod98] beteiligt sind, wurden große Anstrengungen unternommen, alle in diesem Zusammenhang gemachten Beobachtungen näher zu beleuchten. Parallel sind bei entsprechenden Mischungen von monomeren Bausteinen und kurzen synthetischen Sequenzen ebenfalls ungewöhnliche tetramere helikale Strukturen beobachtet worden. Anhand von Untersuchungen an Guanosin-5'-Monophosphat (GMP) wurde das sogenannte G-Quartett als Strukturprinzip vorgeschlagen, wobei erste Deutungen der ungewöhnlichen Mobilität Guanin-reicher Sequenzabschnitte schon Anfang der 60'er Jahre die Bildung von tetrameren Assoziaten vorsahen [Gel62].

Da in den hier durchgeführten Untersuchungen mit kurzen Modellsequenzen für die Quadruplexstrukturen und z.T. auch mit selbstkomplementärer DNA gearbeitet wurde, wird zunächst die allgemeine Struktur der DNA erläutert. Im folgenden Kapitel wird dann explizit

¹ Neben antiparallelen doppelhelikalen und anderen auf Watson-Crick Basenpaarung beruhenden Strukturen, waren auch partiell trimere Formationen bekannt [Lew98].

auf die morphologischen Besonderheiten Guanin-reicher DNA und der daraus gebildeten Tetraplexen eingegangen.

Nach der molekularbiologische Seite (Kapitel 2.1 und 2.2) stehen die eingesetzten Methoden vom theoretischen Standpunkt aus im Mittelpunkt und werden gezielt auf die untersuchten Systeme hin vertieft (Kapitel 2.3 bis 2.6).

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 GRUNDSTRUKTUR DER DNA

Die DNA (Desoxyribonucleic Acid) dient in der belebten Natur als Speicher der genetischen Information² und ist Schlüsselmolekül bei vielen Erkennungs- und Regulationsvorgängen [Bla96]. Die native DNA ist ein langes, fadenförmiges Makromolekül, das aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat (Backbone), bestehend aus alternierenden β -D-2-Desoxyribose- und Phosphatbausteinen, und einem variablen Teil, bestehend aus einer Abfolge von vier verschiedenen Basen, aufgebaut ist. In der Abfolge (Sequenz) der Basen ist die genetische Information codiert. Gleichzeitig bedingt die Sequenz auch die Ausbildung der Tertiär- und Quartärstruktur, die für die Wechselwirkung mit anderen Moleküle und damit die Erkennungs- und Regulationsmechanismen entscheidend ist.

Die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) (vgl. Abbildung 2.1) sind in der DNA N-glykosidisch über die 1'-OH-Gruppe der Ribose an das Rückgrat gebunden. Die Veresterung der Phosphorsäure und der Riboseeinheiten über die 5'- und 3'-OH-Gruppen der Ribose bewirkt, dass ein linearer DNA-Strang ein 5' und ein 3' Ende aufweist. Diese Eigenschaft wird als Polarität der DNA bezeichnet. Per definitionem wird die Sequenz von links nach rechts, vom 5'-Anfang zum 3'-Ende gelesen.

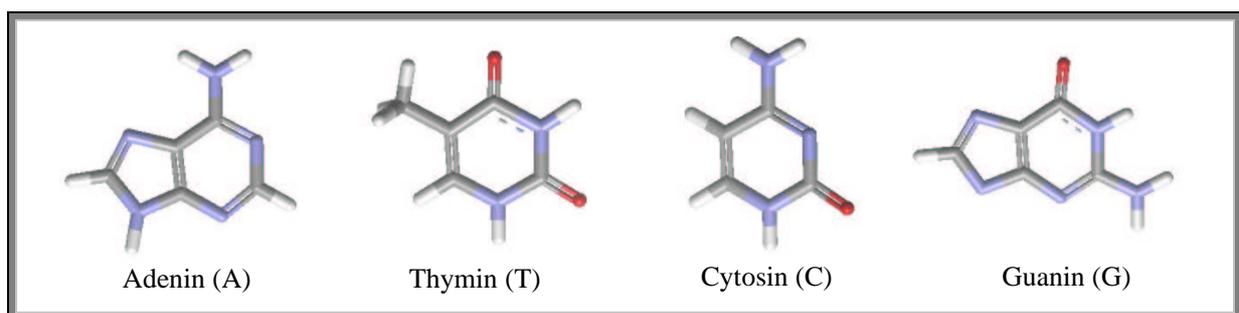


Abbildung 2.1 : Purin- (Adenin u. Guanin) und Pyrimidinbasen (Thymin u. Cytosin) der DNA.

Abbildung 2.2 zeigt einen Ausschnitt des Backbones mit der Phosphodiesterbindung und eine B-DNA Doppelhelix. Bei der Doppelhelix sind zwei antiparallele DNA-Stränge in einer

rechtsdrehenden wendeltreppenartigen Struktur derartig angeordnet, dass jede Base des einen Stranges einer Base des anderen Stranges diametral gegenüberliegt und mit dieser durch spezifische Wasserstoffbrücken verbunden ist. Dabei paart A mit T (2 Wasserstoffbrücken) und G mit C (drei Wasserstoffbrücken, WATSON-CRICK Modell). Die „Stapelung“ der Basen ermöglicht attraktive Wechselwirkungen zwischen den Basenpaarebenen und bewirkt so eine zusätzliche Stabilisierung.

Des Weiteren zeigt die Abbildung die äußere Morphologie der B-DNA (rechtswendig, 10 Basen pro Helixwindung) mit der physiologisch wichtigen Furchenanordnung [Lew98][Bla96].

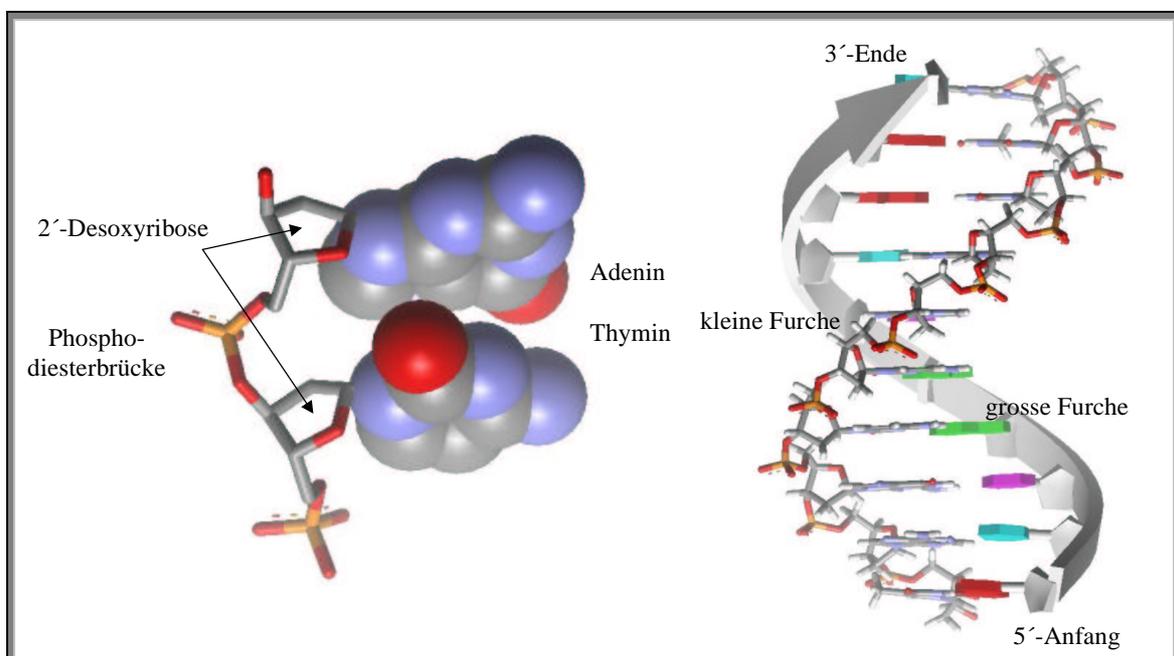


Abbildung 2.2 : Das DNA-Grundgerüst. Links: Backbone mit den Basen AT in VdW-Radiendarstellung. Rechts: 10 Basenpaare (bp) lange B-DNA Doppelhelix.

Neben dieser klassischen, unter physiologischen Bedingungen am häufigsten vorkommenden B-Form, sind noch die Z-Form (gestreckter und linksdrehend) und A (gestauchter) bekannt, wobei die spezifischen Strukturmerkmale in [Lew98] dokumentiert sind.

² Ausnahme u.a. bei Viren, die RNA (Ribonucleic Acid) besitzen.

2 THEORETISCHER TEIL

Im Folgenden wird die sog. Guanin-reiche DNA und deren spezielle Merkmale näher beleuchtet. In der besonderen Morphologie und Dynamik dieser Strukturen liegen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen begründet.

2.2 G-DNA

Bei Guanin-reichen Sequenzen der Art $d[T_{1-3}-(T/A)-G_{3-4}]_n$ bilden sich tetramere helikale Strukturen. Diese werden i.a. als Quadruplexe oder auch Tetraplexe bezeichnet. In Mischungen entsprechender synthetischer Mono- und Oligonukleotide kann ebenfalls die Entstehung dieser höhergeordneteren Strukturen beobachtet werden [Eim92].

In vivo wird während der Mitose, der Verdoppelung der Zellkern-DNA während der Zellteilung, eine vergleichbare Strukturbildung in den telomeren Regionen der DNA beobachtet. Dabei werden Übergänge zwischen partiell ungepaarten Einzelsträngen, tetrameren Strukturen aus vier DNA-Strängen und die Bildung rein intramolekularer Tetraplexe durch „Aufknäulung“ des Endbereiches eines einzelnen Stranges beobachtet (partiell ungepaart, tetramere Struktur) bzw. postuliert (intramolekularer Tetraplex). Gerade die postulierte intramolekulare Anordnung ist im Hinblick auf den Replikationsmechanismus von fundamentaler Bedeutung [Lew98] und untermauert die ubiquitäre³ biologische Relevanz dieser potentiell polymorphen Sequenzabschnitte.

Weiterhin sind auf Grund der viersträngigen Grundstruktur und des unten beschriebenen Polymorphismus neue Möglichkeiten bei der gezielten Konstruktion biologisch hochspezifisch wirksamer Moleküle gegeben. Viele Signaltransduktionsmechanismen und alle intermolekularen Erkennungsvorgänge funktionieren nach dem „Schlüssel-Schloss“ Prinzip. Die Form und (elektrostatische) Oberflächentopologie sind hierfür ausschlaggebend. Als derzeit eines der besterforshtesten Beispiele für Guanin-reiche Oligonukleotide, die durch komplexe Rückfaltungen eine biologisch wirksame Form annehmen können, gilt das auch hier behandelte Thrombin-Binding Aptamer. Dieses Aptamer kann in einer von den Umgebungsparametern abhängigen Konformation an Thrombin binden und hochspezifisch die menschliche Blutgerinnungskaskade unterbrechen. Als körpereigene Substanz und bedingt durch die hoch-

³ Guanin-reiche Sequenzabschnitte sind hochgradig konserviert, d.h. mit nur minimalen Abweichungen in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Solche Phänomene treten i.a. nur auf, wenn unabdingbare vitale Funktionen damit zusammenhängen.

2 THEORETISCHER TEIL

gradig konservierte Sequenz ist zunächst⁴ keine Initiierung von Immunreaktionen durch telomere G-DNA Abschnitte zu erwarten. Damit gelten solche Moleküle als potentiell minimalinvasive Medikamente bzw. Wirkstoffträger [Tas97].

2.2.1 Der Tetraplex

Der Grundbaustein der Tetraplexe ist die auf der HOOGSTEN Basenpaarung beruhende koplanare Anordnung von vier Guaninbasen in einer Ebene. Es kommt zu der Ausbildung von insgesamt acht Wasserstoffbrücken zwischen den Guaninresten. In Abbildung 2.3-links ist eine Tetraplexebene (G-Ebene) mit den HOOGSTEN Wasserstoffbrücken gezeigt. Bei Guaninreichen Oligonukleotiden entsprechender Sequenz (vgl. Kapitel 2.2) ist die Entstehung der in Abbildung 2.3-rechts gezeigten Helixstruktur möglich, die durch die Einlagerung von Alkali- und Erdalkalimetallkationen [Wil94][Mil97] in die Kanalstruktur (Abbildung 2.3-Mitte), stabilisiert werden kann.

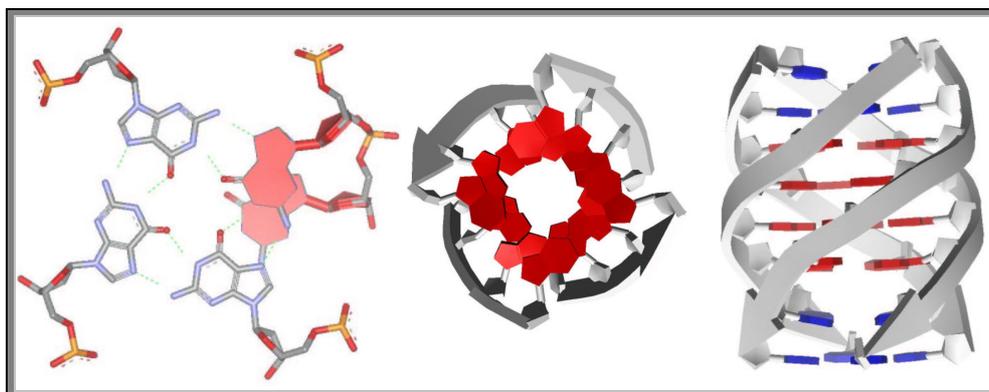


Abbildung 2.3 : Links: Tetraplexebene mit HOOGSTEN Wasserstoffbrücken. Mitte: Aufsicht auf einen Tetraplex $(d[G_3])_4$ mit zentralem Kanal. Rechts: Quadruplex der DNA-Sequenz $d[T_2G_4T_2]$ mit paralleler Stranganordnung.

Größe und Ladungsdichte dieser Ionen führen zu folgender allgemeiner Reihenfolge, in der Kalium den Tetraplex am besten stabilisiert: $K^+ \gg Na^+, Rb^+ \gg Cs^+, Li^+$. In molekulardynamischen (MD)-Simulationen wurden gleichzeitig neben einer z.T. hohen, von der DNA-

⁴ Da Immunreaktionen auf dem dynamischen Wechselspiel verschiedenster Adaptionsprozesse beruhen und nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip ablaufen [Jan97], sind Ausnahmen wahrscheinlich und Einzelfallprüfungen unumgänglich.

Anders herum könnten Schadsbstanzten, die die körpereigene Abwehr nicht erkennt, durch das Wechselwirken mit entsprechenden Oligonukleotiden erst für die Immunabwehr markiert werden.

Sequenz abhängigen Mobilität der Ionen im Kanal, auch zwei verschiedene Positionen relativ zu den G-Ebenen beobachtet [Kro00]. Dabei ist auf Grund der Helixstruktur eine Positionierung der Kationen zwischen zwei gegeneinander verdrehten Guaninebenen am häufigsten. In dieser Konformation werden die Ionen oktaedrisch von den Sauerstoffatomen der Guaninbasen koordiniert (vgl. Abbildung 2.4).

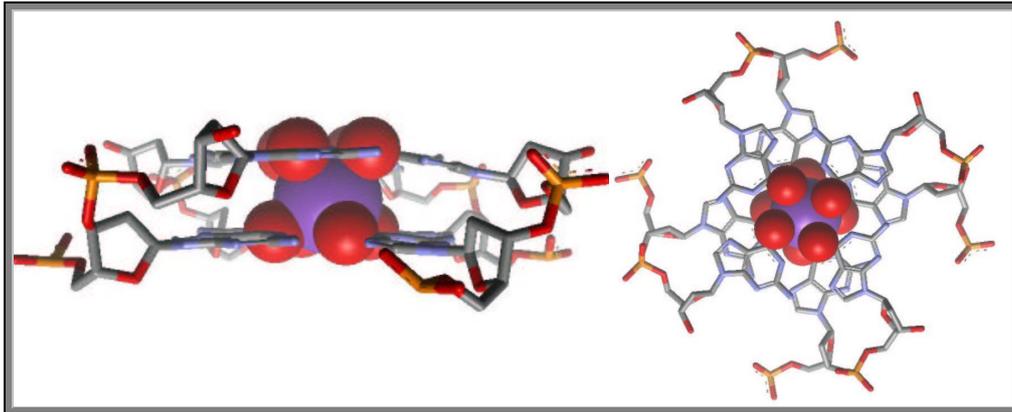


Abbildung 2.4 : Koordination des Kations (blau) durch Sauerstoffatome der Guaninbasen (rot). Links: Seitenansicht von zwei G-Ebenen mit eingelagertem Kation. Rechts: Aufsicht.

In Abbildung 2.5 ist die, im Unterschied zur B-DNA, deutlich glattere Außenstruktur der Tetraplexe dargestellt, was in den unten beschriebenen Modellrechnungen von besonderer Bedeutung in Bezug auf die zu berücksichtigende Solvathülle ist (vgl. Kapitel 5.1). Gleichzeitig wird durch die Einfärbung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (vgl. Abbildung 2.13 II.) nach dem anliegenden elektrostatischen Potential deutlich, dass bei Tetraplexen auch eine andere elektronische Oberflächentopologie vorliegt. Neben räumlichen Beschaffenheiten sind gerade (Partial-)Ladungsverteilungen für die Wechselwirkung mit anderen Molekülen verantwortlich⁵. Abbildung 2.5-rechts zeigt die parallele Stranganordnung des 8mer Tetraplexes, die gleichzeitig die thermodynamisch stabilste Anordnung für tetramere Tetraplexe repräsentiert [Wil94].

⁵ In Kapitel 2.6 wird gezeigt, dass sich interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie YOYO deutlich schlechter in tetramere Strukturen einlagern.

2 THEORETISCHER TEIL

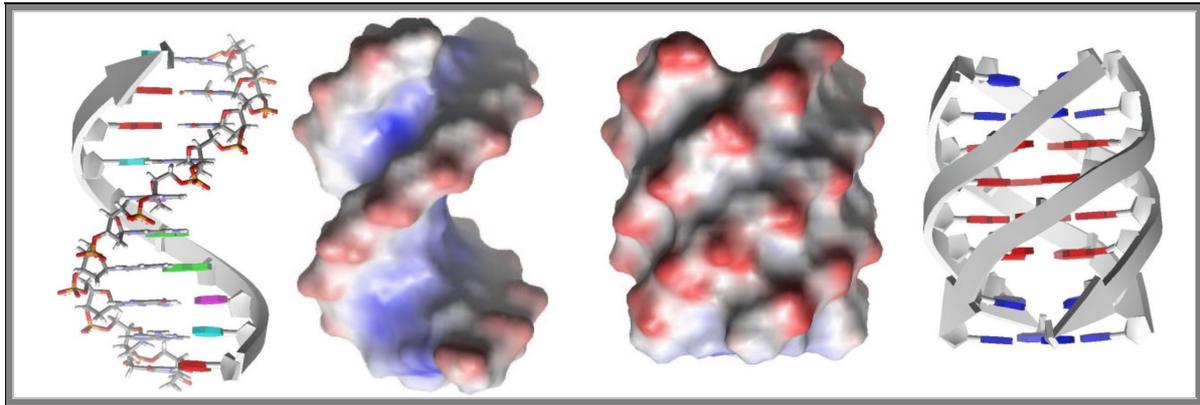


Abbildung 2.5 : Links: Schematische Darstellung einer 10bp B-DNA sowie deren elektrostatischen Oberflächentopologie der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Rechts: Gleiche Darstellung für einen Tetraplex der Sequenz $d[T_2G_4T_2]$.

Die möglichen Funktionen und die kinetische wie auch thermodynamische Stabilität der G-DNA werden also auch unter diesen Gesichtspunkten untersucht, gedeutet und beurteilt werden müssen.

2.2.2 Polymorphismus

Der oben genannte Richtungssinn der DNA, sowie die bei repetitiven G-Bereichen gegebene Möglichkeit der Rückfaltung, führt zum ausgeprägten Polymorphismus der Guanin-reichen DNA. Da gerade bei Rückfaltungen (Loopbildung, Entstehung einer Hairpinkonformation) mitunter stark gespannte Systeme entstehen können, ist die Abhängigkeit der Bildung solcher Isomere von der zugesetzten Ionenart und -stärke gut nachzuvollziehen. Eine kurze schematische Darstellung der möglichen Strukturisomeren ist in Abbildung 2.6 gezeigt.

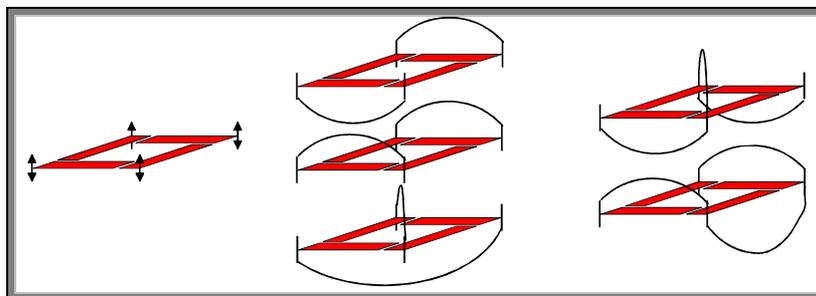


Abbildung 2.6 : Schematische Darstellung der Strukturisomere polymorpher G-DNA. Links: Tetramerer intermolekularer Tetraplex. Mitte: Dimer-Hairpin Tetraplex (antiparallel/parallel/cross Loop). Rechts: Intramolekularer Tetraplex.

In Abbildung 2.7 sind am Beispiel der untersuchten DNA-Sequenz des 24mers $d[(T_2G_4)_4]$ die wichtigsten Strukturen dieser polymorphen Sequenz aufgeführt.

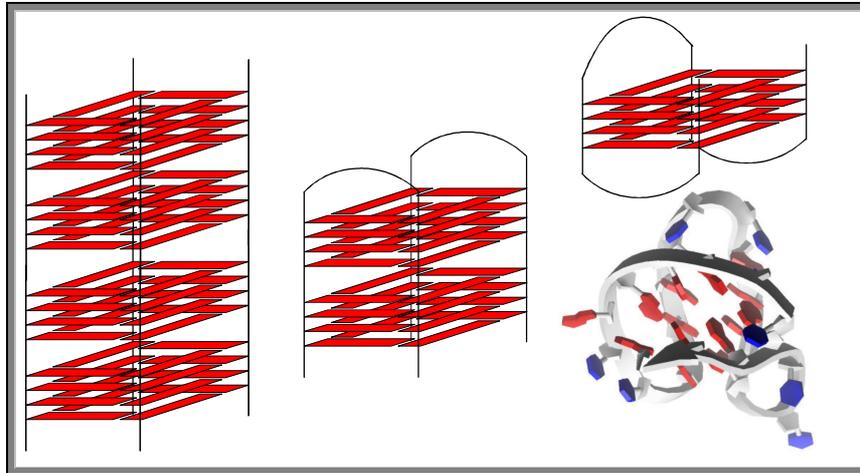


Abbildung 2.7 : Tetraplexstrukturen des 24mer $d[(T_2G_4)_4]$. Links: Intermolekularer tetramerer Quadruplex. Mitte: Dimer-Hairpin Quadruplex mit paralleler Loopkonformation. Rechts: Monomeres intramolekulares Quadruplex.

Links ist die gestreckte tetramere Anordnung gezeigt, bei der sich vier Einzelstränge parallel oder antiparallel anordnen können. Alle Permutationen sind denkbar, in realiter werden jedoch neben der stabileren all-anti Anordnung (parallele Strangrichtung) nur anti-syn-anti-syn⁶ Konformationen beobachtet. Die in der Mitte gezeigte dimer-Hairpin Strukturen muss noch um die antiparallele Loop Anordnung (vgl. Abbildung 2.6-Mitte oben) und die cross-Loop Konformation (vgl. Abbildung 2.6-Mitte unten) erweitert werden. Dabei überbrückt bei dieser Sequenz der mittlere T_2 -Bereich die G-Ebenen an beiden Enden. Bei den gezeigten Dimeren sind durch den Richtungssinn der DNA je zwei Isomere bezüglich der anti- und syn-Konformation denkbar.

Der beim 24mer $d[(T_2G_4)_4]$ in Kapitel 5.2 diskutierte rein intramolekulare Tetraplex wird schematisch und als Moleküldarstellung in Abbildung 2.7-rechts gezeigt. Abweichend von der zunächst sinnvoll erscheinenden Struktur mit vier G-Ebenen (vgl. Abbildung 2.7-rechts oben) wird aus sterischen Gründen nur die Ausbildung von drei G-Ebenen beobachtet

⁶ Anti und syn bezieht sich dabei auf die Konformation der glykosidischen Bindung zwischen Base und Zucker des Backbones. Eine all-anti Anordnung ist thermodynamisch stabiler, aber nur bei paralleler Strangkonformation in tetrameren Tetraplexen möglich.

2 THEORETISCHER TEIL

[Pat94]. Da in allen Tetraplexen⁷, die keine all-anti-Konformation besitzen, die Kantenlängen der G-Ebenen nicht äquidistant sind, werden je nach Sequenz und damit entstehender Struktur, zur Überbrückung der „langen Kante“ ein oder mehr Guanine mit in den Loopbereich mit einbezogen. Diese Guaninbasen stehen damit nicht mehr für die Bildung der G-Ebenen zur Verfügung.

Für die in [Bol98] und in Kapitel 5.2 diskutierte Struktur des Aptamers ist in Abbildung 2.8 diese strukturelle Besonderheit exemplarisch gezeigt, wobei dort ebenfalls ein Guanin in den großen Loop der die „lange Kante“ überspannt, mit einbezogen wird.

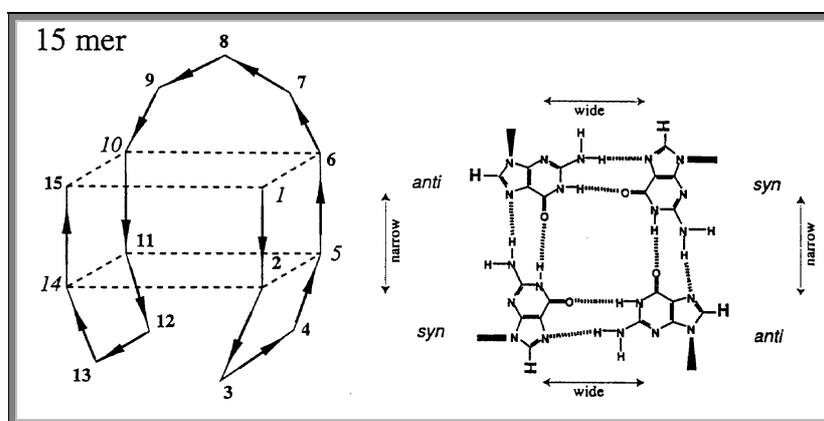


Abbildung 2.8 : Links: Schematische Struktur des Thrombin-Binding Aptamer d[G₂T₂G₂TGTG₂T₂G₂] aus NMR-Untersuchungen [Bol96]. Rechts: Aufsicht auf die G-Ebenen mit Konformation der glykosidischen Bindung und Darstellung der unterschiedlichen Kantenlängen.

Ein entscheidender funktioneller Aspekt des hier beschriebenen Polymorphismus ergibt sich bei der Betrachtung der in Abbildung 2.5 gezeigten elektrostatischen Oberflächentopologie. Diese elektrostatische Topologie ändert sich bei Rückfaltungen deutlich, so dass mit der Strukturänderung Wechselwirkungen mit anderen Molekülen ermöglicht werden. Als Beispiel für das Ausmaß dieser elektrostatischen Topologieänderungen ist in Abbildung 2.9 das 24mer in zwei, im Experimentaltel in Lösung nachgewiesenen Konformationen gezeigt.

⁷ In dieser Arbeit wurden nur Systeme vermessen, die durch T₂-Einheiten getrennte Guanin-reiche Sequenzen aufweisen (Ausnahme: Aptamer).

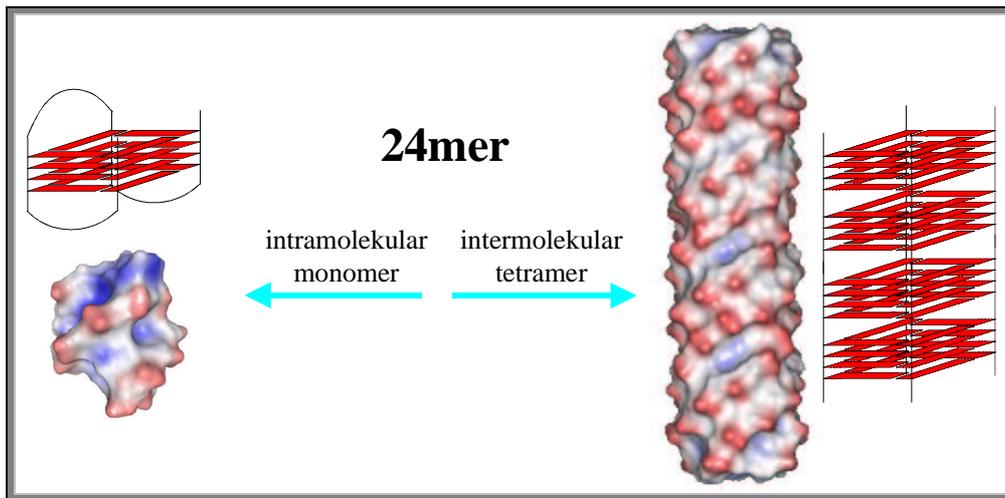


Abbildung 2.9 : Elektrostatisches Potential an der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des 24mers in zwei verschiedenen Konformationen. Links: Monomeres intramolekularer Tetraplex. Rechts: Intermolekularer tetramerer Tetraplex.

Besonders auffällig ist, dass die nach innen zeigenden Basen erst mit der Rückfaltung (beim monomeren intramolekularen Tetraplex, vgl. Abbildung 2.9-links) von außen gut zugänglich werden. Dies wird u.a. auch durch die in der CGE beobachtete, vom Strukturtyp abhängige Einlagerung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes YOYO gestützt (vgl. Kapitel 5.5.1.).

Nachdem die strukturellen Auffälligkeiten und Abweichungen der G-DNA gegenüber doppelhelikaler B-DNA dargestellt wurden, wird auf die, in Kapitel 5.6 untersuchte Möglichkeit der Kombination beider Systeme als Grundbaustein für supramolekulare Netzwerke eingegangen.

2.2.3 Supramolekulare Nanostrukturen

Für die Entwicklung multidimensionaler polyfunktioneller Netzwerke mit maximaler struktureller Integrität wird seit langer Zeit über die Verwendung von DNA nachgedacht. NADRIAN SEEMAN gilt bezüglich der Entwicklung von Netzwerkstrukturen und Nanoclustern aus Oligonukleotiden als Vorreiter. In den bisher veröffentlichten Arbeiten wird dabei jedoch fast ausschließlich DNA auf Basis der WATSON-CRICK-Basenpaarung eingesetzt [See97][See98]. Die in Netzen notwendigen Knotenpunkte werden als HOLLIDAY-Junctions oder ineinander superspiralisierter DNA-Doppelstränge [Lew98] realisiert. Dadurch ergeben sich auf Grund

2 THEORETISCHER TEIL

der Flexibilität dieser Konstruktionen enge Vorgaben an Sequenz und räumliche Ausdehnung [See98] und damit prinzipielle Schwierigkeiten bei der Generierung von DNA-Netzwerken, die es noch zu überwinden gilt.

Durch die Verwendung Guanin-reicher DNA und den daraus gebildeten tetrameren Strukturen als Knotenpunkte (G-DNA-CORE) wird die steuerbare strukturelle Variabilität auf ein Maximum erhöht. Die spezifische Stabilität, der wie in Kapitel 5.5 gezeigte steuerbare Polymorphismus und die besondere Kinetik der Quadruplexe, lassen den Schluss zu, dass funktionalisierte G-DNA exzellent für das Gesamtkonzept der Generierung mehrphasig schaltbarer supramolekularer Nanostrukturen geeignet ist. Ausgehend von gut charakterisierter G-DNA werden, durch Funktionalisierung der Anfangs- und Endbereiche mit B-DNA bildenden Sequenzen (B-DNA-JUNCTION), Bausteine synthetisiert, die sich, auf Grund der hochspezifischen Basenpaarung, selbstorganisierend verhalten.

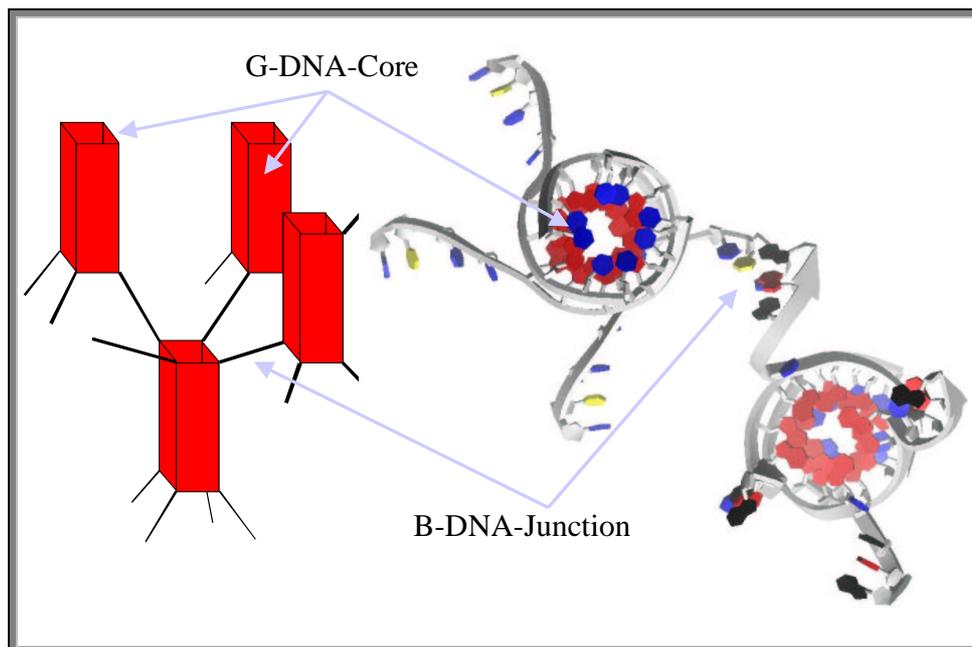


Abbildung 2.10 : Netzwerk aus funktionalisierter Guanin-reicher DNA. Links: Schematische Darstellung mit roten G-Ebenen. Rechts: Aufsicht auf die molekulare Anordnung mit einer doppelhelikalen Verbindung aus d(TCT)-d(AGA). Die entsprechenden Modellsysteme d[T₂G₄TTCT] und d[T₂G₄TAGA] werden in 5.6.3 charakterisiert.

In Abbildung 2.10 ist neben einer schematischen Darstellung (links) einer einfachen Netzwerktopologie eine mögliche Anordnung der hier charakterisierten Modellsysteme in mole-

kularer Darstellung gezeigt (rechts). Da für das Verständnis des hier eingesetzten Konzeptes grundsätzliche Hintergründe im Verlaufe des Experimentals teils erklärt werden, wird erst im Kapitel 5.6 „Supramolekulare Nanostrukturen“ vertiefend auf die strukturellen und dynamischen Besonderheiten eingegangen.

2.3 DYNAMISCHE STREULICHTSPEKTROSKOPIE AN MAKROMOLEKÜLEN IN LÖSUNG

2.3.1 Grundlagen der dynamischen Streulichtspektroskopie

Das Phänomen der Lichtstreuung lässt sich als Wechselwirkung der elektromagnetischen Wellen des Lichtes beim Durchgang durch nicht absorbierende Materie beschreiben. Dabei übt das elektrische Feld des einfallenden Lichtstrahles eine elektromagnetische Kraft auf die Elektronen der Probenmoleküle aus. Diese Elektronen werden beschleunigt und oszillieren mit der Frequenz des einfallenden Primärstrahls. In einem optisch isotropen Medium⁸ kommt es durch destruktive Interferenz zur Auslöschung der in alle Raumrichtungen emittierten Streustrahlung mit Ausnahme der Ausbreitungsrichtung des Primärstrahls.

Eine Streuung wird also nur dann beobachtet, wenn es auf Grund von lokalen Fluktuationen der Dielektrizitätszahl zu positiven Interferenzen der Streustrahlung der illuminierten Streuzentren kommt. In Mehrkomponentensystemen (z.B. DNA-Moleküle in wässriger Lösung) kommt es auf Grund der BROWNSCHEN Molekularbewegung der gelösten Moleküle zu Konzentrationsfluktuationen und dadurch bedingt zu Dielektrizitätsfluktuationen im Streuvolumen. Bei dieser thermischen Eigenbewegung der betrachteten Moleküle führt der Dopplereffekt zu einer Frequenzverschiebung des Streulichtes relativ zur Frequenz des monochromatischen Primärstrahles. Diese Verschiebung lässt sich in der Frequenz- und/oder Zeitdomäne beobachten [Pec76].

Die FABRY-PEROT INTERFEROMETRIE erlaubt die Detektion dieser Frequenzverschiebung als Linienverbreiterung des Streulichtes im Vergleich zum Primärstrahl (Detektion in der Frequenzdomäne). Bei der Detektion in der Zeitdomäne werden Intensitätsschwankungen des Streulichtes gemessen und über einen Korrelator zeitlich aufgelöst.

⁸ D.h. Brechungsindex und Dielektrizitätszahl sind im illuminierten Volumen identisch.

Die über den Korrelator ermittelte Zeitautokorrelationsfunktion der Streulichtintensität ist nach dem WIENER-KHINTCHINE THEOREM durch eine FOURIER-TRANSFORMATION mit dem zugehörigen Intensitätsspektrum verknüpft. Aus dem Intensitätsspektrum sind Informationen über die Bewegung der Moleküle und damit die hydrodynamischen Größen zugänglich.

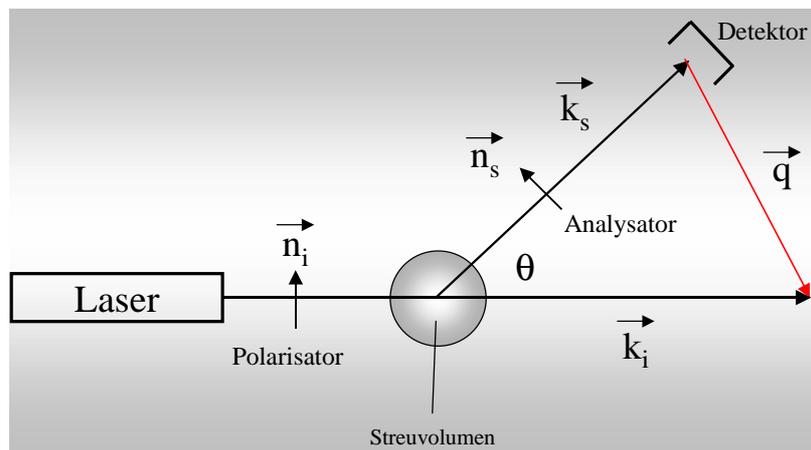


Abbildung 2.11 : Definition des Streuvektors \vec{q} .

Ein typischer Aufbau für ein dynamisches Lichtstreuexperiment ist in Abbildung 2.11 gezeigt: Ein monochromatischer, linear polarisierter Laserstrahl wird durch die Probe geleitet, wobei das unter dem Winkel θ gestreute Licht mittels eines Photomultipliers (Detektor) registriert wird. Die Wellenvektoren \vec{k}_i und \vec{k}_s beziehen sich auf das eingestrahlte bzw. das gestreute Licht, \vec{n}_i und \vec{n}_s charakterisieren die Polarisationsrichtungen der beiden Lichtstrahlen. Als Streuvektor \vec{q} bezeichnet man die Differenz der beiden Wellenvektoren.

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_s \quad (2.1)$$

mit dem Betrag (da sich die Wellenlänge beim Streuvorgang nur wenig ändert):

$$|\vec{q}| = 2|\vec{k}_i| \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.2)$$

λ = Wellenlänge des einfallenden Lichtes

n = Brechungsindex der Probe

2 THEORETISCHER TEIL

Durch Variation der Polarisation von Primärstrahl und Streustrahl lassen sich zwei verschiedene Streugeometrien definieren. In der VV-Geometrie sind Primär- und Streustrahl vertikal polarisiert, in der VH-Geometrie entsprechend der Primärstrahl vertikal und der Streustrahl horizontal. Bei ersterem Aufbau spricht man von polarisierter Lichtstreuung (im Versuchsteil in der polarisierten Photonenkorrelationspektroskopie eingesetzt), bei letzterem von depolarisierter Lichtstreuung (hier bei der FABRY-PEROT INTERFEROMETRIE verwendet).

Unter Verwendung der isotropen Polarisierbarkeit α_{iso} und des Polarisierbarkeitstensors \mathbf{a} für stäbchenförmige Moleküle,

$$\alpha_{iso} = \frac{1}{3}(\alpha_{\parallel} + 2\alpha_{\perp}) \text{ und } \mathbf{a} = \begin{pmatrix} \alpha_{\parallel} & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{\perp} \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

ergibt sich mit der anisotropen Polarisierbarkeit $\beta = (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp})$ für α_{VV} des polarisierten Experiments:

$$\alpha_{VV} = \vec{n}_i \mathbf{a} \vec{n}_s = \alpha_{iso} + \frac{4}{3} \beta \quad (2.4)$$

und im depolarisierten Fall:

$$\alpha_{VH} = \vec{n}_i \mathbf{a} \vec{n}_s = \beta \quad (2.5)$$

Ein VH-Spektrum wird also nur bei Molekülen mit anisotroper Polarisierbarkeit erhalten [Pec76].

2.3.2 Dynamische Lichtstreuung

In der dynamischen Lichtstreuung ist die Wechselwirkung zwischen dem elektromagnetischem Feld des einfallenden Lichtes und der Materie gering. Grundlage der weiteren Betrachtungen ist die LINEAR RESPONSE-Theorie [Zwa65], die bei einer linearen Antwort des Systems auf die eintreffende Strahlung davon ausgeht, dass sich die beiden schwach gekop-

pelten Systeme (Strahlung und Materie) hinreichend genau beschreiben lassen, wenn man Kenntnis über das Verhalten der Systeme in Abwesenheit der Kopplung besitzt. Damit kann in einem dynamischen Streulichtexperiment die Analyse der Streulichtfluktuationen über Zeitautokorrelationsfunktionen geschehen:

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt A(t)A(t+\tau) \quad (2.6)$$

Die Autokorrelationsfunktion beschreibt, wie stark der Wert der Variablen A zum Zeitpunkt $t + \tau$ vom Wert zum Zeitpunkt t abweicht. Im einfachsten Fall handelt es sich bei der Zeitautokorrelationsfunktion einer Messgröße um eine einfache Exponentialfunktion, die vom Mittelwert des Quadrates $\langle A^2 \rangle$ zum Zeitpunkt $\tau = 0$ auf den quadratischen Mittelwert $\langle A \rangle^2$ zum Zeitpunkt $\tau = \infty$ abfällt:

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle = \langle A \rangle^2 + (\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) \quad (2.7)$$

τ_r ist die Relaxationszeit, in welcher die Funktion auf ein e -tel des Anfangswertes abgefallen ist. Die spektrale Dichte I_{is} erhält man über eine FOURIER TRANSFORMATION aus (2.6):

$$I_{is}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} d\tau \langle A^*(0)A(\tau) \rangle \exp(-i\omega\tau) \quad (2.8)$$

mit A^* als komplex Konjugierte von A .

Im Streumedium mit dem Polarisierbarkeitstensor \mathbf{a} induziert die eingestrahlte elektromagnetische Welle in einem Molekül das (zeitlich oszillierende) Dipolmoment $\vec{\mu}$:

$$\vec{\mu}(t) = \mathbf{a}\vec{E}(t) \quad (2.9)$$

$\vec{E}(t)$ = elektrisches Feld der eingestrahnten Welle

2 THEORETISCHER TEIL

Das daraus resultierende elektrische Feld des Streulichtes ($\vec{E}_s(t)$) ist proportional zur Komponente α_{is} des Polarisierbarkeitstensors (in Richtung \vec{n}_i und \vec{n}_s):

$$\vec{E}_s(t) \propto \alpha_{is}(t) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}(t)) \quad (2.10)$$

$\vec{r}(t)$ = Ortsvektor des Streuzentrums

$$\alpha_{is} = \vec{n}_i \mathbf{a} \vec{n}_s$$

Rotations- und Vibrationsbewegungen führen dabei zu zeitlichen Schwankungen von α_{is} , Translationsbewegungen haben Änderungen des Exponentialterms zur Folge. Das gesamte Feld der gestreuten elektromagnetischen Welle ergibt sich dann durch Superposition der Beiträge aller Moleküle im Streuvolumen:

$$\vec{E}_s(t) \propto \delta\alpha_{is}(\vec{q}, t) \equiv \sum_{j=1}^N \alpha_{is,j}(t) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}_j(t)) \quad (2.11)$$

N = Anzahl der Moleküle im Streuvolumen

In den oben beschriebenen Formalismus der Autokorrelationsfunktionen eingesetzt (2.7), lässt sich jetzt die Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes des Streulichtes $\langle \vec{E}_s(0) \vec{E}_s(t) \rangle$ beschreiben durch:

$$\langle \vec{E}_s(0) \vec{E}_s(t) \rangle \propto N\alpha^2 S(\vec{q}, t) \quad (2.12)$$

wobei die Polarisierbarkeiten $\alpha_{xx} = \alpha_{yy} = \alpha_{zz}$ gesetzt wurden (sphärisches isotrop polarisierbares Makromolekül). Reduziert man die Betrachtung auf verdünnte Lösungen so geht der dynamische Strukturfaktor $S(\vec{q}, t)$ direkt in die SELF-INTERMEDIATE Streufunktion $F_s(\vec{q}, t)$ über:

$$F_s(\vec{q}, t) \equiv \sum_{j=1}^N \left\langle \exp(-i\vec{q} \cdot (\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(t))) \right\rangle \quad (2.13)$$

Über eine Betrachtung des Diffusionsverhaltens von Molekülen in verdünnter Lösung [Pec76] lässt sich zeigen, dass für $F_s(\vec{q}, t)$ gilt

$$F_s(\vec{q}, t) = \exp(-q^2 D_T t) = \exp(-\Gamma t) \quad (2.14)$$

D_T = Translationsdiffusionskoeffizient

$$\Gamma = \frac{1}{\tau_r} = D_T q^2 \quad (2.15)$$

2.3.3 Photonenkorrelationsspektroskopie

Zur Analyse von Translationsprozessen lässt sich die polarisierte Lichtstreuung einsetzen, da hierbei – sofern die Trägheitsradien der Makromoleküle klein gegen q^{-1} sind – nur der Translationsdiffusionsprozess detektiert wird. Registriert wird von dem Photomultiplier (Detektor) allerdings nicht die elektrische Feldstärke, sondern die Lichtintensität, die proportional zum Quadrat der Feldstärke ist⁹. Damit ist auch nur die Autokorrelationsfunktion der Lichtintensität $I_2(\vec{q}, t)$ (AKF⁽²⁾, Autokorrelationsfunktion 2. Ordnung) experimentell zugänglich. So muss eine Beziehung zwischen Intensitätsautokorrelationsfunktion $I_2(\vec{q}, t)$ und Feldautokorrelationsfunktion $I_1(\vec{q}, t)$ hergestellt werden. Unter Berücksichtigung von ⁹ gilt dann für die Intensitätsautokorrelationsfunktion:

$$I_2(\vec{q}, t) \equiv \langle I_s(\vec{q}, 0) I_s(\vec{q}, t) \rangle = \left\langle \left| \vec{E}_s(\vec{q}, 0) \right|^2 \left| \vec{E}_s(\vec{q}, t) \right|^2 \right\rangle \quad (2.16)$$

Die Zeitaufkorrelationsfunktion der elektrischen Feldstärke des Streulichtes ist:

$$I_1(\vec{q}, t) \equiv \left\langle \vec{E}_s^*(\vec{q}, 0) \vec{E}_s(\vec{q}, t) \right\rangle \quad (2.17)$$

Im verwendeten Versuchsaufbau der Photonenkorrelationsspektroskopie trifft nur das von der Probe gestreute Licht auf den Detektor (HOMODYNE-Experiment). Das elektrische Feld der Streustrahlung setzt sich aus einer Summe von unabhängigen Streuzentren zusammen. Bei

2 THEORETISCHER TEIL

gaußförmiger Verteilung der Streuintensität dieser Streustrahler (GAUBSCHEN STRAHLUNGSFELD) folgt aus der SIEGERT-RELATION:

$$I_2(\vec{q}, t) = |I_1(\vec{q}, 0)|^2 |I_1(\vec{q}, t)|^2 \quad (2.18)$$

für den Zusammenhang zwischen der normierten Intensitätsautokorrelationsfunktion $g_2(\vec{q}, t)$ und der normierten Feldautokorrelationsfunktion $g_1(\vec{q}, t)$ gilt:

$$g_2(\vec{q}, t) = 1 + (g_1(\vec{q}, t))^2 \quad (2.19)$$

mit:

$$g_2(\vec{q}, t) = \frac{I_2(\vec{q}, t)}{(I_2(\vec{q}, 0))^2} = \frac{\langle I_s(\vec{q}, 0) I_s(\vec{q}, t) \rangle}{\langle I_s \rangle^2} \quad (2.20)$$

und

$$g_1(\vec{q}, t) = \frac{I_1(\vec{q}, t)}{(I_1(\vec{q}, 0))^2} = \frac{\langle \vec{E}_s^*(\vec{q}, 0) \vec{E}_s(\vec{q}, t) \rangle}{\langle \vec{E}_s \rangle^2} \quad (2.21)$$

2.3.4 Datenanalyse in der Photonenkorrelationspektroskopie

Die Feldautokorrelationsfunktion $g_1(\vec{q}, t)$ ist im Idealfall verdünnter, monodisperser Lösungen kleiner sphärischer Teilchen nach Gleichung (2.14) über eine einfache Exponentialfunktion mit dem Translationsdiffusionskoeffizienten D_T und dem Betrag des Streuvektors $|\vec{q}|$ verknüpft.

Die Relaxationsrate Γ ist gleich der reziproken Relaxationszeit $(\tau_r)^{-1}$ des beobachteten translationsdiffusiven Prozesses. Durch Auftragung der Relaxationsrate gegen das Quadrat

⁹ Tatsächlich wird hier gewöhnlich die Intensität als Quadrat der Feldstärke definiert.

des Streuvektors erhält man gemäß Gleichung (2.15) den apparenten Translationsdiffusionskoeffizienten D_T .

Die experimentell ermittelten Autokorrelationsfunktionen setzen sich aus einer Summe von Exponentialfunktionen mit unterschiedlichen Relaxationsraten $\Gamma_i = D_i q^2$ gemäß einer Verteilungsfunktion $G(\Gamma)$ zusammen (Polydispersität der Probemoleküle). Die normierte Feldautokorrelationsfunktion $g_1(\vec{q}, t)$ lässt sich demnach durch folgendes Integral ausdrücken:

$$|g_1(\tau)| = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (2.22)$$

$$\text{mit } \int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma = 1$$

Für bekannte Verteilungsfunktionen lässt sich daher die experimentell erhaltene Korrelationsfunktion durch die Anpassung an eine Verteilung von Exponentialfunktionen auswerten.

Für die Lösung dieses Problems werden an dieser Stelle die gebräuchlichsten Methoden, das KUMULANTEN-VERFAHREN [Kop72] und die Auswertung durch INVERSE LAPLACE-TRANSFORMATION (ILT) [Pro82], vorgestellt.

Besteht die experimentelle Korrelationsfunktion aus einem einzelnen Relaxationsprozess, so kann die Kumulantenmethode von KOPPEL angewendet werden. Bei dieser Methode wird die logarithmierte Feldautokorrelationsfunktion:

$$\ln |g_1(\tau)| = - \langle \Gamma \rangle \tau + \ln \int_0^{\infty} G(\tau) e^{-(\Gamma - \langle \Gamma \rangle)\tau} d\tau \quad (2.23)$$

in einer Reihe von Kumulanten K_i entwickelt. Der zweite Term der logarithmierten Korrelationsfunktion wird in einer McLaurin-Reihe um die mittlere Relaxationsrate $\langle \Gamma \rangle$ entwickelt. Der erste Kumulant entspricht dabei der mittleren Relaxationsrate, $K_1 = \langle \Gamma \rangle$.

$$\ln |g_1(\tau)| = - \langle \Gamma \rangle \tau + \sum_{i=2}^{\infty} \frac{K_i}{i!} \tau^i (-1)^i \quad (2.24)$$

2 THEORETISCHER TEIL

$$\ln |g_1(\tau)| = -K_1\tau + \frac{K_2}{2!}\tau^2 - \frac{K_3}{3!}\tau^3 + \dots \quad (2.25)$$

mit

$$K_i = \int_0^{\infty} G(\Gamma) (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^i d\Gamma \quad (2.26)$$

Der normierte zweite Kumulant K_2 ist ein Maß für die Breite der Verteilung, er entspricht der Varianz σ^2 für die Abweichung der Korrelationsfunktion von einer Exponentialfunktion und liefert ein Maß für die Polydispersität der Probe. Der dritte Kumulant K_3 gibt den Grad der Asymmetrie der Verteilungsfunktion an.

Setzt sich die Korrelationsfunktion aus einer Summe von Verteilungen mehrerer Relaxationsraten zusammen, so kann die Auswertungsmethode nach Koppel nicht mehr verwendet werden. Zur Lösung der Integralgleichung (2.22) bietet sich dann eine INVERSE LAPLACE-TRANSFORMATION (ILT) an. Diese liefert aber für eine experimentelle Feldautokorrelationsfunktion, die immer mit einem Rauschen behaftet ist, unendlich viele Lösungen. Die Lösung des Inversionsproblems geschieht hier mit einem Regularisierungsverfahren, welches im FORTRAN 77 Programmpaket CONTIN von S.W. PROVENCHER [Pro82] integriert ist.

Bei diesem Regularisierungsverfahren wird zunächst die Integralgleichung innerhalb eines endlichen Frequenzfensters durch numerische Integration in ein lineares Gleichungssystem überführt. Die Anzahl der erhaltenen Lösungen muss durch zusätzliche Randbedingungen (z.B. keine negativen Lösungen) weiter eingeschränkt werden. Die endgültige Auswahl der „besten“ Lösungen erfolgt mit Hilfe eines FISCHER-FUNKTIONS-TESTES.

Man erhält so die Verteilungsfunktionen der Relaxationsraten mit der kleinst möglichen Anzahl an Extrema, im Rahmen des Anpassungsfehlers.

Liegen die beobachteten Relaxationsprozesse innerhalb einer Dekade auf der Frequenzskala, so lassen sich diese nach der Analyse mittels CONTIN nur ungenau bis überhaupt nicht voneinander unterscheiden [Pro82].

Aus den einzelnen Momenten μ_n , welche die CONTIN -Analyse liefert, kann die Varianz σ^2 der einzelnen Relaxationsraten berechnet werden.

$$\mu_0 = \int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma ; \mu_1 = \int_0^{\infty} \Gamma G(\Gamma) d\Gamma ; \mu_2 = \int_0^{\infty} \Gamma^2 G(\Gamma) d\Gamma \quad (2.27)$$

Der normierte zweite Kumulant μ (normierte Varianz) ist dabei über die mittlere Relaxationsrate $\langle \Gamma \rangle$ (erster Kumulant) sowie die mittlere quadratische Relaxationsrate $\langle \Gamma^2 \rangle$ (zweiter Kumulant, Varianz σ^2) definiert.

$$\frac{\mu_1}{\mu_0} = \langle \Gamma \rangle \quad ; \quad \frac{\mu_2}{\mu_0} = \langle \Gamma^2 \rangle \quad (2.28)$$

$$\mu = \frac{\langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (2.29)$$

2.3.5 Fehlerabschätzung in der Photonenkorrelationsspektroskopie

Fehlerquellen für die PKS sind in erster Linie die Temperaturschwankungen und Ungenauigkeiten bei der Winkeleinstellung. Nimmt man an, dass die Temperatur auf 0.3°C und der Winkel auf 0.01° genau eingestellt werden können, so ergibt sich für den Translationsdiffusionskoeffizienten bei 20°C und einem Streuwinkel von 90° ein relativer Fehler von 2% [Bol98]. Durch die Auswertung mit dem Programm CONTIN [Pro82] ergeben sich jedoch weitere Fehlermöglichkeiten bei fehlerhafter Wahl des Datenbereichs für die Anpassung. Bei mehrfacher Auswertung lagen hier die Abweichungen teilweise im Bereich von 4%, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt [Bol98].

2.3.6 Fabry-Perot Interferometrie

Bei den Fabry-Perot Interferometern handelt es sich um hochauflösende optische Filter, die zur Bestimmung sehr schneller Prozesse im Bereich von ca. 10^{-6} bis 10^{-10} s eingesetzt werden [Pec76].

Das Interferometer besteht im wesentlichen aus zwei auf der Innenseite verspiegelten Platten, zwischen denen das eingestrahlte Licht (hier das Streulicht der Probe) vielfach reflektiert wird. Positive Interferenz tritt dann bei einem Spiegelabstand d für planparallele Spiegel unter der Bedingung

$$d = n \frac{\lambda}{2} \quad (2.30)$$

λ = Wellenlänge

n = ganze Zahl

ein. Licht anderer Wellenlängen wird durch destruktive Interferenz ausgelöscht. Bei der Aufnahme eines Spektrums wird der Spiegelabstand über piezoelektrische Elemente variiert, wobei die Intensitätsmaxima periodisch im Frequenzabstand von

$$FSB = \frac{c}{2d} \quad (2.31)$$

für planparallele Spiegel bzw.

$$FSB = \frac{c}{4d} \quad (2.32)$$

für konfokale Spiegel auftreten. Diese Größe wird als freier spektraler Bereich (FSB) bezeichnet.

Viele Moleküle lassen sich in erster Näherung als zylindersymmetrische Teilchen beschreiben, für welche die spektrale Dichte in VH-Geometrie gegeben ist durch [Pec76]:

$$I_{VH}(\vec{q}, \omega) = \langle N \rangle \frac{1}{\pi} \left\{ \frac{1}{15} \beta^2 \frac{(6\theta + \Gamma)}{\omega^2 + (6\theta + \Gamma)^2} \right\} \quad (2.33)$$

Die Rotationen sind bei den hier vorliegenden Strukturen so schnell, dass der Beitrag des Translationsdiffusionskoeffizienten vernachlässigt werden kann. Schreibt man die spektrale Dichte nicht als Funktion der Kreisfrequenz ω , sondern als Funktion der Frequenz ν , so erhält man:

$$I_{VH}(\nu) = K \langle N \rangle \beta^2 \frac{\Gamma_R}{\Gamma_R^2 + \nu^2} \quad (2.34)$$

K = Proportionalitätsfaktor

Demnach wird das Spektrum symmetrischer Rotatoren in der depolarisierten Lichtstreuung von einer LORENTZ-Funktion mit der Halbwertsbreite

$$\Gamma_R = \frac{1}{2\pi\tau_R} = \frac{6\theta}{2\pi} \quad (2.35)$$

gebildet. Aus der Halbwertsbreite lassen sich dann die Rotationsrelaxationszeit τ_R bzw. der Rotationsdiffusionskoeffizient θ bestimmen.

2.3.7 Datenanalyse in der Fabry-Perot Interferometrie

Das experimentell ermittelte Spektrum $I_{\text{exp}}(\omega)$ ist die Faltung der Apparatfunktion $A(\omega)$ mit dem wahren Spektrum $I(\omega)$.

$$I_{\text{exp}}(\omega) = A(\omega) * I(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} A(\omega') I(\omega - \omega') d\omega' \quad (2.36)$$

Mit Gleichung (2.34) als Funktion der Kreisfrequenz ω folgt dann:

2 THEORETISCHER TEIL

$$I_{\text{exp}}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} A(\omega') K \langle N \rangle \beta^2 \frac{\Gamma_R}{\Gamma_R^2 + (\omega - \omega')^2} \quad (2.37)$$

Beschränkt man sich bei den Integralgrenzen auf den freien spektralen Bereich (endliche Anzahl an diskreten Messpunkten), so ist eine Darstellung von (2.37) als Summe möglich. Experimentell werden vier Ordnungen dargestellt, wobei an erster und vierter Position nur die Apparatefunktion erscheint, die beiden mittleren Ordnungen stellen besagte Faltung dar (vgl. [Nie96]). Da jede Ordnung jedoch Beiträge anderer Ordnungen enthält, muss zusätzlich über alle Ordnungen des Spektrums aufsummiert werden.

$$I_{\text{exp}}(\omega) = \sum_{i=1}^n A(\omega') \sum_{k=1}^m K \langle N \rangle \beta^2 \frac{\Gamma_R}{\Gamma_R^2 + (\omega - \omega'_i - \omega_k)} \quad (2.38)$$

n = Anzahl der Messpunkte¹⁰ innerhalb eines FSBs

m = Anzahl der Ordnungen

ω_k = Frequenz des Maximums k -ter Ordnung

Die Apparatefunktion und die Spektren der zweiten und dritten Ordnung werden an LORENTZ-Funktionen angepasst und die ermittelten Anpassungsparameter bei einer iterativen Entfaltungsprozedur (rekursive Anpassung und Faltung) als Schätzwerte eingesetzt. Dabei wird die Summation über die Ordnungen auf die gemessenen und auf jeweils zwei niedrigere und zwei höhere Ordnungen beschränkt. Die Minimierung der Abweichungsquadrate erfolgt nach einem MARQUARDT-Verfahren.

2.3.8 Fehlerabschätzung in der Fabry-Perot Interferometrie

Bei der FPI ergeben sich Fehler durch die Temperaturempfindlichkeit der Apparatur, die zu einer Frequenzdrift führt. Diese Fehler sind nur schwer abzuschätzen; an stark streuenden Proben ergaben sich bei Mehrfachbestimmungen jedoch Abweichungen unter 2%. Weitere Fehlereinflüsse erhält man aber auch hier durch die Auswertung. Gerade bei sehr schwach

¹⁰ Da die vier Ordnungen auf 2048 Kanäle der MCS-Karte verteilt werden, ist $n \approx 500$ (vgl. Kapitel 4.1.2)

streuenden Proben – wie hier im Fall des 8mers $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2]$ – betragen die relativen Abweichungen 3% bis 7%. In diesen Fällen wurde durch Messzeiten bis zu 5h pro Temperatur (≈ 4800 Einzelspektren) und Mehrfachbestimmungen versucht, den Fehler zu minimieren ($<4\%$).

2.3.9 Hydrodynamik

Für die Diffusion kugelförmiger Moleküle in Lösung gelten die STOKES-EINSTEIN BEZIEHUNGEN:

$$D_T = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (2.39)$$

$$\theta = \frac{kT}{8\pi\eta_0 R_h^3} \quad (2.40)$$

R_h = hydrodynamischer Radius

η_0 = Viskosität des Lösungsmittels

Damit folgt über Gleichung (2.35) die STOKES-EINSTEIN-DEBYE BEZIEHUNG:

$$\tau_R = \frac{\eta_0 V_h}{kT} \quad (2.41)$$

V_h = hydrodynamisches Volumen

Über die Temperaturabhängigkeit von τ_R bzw. D_T lassen sich daher Aussagen über das hydrodynamische Volumen der Teilchen machen.

2.4 HYDRODYNAMISCHE MODELLRECHNUNGEN

Modellrechnungen ermöglichen die Vorhersage hydrodynamischer Größen von Makromolekülen beliebiger Gestalt in Lösung. Durch den Vergleich der aus den Modellrechnungen erhaltenen Daten mit experimentell bestimmten Werten sind Aussagen zur in Lösung vorliegenden Struktur möglich [Bol99].

Bei dem hier verwendeten „Bead“-Modell wird die Form der zu berechnenden Makromoleküle durch Kugeln angenähert, wobei in *reduzierten Modellen* Atomgruppen (z.B. der Heterozyklus der Basen oder die Wassermoleküle) zu einer Kugel zusammengefasst werden. In der z. Zt. bestmöglichen Annäherung an die fraktale Dimension des zu berechnenden Systems entsprechen die Kugeln den VdW-Radien der vorkommenden Elemente (atomare Auflösung – vgl. Abbildung 2.12-rechts).

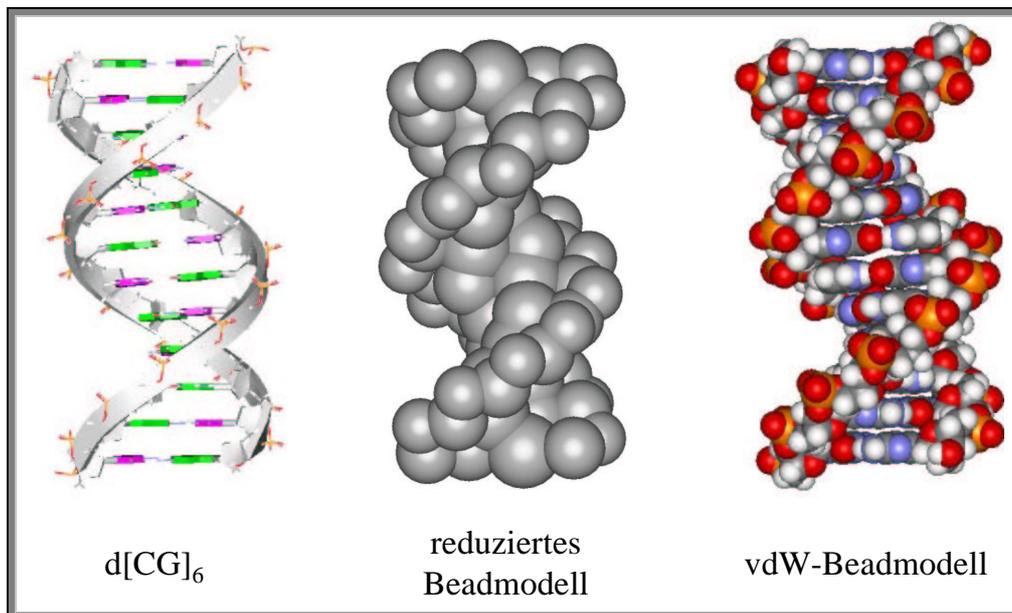


Abbildung 2.12 : Links: Die Sequenz d[CG]₆ in schematischer Darstellung. Mitte: Ein reduziertes Beadmodell ebendieser Sequenz (vgl. [Nie96]). Rechts: Atomare Darstellung mit vdW-Radien der enthaltenen Elemente.

Die Durchführung der in [Gar77][Gar81][Blo77][Nie96] beschriebenen hydrodynamischen Modellrechnungen zu den Transporteigenschaften von Makromolekülen in Lösung werden in

diesem Kapitel für verschiedene DNA-Modellsysteme vorgestellt. Dabei ist es erstmalig möglich, alle Strukturen in atomarer Auflösung darzustellen und zu berechnen, was gegenüber [Nie96] zu einer Erhöhung der Vorhersagegenauigkeit für den Translationsdiffusionskoeffizienten und der Rotationsrelaxationszeit führt.

2.4.1 Modellsysteme

Um die Leistungsfähigkeit und Präzision der gegenüber [Nie96] modifizierten Durchführung und veränderten Programmteile des verwendeten Programmpaketes zu untersuchen, werden verschiedene, gut charakterisierte DNA-Sequenzen bekannter Konformation (sog. Modellsysteme) gerechnet und anschließend die erhaltenen hydrodynamischen Transportgrößen mit den experimentell ermittelten (Literatur-)Daten verglichen. Eine Übersicht der verwendeten Sequenzen/Strukturtypen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Die hydrodynamischen Größen der in Tabelle 2.1 aufgeführten selbstkomplementären doppelhelikalen Sequenzen (Strukturtyp: B-DNA) werden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, ermittelt. Ausgehend von den für diese Modellsysteme erhaltenen Ergebnisse werden die Rechnungen auf komplexere Strukturen ausgedehnt (Strukturtyp: Z-DNA und Strukturtyp: Hairpin-B-DNA).

Strukturtyp	Bezeichnung	Sequenz
B-DNA, Duplex	8mer	$d[(CG)_4]^{DLS}$
	12mer	$d[(CG)_6]^{DLS}$
	16mer	$d[(AT)_3(CG)_2(AT)_3]^{DLS}$
B-DNA, Hairpin	13mer	$d[(CG)_2TTGTT(CG)_2]^{DLS}$
	17mer	$d[(CG)_3TTGTT(CG)_3]^{DLS}$
Z-DNA, Duplex	24mer	$d[(CG)_{12}]^{DLS}$
G-DNA, intramolekular	15mer	$d[GGTTGGTGTGGTTGG]^{DLS, NMR}$
	24mer	$d[(T_2G_4)_4]^{DLS, NMR}$
G-RNA, intermolekular	6mer	$r[UG_4U]^{DLS, NMR}$

Tabelle 2.1: Sequenzen der DNA-Konformere die zur Verifizierung der Modellrechnungen verwendet werden. DLS: Transportgrößen aus Lichtstreuungsmessungen, NMR: Strukturdaten aus NMR-Untersuchungen in wässriger Lösung.

2 THEORETISCHER TEIL

Zum Abschluss der Verifizierung werden die Untersuchungen auf die Tetraplexe erweitert. Hier sind die berechneten hydrodynamischen Größen von zwei rein intramolekularen und einem rein intermolekularen Tetraplex mit experimentellen Ergebnissen zu vergleichen. Gerade zu diesen Tetraplexen liegen neben Ergebnissen aus der Streulichtspektroskopie auch NMR-Strukturdaten vor, wobei die Ionenstärken und allg. Lösungsbedingungen mit denen, die in den Proben für die Lichtstreuung eingestellt wurden vergleichbar sind. Damit können diese Strukturdaten als „in Lösung wahr“ für die Rechnungen eingesetzt werden, was von Bedeutung für die Berechtigung der Grundstrukturgenerierung¹¹ ist.

2.4.2 Durchführung der Modellrechnungen

Die Durchführung der hydrodynamischen Modellrechnung setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen (vgl. Abbildung 2.13):

- I. Generierung der solvatisierten DNA.
- II. Berechnung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ASA/CSA-Konzept [Nie96]) mittels des FORTRAN77-Programms MBA [Lee88]. Hier wird der Radius für die H₂O-Probenkugel auf 140pm festgesetzt.
- III. Ermittlung der hydrodynamischen Größen mittels des FORTRAN77-Programms NICEMENOT¹² unter *stick* Randbedingungen und mit dem originalen OSEEN Tensor [Nie96].

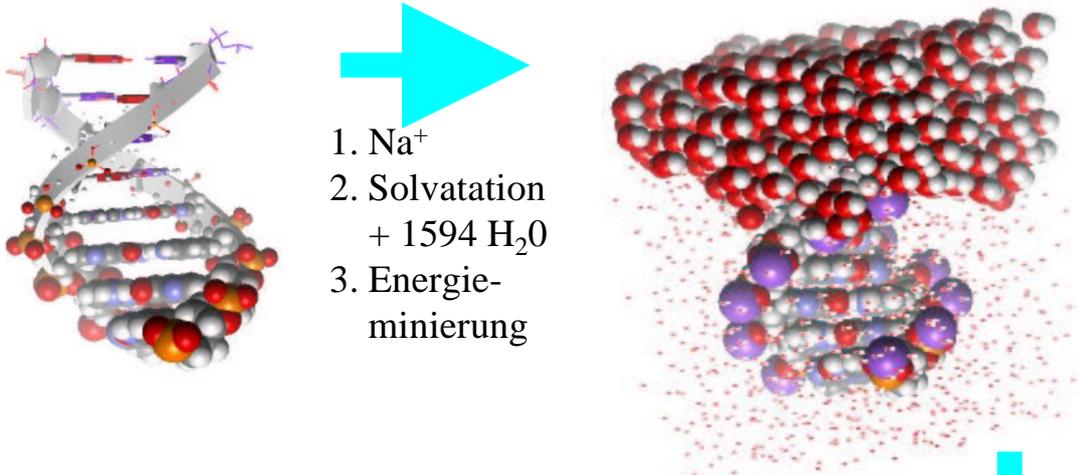
¹¹ Eventuelle Abweichungen von den Ergebnissen der doppelhelikalen Systeme (bezüglich Wasserhüllendicke etc. vgl. Kapitel 2.4.2.1) können bei der Verwendung von Strukturdaten aus anderen Untersuchungsmethoden (mit anderen Lösungsbedingungen) nicht zugeordnet werden, da bei anderen Bedingungen auch (geringfügig) andere Strukturen/Morphologien vorliegen könnten und damit der Vergleich der Modellrechnungen mit den Ergebnissen der DLS redundant wäre.

¹² Dieses Programm basiert auf dem Programmpaket TRANSP und TRV von J. GARCIA DE LA TORRE, Departamento de Química Física, Universidad de Murcia, Murcia, Spain.

Modellrechnungen – D_T und τ_R

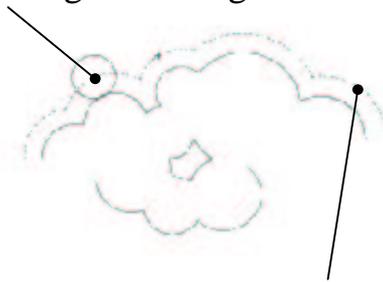
I. Generierung der solvatisierten DNA.

HyperChem, PDB-Datenbank... (Modellsequenz 8mer Duplex).



II. ASA/CSA - Konzept

Lösungsmittelkugel

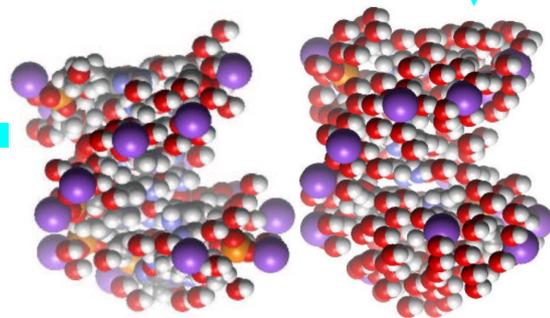


ASA accessible surface area

→ CSA →

x,y,z Koordinaten und effektiver
Radius der dem Lösungsmittel
zugänglichen Kugel

Wasserhülle
schneiden

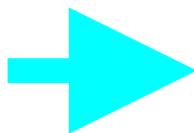


$d = 270 \text{ pm}$

$d = 380 \text{ pm}$

III. Berechnung

der hydrodynamischen Größen



	experimentelle Werte		Modell	
	$\tau_R^{20^\circ}$	$D_T^{20^\circ\text{C}}$	$D_T^{20^\circ\text{C}}$	$\tau_R^{20^\circ}$
B-DNA 8mer (CG) ₄	3.22	1.53	1.58 $d = 270$	3.10
			1.56 $d = 305$	3.28
			1.46 $d = 380$	3.86

Abbildung 2.13 : Durchführung der hydrodynamischen Modellrechnungen am Beispiel des 8mer Duplexes.

2 THEORETISCHER TEIL

Alle in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisse wurden mit weiterentwickelten Programmen erzielt, die ursprünglich von ¹², [Lee88] und [Nie96] geschrieben wurden. Die Rechnungen fanden auf xx86¹³ kompatiblen WINDOWS 9X- und LINUX- (Kernel 2.1 o. höher) Rechnern statt. Dabei standen unter Linux bis zu 512MB Hauptspeicher zur Verfügung.

2.4.2.1 Bildung der Grundstruktur und Hydrathülle (I)

Zur Durchführung der Modellrechnungen müssen die Strukturdaten der DNA-Moleküle einschließlich der umgebenden Wasserhülle im PDB¹⁴-Format vorliegen. Die Generierung der Grundstruktur der Duplex- und Hairpin-Spezies (vgl. Tabelle 2.1) wird mit dem WINDOWSTM Programm HYPERCHEMTM [Hyp96] nach [Nie96] durchgeführt. Abweichend von dem dort beschriebenen Vorgehen, werden die Natriumgegenionen bei allen gerechneten Strukturen in 166.8pm Entfernung zu den Phosphatgruppen platziert. Die Tetraplexstrukturen werden entweder direkt aus der PDB-Datenbank geladen, sofern NMR- oder Röntgenstrukturanalysen bereits durchgeführt wurden, oder mittels HYPERCHEM durch den Umbau bereits vorhandener, ähnlicher Strukturen bereitgestellt. Die genaue Anamnese der Daten für die hydrodynamischen Modellrechnungen der einzelnen Systeme ist im Anhang (Kapitel 9.2) dokumentiert. HYPERCHEM bietet gleichzeitig die Möglichkeit, die Grundstrukturen zu solvatisieren, wobei die Größe der Wasserbox in alle Raumrichtungen auf +830pm zur Ausdehnung der DNA-Struktur gewählt wird. Dabei beträgt der Mindestabstand zwischen dem Sauerstoffatom des Wassers und der DNA-Oberfläche 230pm, so dass in alle Raumrichtungen die Dicke der Wasserhülle mindestens 600pm beträgt. Anschließend wird die DNA und die Wasserbox je zweimal abwechselnd einer Geometrieoptimierung unterworfen¹⁵. Die Wasserbox und die Struktur werden danach gleichzeitig einer kurzen MD-Simulation¹⁶ unterzogen, um die Wassermoleküle optimal um die DNA zu platzieren und eventuelle Spannungen in dem DNA-Gerüst zu verringern. In den Tetraplexen werden dabei die G-Ebenen durch Anlegen eines

¹³ Ausschließliche Verwendung von AMD-Prozessoren [AMD].

¹⁴ Protein Data Bank.

¹⁵ Tetraplexebenen, die aus NMR-Daten (in Lösung) generiert wurden, werden durch Anlegen eines harmonischen Potentials immer festgehalten. FLETCHER-REEVES Geometrieoptimierung, Abbruchkriterium RMS Gradient < 0.1kcal/mol.

¹⁶ AMBER-Kraftfeld, 10ps Laufzeit bei 293K, Zeitschritt: 0.001ps.

harmonischen Potentials¹⁷ festgehalten. Da HYPERCHEM nur Solvensboxen kleiner 56104.1pm Kantenlänge generieren kann, mussten die Strukturen des 24mer Z-DNA Duplexes, des 24mers als tetramerer Tetraplex und die supramolekularen Strukturen anders bereitgestellt werden. Das entsprechende DNA-Grundgerüst wird hierfür geteilt, die einzelnen Hälften wie oben und im Anhang dokumentiert, modifiziert und anschließend wieder zusammengeführt.

2.4.2.2 Berechnung von ASA/CSA (II) und der hydrodynamischen Größen (III)

Für die Berechnung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (Schritt **II**) wird dem *Schalenmodell* (vgl. [Nie96]) entsprechend verfahren. Dabei werden aus der Lösungsmittelbox, welche die DNA umgibt, Wasserhüllen in Dicken von 250 bis 400pm in einer Schrittweite von 10pm geschnitten¹⁸. Hier werden jeweils all die Wassermoleküle in die Modellrechnung miteinbezogen, deren Sauerstoffatom innerhalb des vorgegebenen Abstands d von der DNA-Oberfläche entfernt liegt. Die Natriumionen werden dabei wie Wassermoleküle behandelt und bei entsprechendem Abstand in die Modellrechnungen mit einbezogen¹⁹. Der gesamte Vorgang ist in Abbildung 2.13 schematisch am Beispiel des 8mer Duplexes dargestellt. Als Accessible Surface Area (**ASA**) wird dann die Fläche definiert, die durch das Zentrum einer über das Molekül gerollten Lösungsmittelkugel aufgespannt wird. Die Contact Surface Area (**CSA**) entspricht dem Anteil an der VAN DER WAALS-Oberfläche, die von der Probenkugel berührt werden kann. Aus dieser Fläche wird wiederum für die einzelnen Reibungszentren ein effektiver Radius von sich nicht überlappender Kugeln berechnet. Diese gehen dann mit ihren x , y und z -Koordinaten in die eigentliche Berechnung (Schritt **III** - [Nie96]) ein.

Aus der in Abbildung 2.13 unter **II** gezeigten Generierung der ASA und damit auch der CSA wird ein wichtiger Punkt für die Berechnung der hydrodynamischen Größen deutlich. Bei Strukturen, die eine zerklüftete Oberflächentopologie (vgl. auch Abbildung 2.5) aufweisen, werden (Wasser-)Moleküle in diesen Spalten und Furchen nur berücksichtigt, wenn sie der

¹⁷ POSITION RESTRAINING.

¹⁸ Nachdem sich im Verlaufe der Arbeit die Dimension der zu berücksichtigenden Wasserhülle abzeichnete, wurde im Bereich von 280pm bis 320pm in 5pm Schritten gerechnet, dafür auf die 380pm bis 400pm verzichtet.

¹⁹ Für die Natriumionen wird dabei *nicht* der in den Abbildungen verwendete Van der Waals Radius eingesetzt, sondern der VdW-Radius des Sauerstoffs als Größe herangezogen.

2 THEORETISCHER TEIL

Probenkugel zugänglich sind. D.h., dass sich eine dickere Wasserhülle nicht linear auf die berechneten Transportgrößen auswirken muss, was in Abbildung 5.1-links oben gezeigt ist. Gleichzeitig wird die Begrenzung der fraktalen Dimension von d auf die Schrittweite von max. 10pm begründet und die hohe Sensitivität der Methode dokumentiert.

Abschließend werden die Ergebnisse der hydrodynamischen Modellrechnungen mit den experimentell ermittelten Transportgrößen verglichen. Die Verifizierung der zu berücksichtigenden Wasserhülle wird in 5.1 ausführlich erläutert.

2.4.3 Fehlerabschätzung

Zu den Modellrechnungen kann auf Grund fehlender Mehrfachberechnungen (für die Intel-systemen) und mangelnder Kenntnis der genauen Hardwareausstattung nur eine Beobachtung beschrieben werden. Bei den Modellrechnungen zeigte sich wiederholt, dass derzeitige²⁰ Intel Pentium II/III Systeme [Intel] nicht zur Durchführung geeignet sind. Die literaturbekanntesten²¹ Fehler im Fließkomma- und Ganzzahlbereich wirken sich bei dem für Testrechnungen verwendeten Modellsystem des 8mers in Abweichungen bis zu 11% in der Rotationsrelaxationszeit aus (5.42ns auf AMD [konsistent für AMD K6-200, K6-II 450, K6-III 400] und HP (Apollo 9000 Workstation) vs. 4.90ns auf Intel PIII – 900MHz, 4.78ns auf PII 350MHz). Es wurde immer SUSE Linux 6.3-7.3 [SuS01] verwendet und der Quellcode neu kompiliert (g77-Compiler).

²⁰ Stand 2/2001.

²¹ Pentium® III Processor datasheet (Order Number 244452-001) [Intel].

2.5 UV-SPEKTROSKOPIE

Die UV-Spektroskopie ist ein Verfahren der optischen Spektroskopie, das auf der spezifischen Absorption von Ultraviolettstrahlung durch UV-aktive Chromophore in anorganischen und organischen Verbindungen beruht. Sie dient in der Biochemie/Biologie u.a. zur Konzentrationsbestimmung von DNA oder Proteinen in Lösung. Da in kooperativen Strukturen wie der DNA (Basenstapelung entlang der Helix) die Absorption von der Tertiärstruktur abhängig ist, sind über die Differentialanalyse der temperaturabhängig aufgenommenen Spektren auch Aussagen zur Struktur, bzw. zu Strukturänderungen der DNA möglich.

Elektromagnetische Strahlung kann bei der Wechselwirkung mit Materie gestreut (vgl. Kapitel 2.3.1) oder absorbiert werden. Betrachtet man die Absorption, so nimmt die Intensität der Strahlung nach dem LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz auf dem Weg durch das Probenvolumen exponentiell ab:

$$\log \frac{I}{I_0} = -\varepsilon[c]d \Leftrightarrow A = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2.42)$$

Hierin ist d die Schichtdicke des absorbierenden Mediums, $[c]$ die Konzentration des Chromophors und ε der molare Extinktionskoeffizient (wellenlängenspezifisch). A ist die Absorption und wird häufig als Absorbanz, Extinktion oder in der Biologie/Biochemie als optische Dichte (o.D.) bezeichnet.

Die UV-Spektren von Nukleinsäuren sind geprägt durch die starke Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen im Wellenlängenbereich von 240-280 nm, die durch die Stereochemie und konformative Wechselwirkungen mit dem Ribose-Phosphat-"Backbone" beeinflusst werden [Bla96]. Das Absorptionsmaximum liegt dabei für Oligonukleotide bei etwa 260 nm [Lew98], die zugehörigen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{260 \text{ nm}}$ haben Werte in der Größenordnung von ca. $10^4 - 10^5 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$. UV-Messungen bei dieser Wellenlänge dienen zur Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung [Bla96] (vgl. Kapitel 4.2).

2 THEORETISCHER TEIL

Neben der Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben wird die UV-Spektroskopie zur Untersuchung des Schmelzverhaltens von DNA eingesetzt. Erwärmt man doppelsträngige DNA, beginnen sich ab einer bestimmten Temperatur die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen abrupt zu lösen (kooperativer Effekt der Basenstapelung). Diese Temperatur ist von der Basensequenz des DNA-Stranges, der Ionenstärke und Ionenart der Lösung abhängig. Die mit dem Aufschmelzen verbundene Zunahme der Absorption bei 260nm wird als hyperchromer Effekt bezeichnet. Eine Änderung im Absorptionsverhalten kann auf strukturabhängige Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zurückgeführt werden [Bla96] und ist z.B. zu beobachten, wenn es zu einer Aufhebung der Stapelung der Basen (etwa in einer Doppelhelix) kommt. Bei einer Auftragung der Absorption ($\lambda = 260\text{nm}$) gegen die Temperatur erhält man eine sigmoide Kurve (vgl. Abbildung 2.14-rechts), deren Wendepunkt als Schmelztemperatur (T_m) der DNA definiert ist.

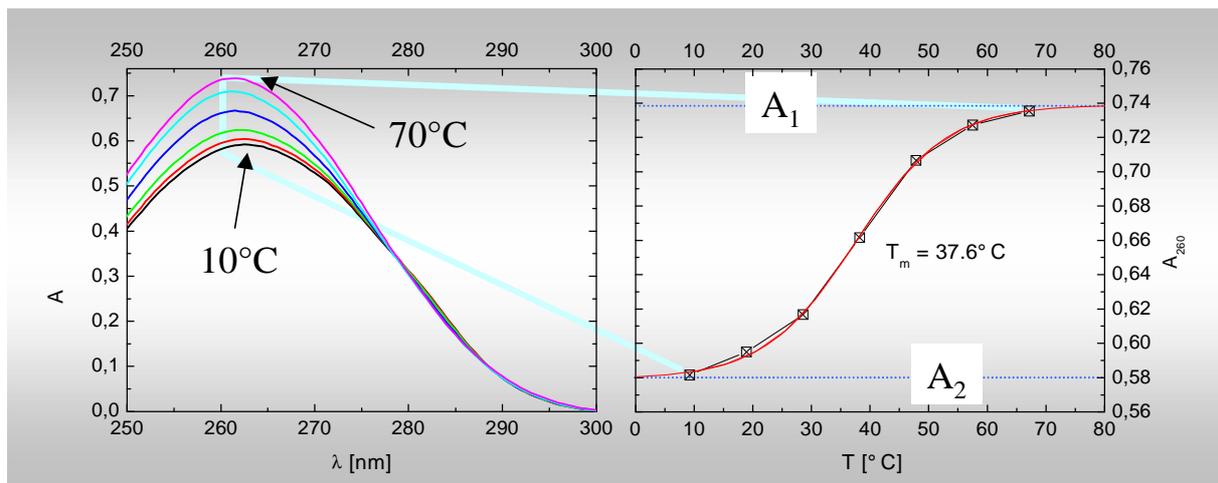


Abbildung 2.14 : Links: Schmelzverhalten einer 16bp Doppelhelix d[(AT)₈]. Rechts: Temperaturabhängige Absorptionswerte bei $\lambda=260\text{nm}$ (Schmelzkurve). A_1 und A_2 stellen die Plateau-Werte da, A_1 entspricht dem Absorptionswert der aggregierten Struktur, A_2 entspricht dem Wert, wenn alle Doppelhelices geschmolzen sind.

Auch bei den hier untersuchten Tetraplexen aus Guanin-reichen Oligonukleotiden lässt sich ein Schmelzen beobachten.

Das Schmelzverhalten und die Schmelzkurve der G-DNA Sequenz d[G₂T₂G₂TGTG₂T₂G₂] ist in Abbildung 2.15 gezeigt. Die Spektren dieses Oligonukleotids zeigen zwei isosbestische Punkte bei etwa 285nm und 270nm (Abbildung 2.15-links). Zwischen diesen Punkten beo-

bachtet man einen hyperchromen Effekt, d.h. die Absorption ist bei gestapelten Basen in Quadruplexen niedriger als die Absorption bei den nach dem Aufschmelzen vorliegenden Einzelsträngen.

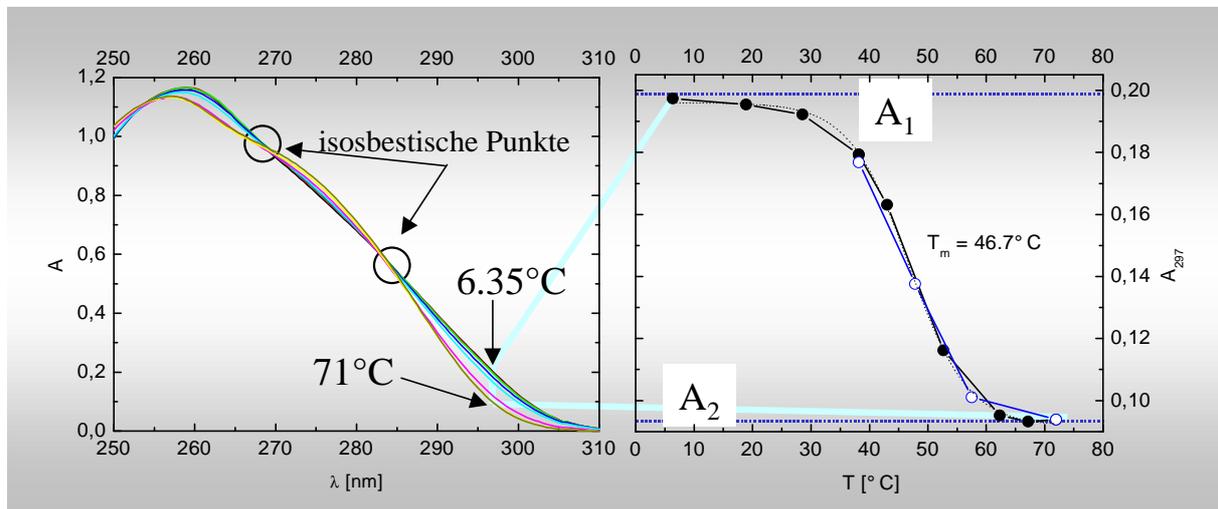


Abbildung 2.15 : Links: Schmelzverhalten einer intramolekularen Tetraplexstruktur (15mer). Rechts: Schmelzkurve (geschlossene Symbole) und Abkühlkurve (offene Symbole). A_1 : intakter Tetraplex. A_2 : vollständig geschmolzener Tetraplex.

Da die Absorption am isosbestischen Punkt weitgehend unabhängig von der temperatur- und ionen(art)abhängigen Tertiärstruktur des Oligonukleotids ist, kann in dem jeweiligen Wellenlängenbereich sehr genau die Konzentration bestimmt werden (vgl. Kapitel 4.1.3 und 4.2).

Die in Abbildung 2.16 dargestellten relativen Differenzbeträge der Sequenz $d[T_2G_4T_2G_4T_2]$ in 48mM NaCl zeigen, dass die prozentualen (relativen) Absorptionsänderungen ab dem isosbestischen Punkt bei 285nm-290nm in Richtung des längeren Wellenlängenbereiches stark ansteigen und für 297nm über 30% ausmachen (bei anderen Sequenzen kann die Änderung hier 50% – 80% betragen [Mer98]). Dagegen beträgt die relative Änderung bei 260nm lediglich 4%. Daher ist bei 297nm die Bestimmung der Schmelztemperatur sehr viel genauer möglich als bei 260nm. Die Messung bei noch größeren Wellenlängen durchzuführen bringt auf Grund der nur noch sehr schwachen Absorption der Lösungen lediglich bei höher konzentrierten Proben Vorteile. Gleichzeitig wird das Vermessen sehr konzentrierter DNA-Proben ermöglicht, das erlaubt, direkt mit den für die Lichtstreuung angesetzten Proben zu arbeiten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Unterscheidungsmöglichkeit von G-

2 THEORETISCHER TEIL

Quartettbildung (hypochrom bei 297nm) und C-G-Basenpaarung bei der Doppelhelixbildung (hyperchrom bei 297nm) [Mer98].

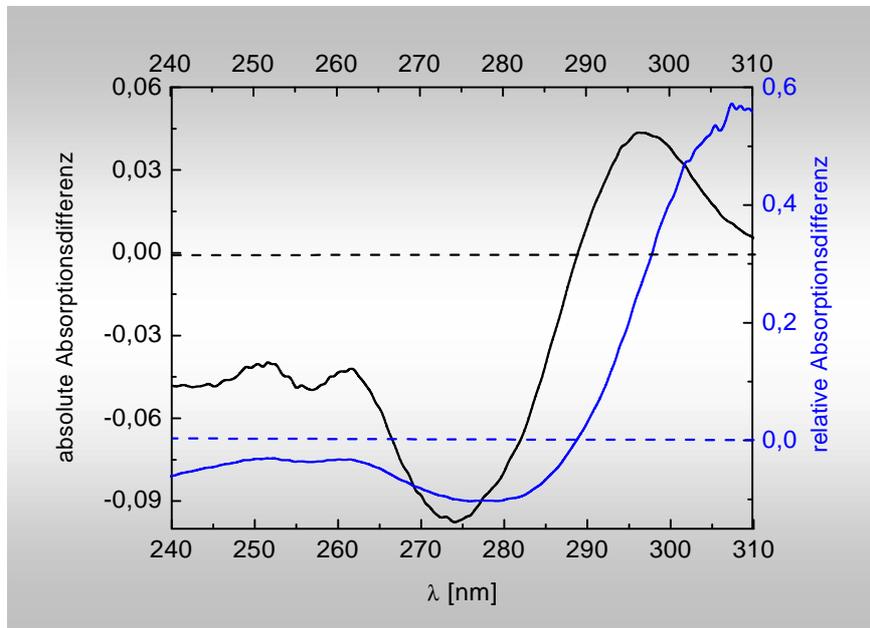


Abbildung 2.16 : Absolute (schwarz) und relative (blau) Absorptionsdifferenzen für das Schmelzen der Sequenz d[T₂G₄T₂G₄T₂] mit c(DNA) = 22µm in 48mM NaCl. Messtemperaturen 20°C (aggregiert) und 75°C (vollständig geschmolzen).

Neben Beiträgen zur Strukturaufklärung (vgl. auch Kapitel 5.7) bietet die UV-Spektroskopie die Möglichkeit, thermodynamische Daten Guanin-reicher DNA zu ermitteln.

Für die molare freie Standardenthalpie ΔG° gilt:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (2.43)$$

mit der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante K . ΔG° kann auch als Funktion der molaren Standardenthalpie ΔH° und der molaren Standardentropie ΔS° ausgedrückt werden

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (2.44)$$

Damit gilt für $\ln K$

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (2.45)$$

Nimmt man an, dass ΔH° und ΔS° im betrachteten Temperaturintervall temperaturunabhängig sind, so sind diese Größen aus der Geradengleichung zugänglich.

Für die Bildung eines Tetraplexes gilt:



und damit für K :

$$K = \frac{[\text{Tetraplex}]_n}{[\text{Einzelstrang}]^n} \quad (2.47)$$

Anhand einer sigmoidalen Schmelzkurve (vgl. Abbildung 2.15) kann der Anteil der Tetraplexe mit zerstörter Tertiärstruktur an der Gesamtzahl der Tetraplexe (vor dem Schmelzen) bestimmt werden²². Damit folgt:

$$\frac{A(T) - A_2}{A_1 - A_2} = \frac{[\text{Tetraplexe}]}{[\text{Tetraplexe}]_0} \quad (2.48)$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung (2.46) folgt:

$$[\text{Tetraplex}]_0 = \frac{1}{n} [\text{Einzelstrang}]_0 \quad (2.49)$$

Und damit für Gleichung (2.48):

$$\frac{A(T) - A_2}{A_1 - A_2} = \frac{[\text{Tetraplexe}]}{\frac{1}{n} [\text{Einzelstrang}]_0} \quad (2.50)$$

Für die Gleichgewichtskonstante K ergibt sich:

²² Nach dem Alles-oder-Nichts Modell [Mer98] kann man davon ausgehen, dass nur Einzelstränge und Tetraplexe im Gleichgewicht vorliegen und keine unvollständig dissoziierten Komplexe zu berücksichtigen sind.

2 THEORETISCHER TEIL

$$\begin{aligned}
 K &= \frac{[\text{Tetraplex}]_n}{[\text{Einzelstrang}]^n} \\
 \Leftrightarrow & \\
 K &= \frac{\frac{A(T) - A_2}{A_1 - A_2} [\text{Einzelstrang}]_0 \frac{1}{n}}{\left(\left([\text{Einzelstrang}]_0 - \frac{A(T) - A_2}{A_1 - A_2} \frac{[\text{Einzelstrang}]_0}{n} \right)^n \right)}
 \end{aligned} \tag{2.51}$$

K kann somit aus den Schmelzkurven für jede gegebene Temperatur bestimmt werden.

2.5.1 Fehlerabschätzung

Als Fehlerquellen bei der UV-Spektroskopie kommen neben der Temperaturungenauigkeit in der Küvette Absorptionsfehler in Frage. Diese werden vom Hersteller des Spektrometers mit ± 0.002 angegeben, allerdings nur bei Temperaturen von 15°C bis 35°C . Da die Küvetten teilweise bis auf 95°C aufgeheizt wurden, sind Mehrfachbestimmungen auch bei hohen Temperaturen durchgeführt worden. Bei diesen lagen die Unterschiede der einzelnen Absorptionsergebnisse jedoch deutlich unterhalb von ± 0.001 . Berücksichtigt man als Absorptionungenauigkeiten die Werte aus den Mehrfachbestimmungen, so ist für T_m ein Fehler von maximal $\pm 1^\circ\text{C}$ anzunehmen, wie eine Reihe von Testauswertungen bestätigt hat.

2.6 KAPILLARGELELEKTROPHORESE

Die Kapillargelelektrophorese (*Capillary gel electrophoresis*, CGE) ist ein effizientes Mikroanalyseverfahren. Es verbindet die hohe Leistungsfähigkeit der Kapillarelektrophorese (CE) mit den Trenneigenschaften der Flachgelelektrophorese. Die Kapillargelelektrophorese eignet sich daher zur Analyse geladener Biomakromoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren. Durch die Verwendung dünner Kapillaren (Innendurchmesser $\sim 100\mu\text{m}$), die effizient gekühlt werden können, ist das Anlegen hoher elektrischer Feldstärken möglich. Dies führt zu einer schnellen Trennung des Analyten.

2.6.1 Elektrophoretische Beweglichkeit

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einer Flüssigkeit unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Der elektrischen Kraft F_e wirkt die Reibungskraft F_R entgegen, die proportional zur Viskosität des Mediums, der elektrophoretischen Beweglichkeit des Teilchens v_{ep} und seinem Radius r (STOCKESSCHER Radius) ist. Wenn sich beide Kräfte das Gleichgewicht halten, bewegt sich das Teilchen mit konstanter elektrophoretischer Geschwindigkeit v_{ep} . Gleichung (2.52) zeigt, dass die elektrophoretische Geschwindigkeit proportional zum elektrischen Feld E ist.

$$v_{ep} = \frac{zeE}{6\pi\eta r} \quad (2.52)$$

Dieser Proportionalitätsfaktor wird als elektrophoretische Mobilität μ_{ep} bezeichnet (vgl. Gleichung (2.53)). Sie ist proportional zur Ladungszahl z und nimmt mit steigender Viskosität des Mediums η und zunehmendem STOCKESSCHEN Radius r ab.

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r} \quad (2.53)$$

2 THEORETISCHER TEIL

Die Viskosität des Mediums ist temperaturabhängig. Gleichung (2.54) zeigt den Zusammenhang zwischen der dynamischen Viskosität einer Flüssigkeit η und Temperatur T , wobei K eine Konstante ist, E_a die Aktivierungsenergie und R die allgemeine Gaskonstante. Die Viskosität nimmt folglich exponentiell mit steigender Temperatur ab, während die elektrophoretische Mobilität entsprechend zunimmt.

$$\eta \propto e^{E_a/RT} \quad (2.54)$$

Abweichungen vom idealen Verhalten der Ionen und Wechselwirkungen der Ionen untereinander werden durch den Relaxationseffekt und den elektrophoretischen Effekt beschrieben [Atk96]. Im Elektrolyten sind Ionen von einer entgegengesetzt geladenen ionischen Sphäre umgeben. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes bewegen sich diese entgegengesetzt geladenen Ionen in entgegengesetzte Richtungen. Die Nahordnung wird somit zerstört. Das zentrale Ion befindet sich kurz vor dem Schwerpunkt der umgebenden, entgegengesetzt geladenen Ionen und wird zurückgehalten. Die daraus resultierende Rückbildung der Nahordnung wird als Relaxationseffekt bezeichnet.

Bei der Wanderung des Ions im elektrischen Feld bewegt sich seine ionische Sphäre in die entgegengesetzte Richtung. Die dabei auftretende Reibungskraft hemmt die Beweglichkeit des Ions zusätzlich. Dieses Phänomen wird als elektrophoretischer Effekt bezeichnet. Um diesen Sachverhalt zu berücksichtigen, wird das Produkt aus Ladungszahl und Elementarladung e durch eine effektive Ladung des Ions Q_{eff} ersetzt. Der STOCKESSCHE Radius r wird ebenfalls durch einen effektiven Radius R ersetzt, der die ionische Sphäre des Teilchens berücksichtigt (vgl. Gleichung (2.55)).

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{Q_{\text{eff}}}{6\pi\eta R} \quad (2.55)$$

2.6.2 Trennleistung und Auflösungsvermögen der CGE

Die Trennleistung eines elektrophoretischen Systems wird durch die Anzahl der theoretischen Böden N beschrieben. Gleichung (2.56) zeigt, dass die Trennleistung vom Diffusionskoeffi-

zienten des Analyten D , dessen Mobilität μ_{ep} und der angelegten Spannung U abhängt, wobei σ die Breite der Diffusionszone, l die Kapillarlänge und l_d die Kapillarlänge bis zum Detektorfenster ist.

$$N = \frac{l_d}{\sigma^2} = \frac{\mu_{ep} U}{2D} \quad (2.56)$$

Die Trennleistung ist unabhängig von der Kapillarlänge und der Migrationszeit. Der Diffusionskoeffizient und die Mobilität sind spezifisch für den jeweiligen Analyten und können nicht variiert werden. Folglich kann die Trennleistung nur durch Erhöhung der Spannung verbessert werden. Durch Erhöhung der Spannung kommt es jedoch zu einer steigenden Erhitzung des Analyten in der Kapillare (JOULESCHE Wärme), was die Trennleistung wieder einschränkt [Jor81][Sla95]. Die Wärme wird nur an der Kapillarinnenwand durch die Kühlung abgeführt. Es bildet sich ein Temperaturgradient senkrecht zur Kapillarachse, der einen Viskositätsgradienten zur Folge hat. Daraus resultiert eine Bandenverbreiterung bei hohen Spannungen. Die Kühlung der Kapillare verstärkt zwar den Temperaturgradienten, verhindert aber eine lokale Überhitzung des Puffers. Eine Verringerung des Temperaturgradienten wird durch Reduzierung des Kapillarinneendurchmessers erreicht. Daher wird bei der Kapillarelektrophorese mit dünnen Kapillaren ($\sim 100\mu\text{m}$ Innendurchmesser) gearbeitet.

Die Anzahl der theoretischen Böden kann aus dem Elektropherogramm direkt durch die Peakbreite bei halber Peakhöhe ω und die Migrationszeit t_m bestimmt werden (vgl. Gleichung (2.57)).

$$N = 5,54 \cdot \frac{t_m^2}{\omega^2} \quad (2.57)$$

Bei der Auftrennung von zwei elektrophoretisch verschiedenen Substanzen durch Kapillarelektrophorese lässt sich die Auflösung (R_s) von zwei Signalen aus den Differenzen ($\Delta\mu_{ep}$) und dem Mittelwert ($\bar{\mu}_{ep}$) der elektrophoretischen Mobilität bestimmen (vgl. Gleichung (2.58)) [Kar89].

2 THEORETISCHER TEIL

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep}} \quad (2.58)$$

Die Trennung in der Gelelektrophorese erfolgt durch den Siebeffekt einer polymeren Matrix (Gel). Die Nukleinsäuremoleküle werden dabei nach Größe und räumlicher Ausdehnung aufgetrennt.

Bei der Kapillargelelektrophorese wird zwischen zwei Klassen von Gelen unterschieden. Stationäre, nicht-quervernetzte Gele basieren auf Agarose- oder Polyacrylamid. Sie werden in beschichteten oder chemisch modifizierten Kapillaren polymerisiert oder das Gel wird mit der Oberflächenbeschichtung der Kapillare vernetzt. Die Nachteile von quervernetzten Gelen sind ihre geringe Lebensdauer und ihre aufwendige Handhabung. Von Vorteil ist ihre gute Trennleistung, z.B. bis zu $N = 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$ bei der Auftrennung von Polynukleotiden [Gut91].

Mobile oder nicht-quervernetzte Gele sind wässrige Lösungen aus Cellulosederivaten ([Ham97][Sch99], Polyethylenglykolen oder linearem Polyacrylamid [Heb93]. Sie sind einfacher zu handhaben als quervernetzte Gele. Die Polymere werden in einem Puffer gelöst und können so vor jeder Trennung hydrodynamisch in die Kapillare injiziert werden. Die Separationseffizienz einer solchen Polymermatrix ist abhängig von der Art des Polymers, seiner Kettenlänge und seiner Konzentration im Puffer [Mit95]. Die Trennleistung solcher Gele ist etwas geringer als bei quervernetzten Gelen und liegt maximal im Bereich von $N = 5 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$ [McG93].

Die Migration eines Makromoleküls wie DNA durch ein Polymernetzwerk wird durch zwei Modelle, das OGSTON- und das SCHLÄNGEL- bzw. REPTATIONS-Modell beschrieben [Gen79]. Das OGSTON-Modell beschreibt die Bewegung eines starren, nicht-deformierbaren Teilchens durch ein zufällig angeordnetes, molekulares Sieb. Die elektrophoretische Bewegung von großen, flexiblen Teilchen durch ein enges, polymeres Netzwerk wird durch das SCHLÄNGEL-Modell beschrieben [Gen79]. Im SCHLÄNGEL-Modell ist bei großen elektrischen Feldstärken die elektrophoretische Beweglichkeit indirekt proportional zur Größe des Moleküls S und zur elektrischen Feldstärke E (vgl. Gleichung (2.59)), wobei K eine Konstante und b eine Funktion der Porengröße, der Ladung und der relativen Länge des wandernden Moleküls ist.

$$\mu \approx K (S^{-1} + b E^2) \quad (2.59)$$

Mit zunehmender elektrischer Feldstärke nimmt also der Einfluss der Molekülgröße auf die elektrophoretische Beweglichkeit ab. Bei der Flachgelelektrophorese ist die Auftrennung daher auf eine maximale Größe der DNA von 20000 Basenpaaren begrenzt. Für größere DNA-Moleküle wird deshalb die PULSED FIELD-Gelelektrophorese verwendet [Sch84], bei der die Polarität des elektrischen Feldes pulsweise gewechselt wird, um eine bessere Auftrennung zu erhalten.

2.6.3 Fehlerabschätzung

Die in der Kapillargelelektrophorese aufgenommenen Elektropherogramme werden als fehlerfrei angenommen. Da aus u. g. Gründen (vgl. Kapitel 4.2.3) ohne Marker gearbeitet wird, sind nur relative Strukturzuordnungen möglich. Außerdem sind auf Grund fehlender Erfahrungen zu der Einlagerung des verwendeten Farbstoffes in tetramere helikale Strukturen die Integrale der Elektropherogramme nur qualitativ auszuwerten. Die Auswirkung der verwendeten Puffersysteme auf das Messergebnis wird im Einzelfall diskutiert.

3 Kombination der Methoden und Arbeitsplanung

Im Folgenden wird eine Übersicht über die eingesetzten experimentellen (DLS, UV-Spektroskopie und CGE) und theoretischen (Modellrechnungen) Methoden und deren Aussagemöglichkeiten gegeben. Erst die Kombination der Ergebnisse ermöglicht die eindeutige Identifizierung der Tetraplexe polymorpher Sequenzen in Lösung, wobei der für die Strukturuntersuchungen zugängliche Konzentrationsbereich bis in den μM Bereich erweitert werden kann. Die Kohärenz der Versuchsergebnisse wird anhand der Modellsequenz $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2]$ (14mer) vorgestellt (vgl. Abbildung 3.1). Die Abbildung 3.2 zur Arbeitsplanung soll die zunehmende Komplexität der Versuchsführung und Auswertung und in dem Zusammenhang die zunehmende Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen.

In Abbildung 3.1-Mitte sind die möglichen Strukturisomere des 14mers gezeigt. Auf Grund der zwei Guanin-reichen Bereiche sind neben einem random-coil Einzelstrang (links) noch eine dimer-Hairpin Anordnung (Mitte) und ein tetramerer Tetraplex (rechts) möglich. Die experimentellen Ergebnisse unterscheiden sich derart, dass sowohl D_T und τ_R , als auch die Absorptionsänderung während des Schmelzens des Tetraplexes, von links nach rechts, von Einzelstrang über dimer-Hairpin hin zum Tetramer²³ ansteigen. Dabei ändern sich auf Grund der unterschiedlichen r -Abhängigkeit (vgl. Gleichung (2.39) und Gleichung (2.40) Stokes-Einstein-(Debye) Formeln) die Werte für den Translationsdiffusionskoeffizienten mit zunehmender Größe der Tetraplexe deutlich geringer als die Rotationsrelaxationszeiten. Für die, bedingt durch die spezifische Basenpaarung kombinatorisch möglichen Strukturen werden Modellrechnungen durchgeführt, die dann jeweils strukturspezifische Werte für D_T und τ_R ergeben. Der Vergleich dieser Werte mit den experimentellen Daten ermöglicht eine Zuordnung der experimentellen hydrodynamischen Messwerte zu den einzelnen Strukturen.

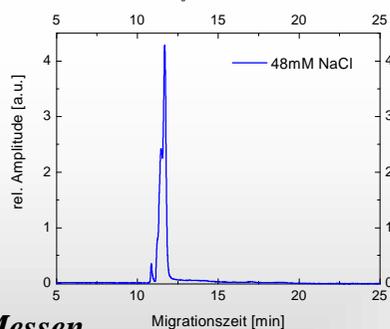
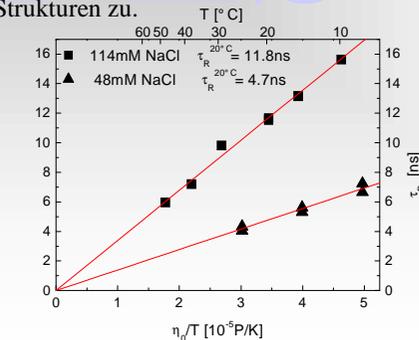
²³ In 114mM NaCl wird jedoch nur das Schmelzen der im Gleichgewicht mit der tetrameren Struktur vorliegenden dimer-Hairpin Spezies beobachtet!

- Messen

der hydrodynamischen Transportgrößen

$D_T^{20^\circ\text{C}}$ und $\tau_R^{20^\circ\text{C}}$.

- Veränderungen von D_T und τ_R bei temperaturabhängige Messungen lassen Rückschlüsse auf die Stabilität und damit Konformation der betrachteten Strukturen zu.



- Messen

des Migrationsverhaltens (Elektropherogramme).

- Identifizierung von Strukturen unterschiedlicher Strangstöchiometrie in allen Gleichgewichtsverhältnissen (keine Maskierung von Minoritäten).
- Feinaufspaltung der Signale lässt Rückschlüsse auf Konformere zu, z.B. *Loopanordnungen*

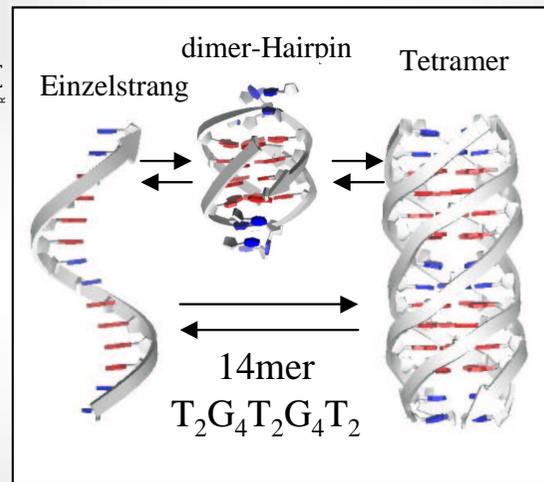
- Berechnung

der hydrodynamischen Transportgrößen

$D_T^{20^\circ\text{C}}$ und $\tau_R^{20^\circ\text{C}}$

für jeweils definierte Ausgangsstrukturen.

- Exakte Zuordnungsmöglichkeit von Struktur (Eingabedatei der Modellrechnung) und experimentellen Werten aus DLS.



dimer-Hairpin: (drei Loopkonformationen)

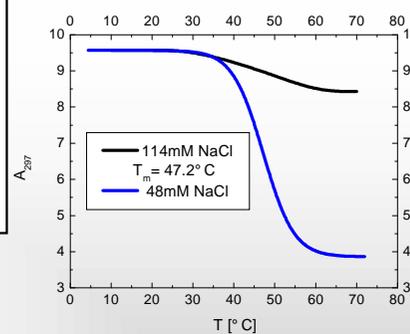
D_T 1.37/1.34/1.39 $10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$

τ_R 4.74/4.95/5.05 ns

Tetramer:

D_T 1.08 $10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$

τ_R 11.8ns



- Messen

des Schmelz- und Reaggregationsverhaltens.

- Schmelzverhalten kann mit temp.abhängigen Messungen in der DLS verglichen werden.
- Assoziationsverhalten ist von Molekularität und damit Struktur/Stöchiometrie des Tetraplexes abhängig.
- Aus den Schmelzkurven sind thermodynamische Daten zugänglich.

Abbildung 3.1 : Eingesetzte Methoden zur Ermittlung der Struktur polymorpher G-DNA am Beispiel des 14mers. Der Einzelstrang wird als random-coil Struktur vorliegen.

3 KOMBINATION DER METHODEN UND ARBEITSPLANUNG

Gleichzeitig gibt die in der UV-Spektroskopie ermittelte Schmelzkurve Aufschluss über die relative Anzahl der G-Ebenen, die bei der entsprechenden Temperatur geschmolzen werden. Dieses korreliert bei G-DNA mit der Struktur (beim 14mer in dimer-Hairpin Konformation vier G-Ebenen, beim Tetramer acht G-Ebenen) und muss in Einklang mit den vorherigen Ergebnissen stehen (vgl. Kapitel 5.7). Da in der UV-Spektroskopie mit den gleichen Konzentrationen wie in der Lichtstreuung gearbeitet werden kann, können die Strukturaussagen der Lichtstreuung in Kombination mit den Modellrechnungen direkt auf die UV Schmelzkurve übertragen werden. Vergleicht man diese Schmelzkurven (und die daraus zugänglichen thermodynamischen Daten) mit Schmelzkurven deutlich niedrigerer DNA-Konzentration, so sind Strukturaussagen auch in extrem verdünnten Lösungen möglich (vgl. Kapitel 5.7).

Die Elektropherogramme der Kapillargelelektrophorese erlauben zusätzlich auf Grund der strukturabhängigen Migrationszeiten eine Identifizierung von Tetraplexen polymorpher Sequenzen ohne eine Maskierung von Minoritäten.

Bei der in Abbildung 3.2 schematisierten Projektplanung sind die einzelnen Schritte hin zur Generierung und Charakterisierung supramolekularer Nanostrukturen aufgezeigt. Ausgangspunkt ist die Verifizierung der eingesetzten Methodik und der gegenüber [Nie96] modifizierten experimentellen und theoretischen Parameter anhand von duplexbildender DNA und schon in der Literatur beschriebener G-DNA Systeme.

Die Identifizierung von Tetraplexen polymorpher Sequenzen in Lösung mittels der in Abbildung 3.1 gezeigten Kombination verschiedener Methoden steht anschließend im Mittelpunkt. Ausgehend von einfachen Sequenzen, die ausschließlich Tetramere bilden können, wird durch eine erhöhte Anzahl an Guanin-reichen Sequenzteilen die Strukturvielfalt größer, was durch zunehmend komplexere Rückfaltungen und Loopbildungen bedingt ist. Durch die Wahl der repetitiven Einheit mit $(T_2G_4)_Z$ sind die Strukturisomere, wie auch in Abbildung 3.2-rechts zu erkennen, einfach auf Grund ihrer differierenden hydrodynamischen Eigenschaften zu identifizieren. In Kapitel 5.7 wird ausführlich gezeigt, dass mit der UV-Spektroskopie sogar Gleichgewichtslagen zwischen Tetraplexen unterschiedlicher Stöchiometrie quantitativ erfasst werden können. Während der gesamten Versuchsführung wird, be-

dingt durch neue experimentelle Ergebnisse, rekursiv an der Verfeinerung der Modellrechnungen gearbeitet.

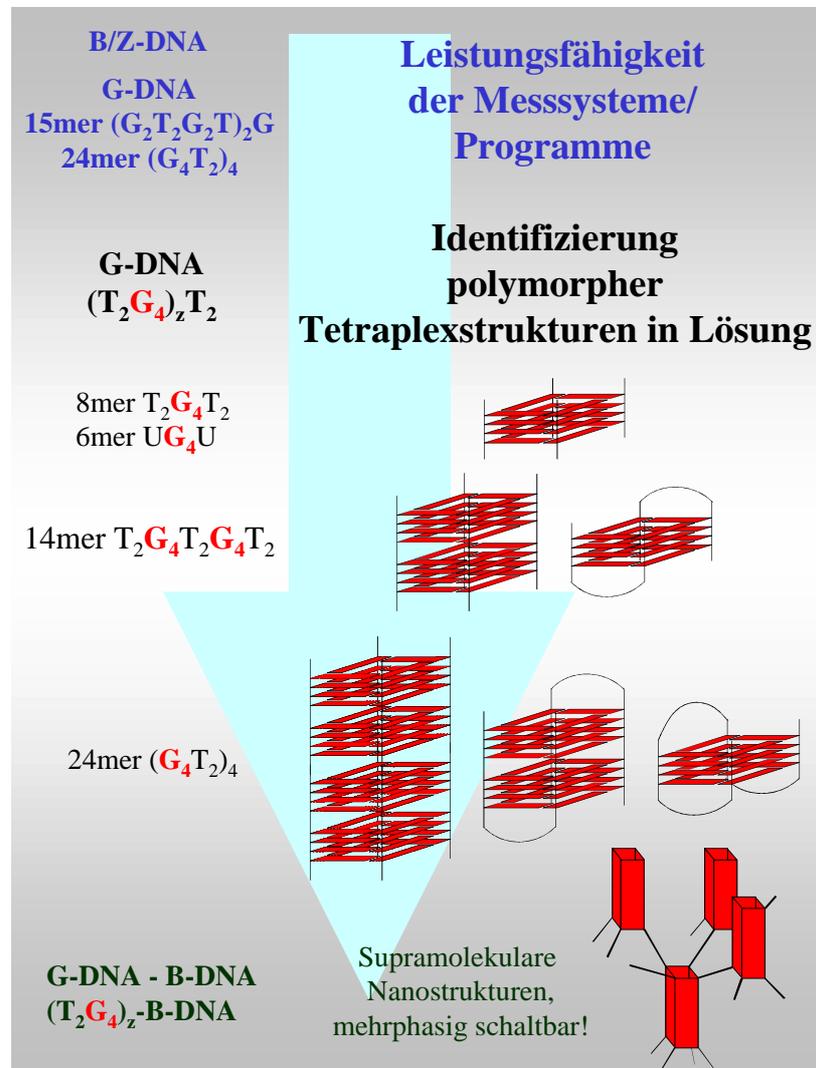


Abbildung 3.2 : Projektplanung.

Zum Abschluss wird das Potential von funktionalisierter G-DNA für die Generierung supramolekularer Nanostrukturen vorgestellt. Für die Verknüpfung der einzelnen Tetraplexknotenpunkte werden B-DNA bildende Sequenzen eingesetzt, die sich in ihrer Dynamik, Morphologie und Stabilität grundsätzlich von G-DNA unterscheiden. So wird die Möglichkeit eröffnet, die entstehenden Netzwerke durch die Ionenstärke, die Ionenart und die Temperatur zu verändern, wobei sich die Variation dieser Umgebungsparameter selektiv auf die Knoten- oder Verknüpfungsbereiche auswirkt.

4 Experimenteller Teil

Im folgenden Kapitel werden zunächst die experimentellen Methoden vorgestellt. Dabei wird neben den einzelnen Versuchsaufbauten auch auf Einzelheiten der verwendeten Auswertverfahren eingegangen. Anschließend wird die Probenpräparation für die einzelnen Verfahren beschrieben.

4.1 MESSMETHODIK – VERSUCHSAUFBAU UND AUSWERTUNG

4.1.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

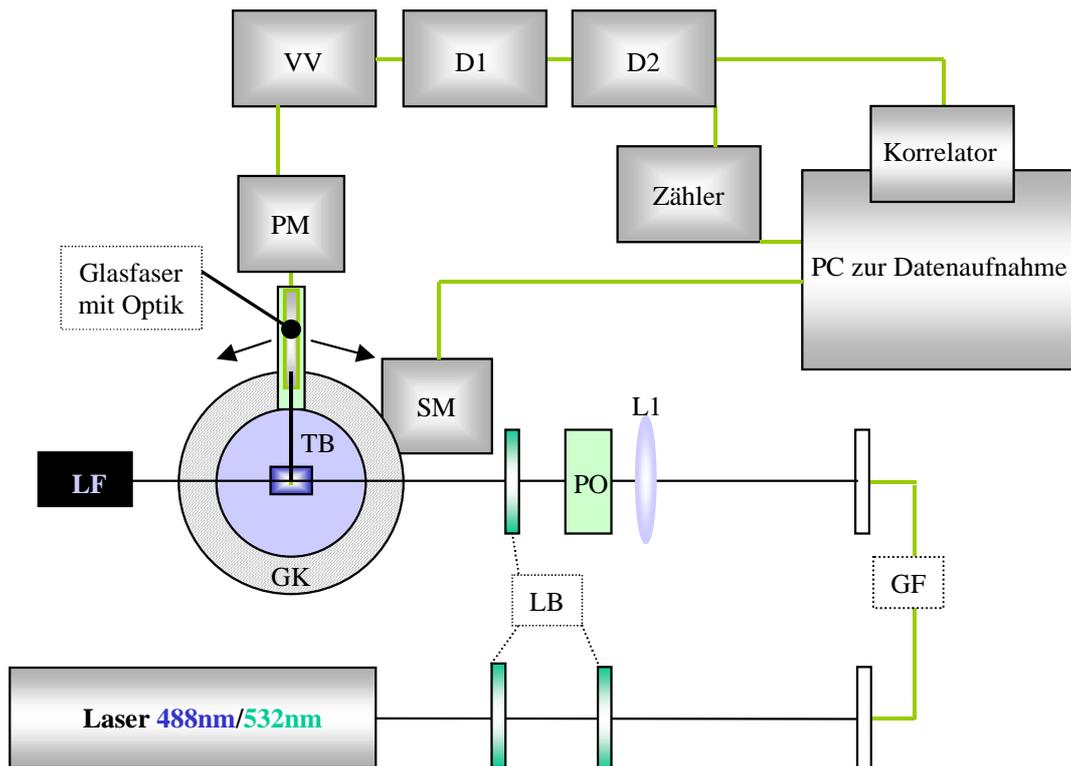


Abbildung 4.1 : Schematischer Versuchsaufbau der Photonenkorrelationsspektroskopie. D_{1,2}: Diskriminator; GF: Glasfaser GK: Goniometerkopf; LI: Linse; LB: Lochblenden; LF: Lichtfalle; PC: Personalcomputer; PM: Photomultiplier; PO: Polarisator; SM: Schrittmotor; TB: Toluolbad; VV: Vorverstärker.

Der Aufbau der Lichtstreuapparatur ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Als Lichtquelle dient ein Argonionenlaser der Firma COHERENT (Modell Innova 90S) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488\text{nm}$, bzw. ein Nd:YAGLaser (COHERENT; Modell DPSS-400) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 532\text{nm}$. Der Laserstrahl durchläuft mehrere Lochblenden und wird über eine Glasfaser durch eine Linse mit der Brennweite 400mm in die Streulichtküvette mit der Probe fokussiert. Zwischen Linse und Probe ist ein Polarisator (Glan-Prisma) angebracht, der die Polarisationssebene des einfallenden Lichtstrahls senkrecht zur Streuebene festlegt. Die Probenküvette befindet sich in einem mit Toluol gefüllten Glaszylinder im Zentrum eines

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Goniometers der Firma ALV (Modell 3011/3021). Das Toluolbad dient dabei einerseits zur Thermostatisierung der Probe und andererseits zur Minimierung von Reflektionen beim Durchgang des Lichtes durch die Küvettenfenster. Die Temperatur wird mit einem Thermostaten der Firma HAAKE auf 0.1°C genau geregelt und mit Hilfe eines Pt100-Widerstandsthermometers kontrolliert. Die Veränderung des Streuwinkels mit einem rechnergesteuerten Schrittmotor erfolgt mit einer Genauigkeit von $\pm 0.03^{\circ}$. Das Streulicht wird in eine Glasfaser, die auf dem Goniometerarm angebracht ist, eingekoppelt und auf die Oberfläche der Kathode des Photomultipliers (EMI-9893/100-Bialkali-Röhre) abgebildet.

Die Ausgangssignale des Photomultipliers werden über einen Vorverstärker um den Faktor 10 verstärkt und gelangen zum Diskriminator D1 (ORTEC Modell 9302), welcher Normpulse mit einer Breite $< 5\text{ns}$ und einer Amplitude von ca. 2V erzeugt. Diese Normpulse werden in einer weiteren Diskriminator-Verstärker-Einheit (LE CROY Modell 821) auf 50ns gestreckt und parallel an einen Zähler (HP Modell 5316A) sowie zur Korrelatorkarte (der Firma ALV, Modell ALV-5000) eines 80586-WINDOWS95-Rechners weitergeleitet. Der ALV-5000-Korrelator besitzt 256 Kanäle.

Alle Messungen werden mit der fast-card Erweiterung des ALV-5000 Korrelators gemessen, mit der 288 Kanäle in einem Zeitbereich von 12.5ns bis 3221s zur Verfügung stehen. Die Aufnahme der Intensitätsautokorrelationsfunktion erfolgte bei den temperaturabhängigen Messungen bei einem Streuwinkel von 90° , wobei Kontrollaufnahmen bei einem Streuwinkel von ca. 40° (es wird keine temperaturabhängig Winkelkorrektur durchgeführt) eventuell entstehende langsame Moden frühzeitig sichtbar machen sollten. Die winkelabhängigen Messungen werden zwischen 40° und 110° bei 20°C durchgeführt. Die Auswertung wird mit dem Programmpaket CONTIN [Pro82] über eine inverse Laplace-Transformation (ILT) auf einer UNIX-Workstation durchgeführt.

4.1.2 Fabry-Perot Interferometrie

Für die Fabry-Perot Interferometrie dient ein Nd:YAG-Laser (COHERENT; Modell DPSS-400) mit einer Leistung von 400mW bei einer Wellenlänge von 532nm als Lichtquelle. Zur Erhöhung der Frequenzstabilität wurde der Laserkopf vom Netzteil getrennt (Sonderanfertigung Fa. Coherent) und zur Temperierung auf eine wassergekühlte ($T = 19.6^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) Aluminiumplatte montiert. Der Wasserdurchfluss wird zur Vermeidung jedweder Vibration auf ca. 1l/min (Flussquerschnitt mind. 1cm^2) begrenzt, die zuführenden Wasserschläuche zwischen Thermostat und Kühlplatte schwingungsdämpfend gelagert.

Auf eine erste Lochblende (LB1) folgt eine Glasscheibe (ST), die den Mess- und Referenzstrahl aufteilt (ca. 98/2). Nach einer weiteren Lochblende (LB2) und einem Shutter (SH) trifft der Strahl, durch eine Linse fokussiert auf einen Glan-Polarisator (P1), der vertikal polarisiertes Licht selektiert. Anschließend trifft der Strahl auf die eigentliche Messzelle. Der Referenzstrahl (zur Aufnahme der Apparatefunktion) wird über eine Glasfaser auf eine Teflonfolie als Diffusor (D) gelenkt und trifft im 90° Winkel zum Messstrahl auf die Messzelle.

Das bei der Aufnahme des Messspektrums, die Küvette im 90° -Winkel verlassende Streulicht durchläuft einen Polarisator (horizontal P2), eine Lochblende (LB4) und eine Linse. Bei Verwendung²⁴ des 150MHz und 750MHz Interferometers (FPI) wird mit einer weiteren Linse das Streulicht in das Zentrum des konfokalen Interferometers gebündelt. Beim 2GHz FPI ist eine entsprechende Linse im Gehäuse integriert. Hinter dem Interferometer (FPI) ist zur Detektion ein Photomultiplier (PM) (HAMAMATSU E934) aufgebaut.

²⁴ Die Auswahl des FPIs und damit des FSBs richtet sich nach dem zu erwartenden Zeitbereich der Relaxationsprozesse der Makromoleküle (Abschätzung durch Modellrechnungen).

4 EXPERIMENTELLER TEIL

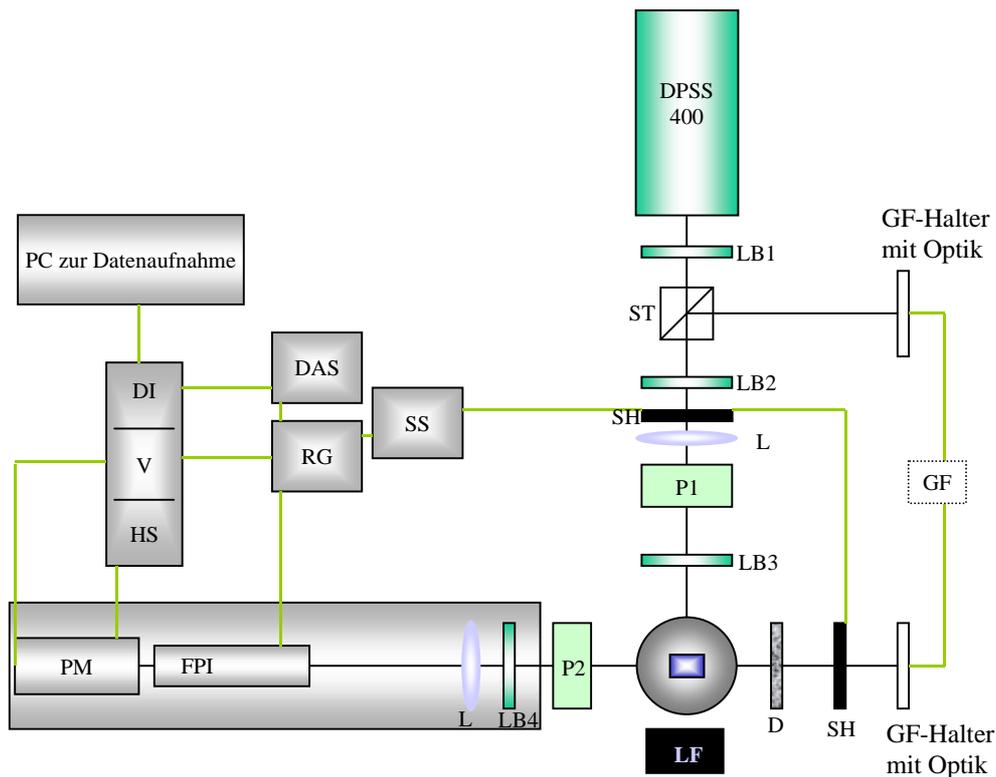


Abbildung 4.2 : Schematischer Versuchsaufbau in der DDLs. DI: Diskriminator; D: Diffusor; DAS: Rampenstabilisator; DPSS: Nd-YAG-Laser; FPI: Fabry-Perot-Interferometer; GF: Glasfaser mit Haltern; HS: Hochspannungsnetzteil; L: Linse; LB: Lochblende; LF: Lichtfalle; P1: Polarisator (vertikal); P2: Polarisator GLAN-THOMSON (horizontal); PC: Personalcomputer; PM: Photomultiplier; RG: Rampengenerator; SH: Shutter; SS: Shuttersteuerung; ST: Strahlenteilerwürfel/Glasscheibe; V: Verstärker.

Das Signal des Zählers wird mit einem Mehrkanalanalysator (MCA) auf 2048 Kanäle verteilt²⁵, und zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses aufakkumuliert (500-3000 mal). Die MCA-Steckkarte befindet sich in einem ISA-Slot eines Personalcomputers, der auch die Einzelspektren vor der Aufakkumulierung speichert. Die DAS-10-Einheit (DAS) (BURLEIGH) steuert den Rampen-Generator (RG), welcher den Spiegelabstand des FPIs regelt.

Wie schon in Kapitel 2.3.7 dargelegt, enthält das gemessene Spektrum des Streulichtes nicht nur die Information über den Relaxationsprozess, sondern auch systematische instrumentelle Einflüsse, die in der sog. Apparatefunktion zusammengefasst werden. Um die Apparatefunktion von der Spektrallinie des in der Probe gestreuten Lichtes zu trennen, werden beide Spektren einzeln aufgenommen (s.u. SPEKTRENAUFNAHME). Durch Entfaltung des Messspektrums

²⁵ Die Karte bietet werksseitig 8192 Kanäle, wobei hier immer vier Kanäle zusammengefasst werden, da auf das höhere Auflösungsvermögen zugunsten einer höheren Intensität und geringeren Rohdatenmenge verzichtet werden kann.

mit der Apparatefunktion erhält man eine LORENTZ Funktion, deren Halbwertsbreite Informationen über das Rotationsdiffusionsverhalten der streuenden Makromoleküle enthält.

Liegen in der Lösung Moleküle mit deutlich langsamerem oder schnellerem Reorientierungsverhalten vor, so geht deren Spektrum in Form eines sog. Spikes mit in die Apparatefunktion ein (bei langsameren Spezies). Schnellere Systeme gehen nur als Rauschen mit in die Gesamtintensität ein. Liegen jedoch beide Spezies in dem auflösbaren Zeitbereich des Interferometers (z.B. 2ns - 42ns bei einem FSB von 750MHz), so kann über eine Anpassung an eine Summe aus zwei Lorenzfunktionen ein qualitativer Nachweis beider Systeme parallel durchgeführt werden. Für die genaue Ermittlung der Rotationsrelaxationszeit kann dann der FSB so variiert werden²⁶, dass eine Spezies in oben genannter Weise als Spike oder Grundrauschen aus der Detektion herausfällt.

SPEKTRENAUFNAHME: Die Zeitdauer²⁷ der Aufnahme eines Einzelspektrums beträgt fünf Sekunden. Der Rampengenerator (RG) wird so eingestellt, dass innerhalb dieser Zeit der FSB viermal durchlaufen wird (vier Ordnungen) und die Piezokristalle des FPIs sich in einem linearen Ausdehnungsbereich befinden. Die Shuttersteuerung wird so getriggert, dass im Bereich der ersten Ordnung des Spektrums die Apparatefunktion wiedergegeben wird, während die zweite und dritte Ordnung jeweils die Frequenzverteilung des Streulichtes, gefaltet mit der Apparatefunktion, darstellt. Als vierte Ordnung wird wieder die Apparatefunktion aufgenommen.

Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern, werden für eine Messung bis zu 3000 Einzelspektren aufgenommen und anschließend aufsummiert. Zur Kompensation der Frequenzdrift des Lasers während der Messung wird jede Apparatefunktion der Einzelmessung an eine Lorenzfunktion angepasst und auf den Abstand der Maxima der ersten und letzten Ordnung für das Aufsummieren skaliert. Während der Summation der Spektren werden weiterhin diejenigen Einzelaufnahmen verworfen, deren Intensität der zweiten und dritten Ordnung um

²⁶ Es stehen folgende konfokale FPIs mit entsprechend auflösbaren Zeitbereich zur Verfügung: 150MHz (10ns – 210ns), 750MHz (2ns – 42ns) und 2GHz (800ps – 16ns).

²⁷ Die MCA-Karte erlaubt nur 2ms Aufnahmezeit pro Kanal (d.h. 4.1sec für einen Durchlauf bei 2048Kanälen), so dass ca. eine sec Zeit zum Wegspeichern des Einzelspektrums und Spannungssprung des RG zur Ausgangsspannung bleibt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Faktor zwei über einen aus den ersten drei Einzelspektren ermittelten Normwert²⁸ lag (sog. Staubkorrektur).

4.1.3 UV-Spektroskopie

In Abbildung 4.3 ist der Aufbau des SHIMADZU UV-2401PC gezeigt. Das für einige Messungen verwendete UVIKON 860 unterscheidet sich nur in der Datenerfassung vom UV-2401PC.

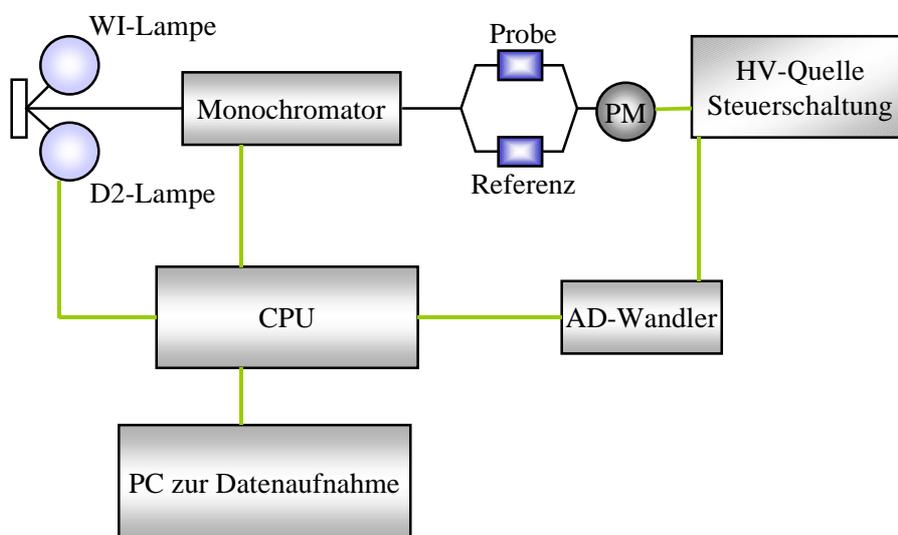


Abbildung 4.3: Schematischer Versuchsaufbau in der UV-Spektroskopie. WI: Wolframlampe; D2: Deuteriumlampe; AD: Analog/Digitalwandler; CPU: Steuerelektronik für Lampenwechsel und Wellenlängenselektion; PM: Photomultiplier; PC: Personalcomputer.

Im vermessenen Wellenlängenbereich von 340nm bis 240nm wird ausschließlich mit der D2-Lampe gearbeitet. Deren Licht wird über einen Spiegel in einen Monochromator gelenkt und tritt durch die mit einem HAAKE N3 thermostatisierten Probe und Referenzkuvette. Die Lichtintensität wird über einen Photomultiplier (PM) gemessen und über eine Steuer- und Regelelektronik (CPU) an den PC zur Datenaufnahme übermittelt.

SPEKTRENAUFNAHME: Das Gerät wird mind. eine Stunde vor jeder Messreihe angestellt um das opto-elektronische Innenleben zu temperieren. Zwischen den Messungen der Proben

²⁸ Die Intensität der zweiten und dritten Ordnung der ersten drei Spektren einer Messreihe darf dabei nur um max. 25% schwanken.

liegen (während des Kühlens *exakt*) 30min, wobei die neue Temperatur am Thermostat mit Beginn des ca. 1min dauernden Wellenlängenscans (340nm bis 240nm) eingestellt wird. Mehrfachbestimmungen werden nur während des Hochheizens gemacht, die Zeitspanne zwischen den Messungen werden entsprechend um 1min bis 2min verlängert. Die neue Temperatur wird mit Beginn der letzten Mehrfachbestimmung eingestellt. Die Temperaturträgheit des Systems beträgt $13\text{min} \pm 2\text{min}$, so dass spätestens nach 15min die am Thermostat eingestellte Temperatur *in* der Küvette vorliegt und mind. weitere 15min zur vollständigen (nur für den Schmelzprozess!) Gleichgewichtseinstellung bleiben. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Gleichgewichtseinstellungen werden während des Heizens bei jedem System an ein bis zwei Temperaturen bis zu einer Stunde lang Mehrfachmessungen bei einer Temperatur durchgeführt. Hier waren in keinem Fall weitere Veränderungen gegenüber der Messung nach 30min zu beobachten.

4.1.4 Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese wird mit einer kommerziellen P/ACE 2050 Kapillarelektrophoreseapparatur (BECKMAN Coulter, Fullerton, CA, USA) durchgeführt. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 4.4 dargestellt. Die zu analysierenden Proben befinden sich in Eppendorfgefäßen (2ml). Die Injektion der Proben in die Kapillare erfolgt hydrodynamisch durch Anlegen eines Drucks (Injektionsdauer 2sec). Das verwendete System kann die Proben aus offenen Gefäßen, wie zum Beispiel Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder Mikrotiterplatten durch Anlegen eines Unterdrucks ansaugen. Die Kapillare wird vor jedem Lauf zwei min mit dem Laufpuffer (0.5% PAA in Salz/TE-Puffer) gespült.

Auf Grund der schlechten Farbstoffeinlagerung (vgl. Kapitel 5) muss die initiierte Probenmenge (Volumen und Konzentration) deutlich gegenüber der normalen DNA-Analytik erhöht werden (\approx Faktor 1000). Die hohe DNA- und Farbstoffkonzentration ($c(\text{DNA}) \approx \text{mM}$) in der Probe führt zu breiten Signal-, „Füssen“ [Mit95]. Aus Zeitgründen wird das angewendete Stan-

4 EXPERIMENTELLER TEIL

dardverfahren [Vos01] nicht auf die Tetraplexanalytik hin optimiert, da wie in Kapitel 5²⁹ dargelegt, die Trennung der Signale ausreichend ist.

Die elektrophoretische Trennung wird in 47cm langen Kapillaren (effektive Trennlänge 40cm) mit einem Innendurchmesser von 100 μ m durch Anlegen einer Hochspannung (HV) (100V/cm - 300V/cm) innerhalb von 25min bis 60min durchgeführt.

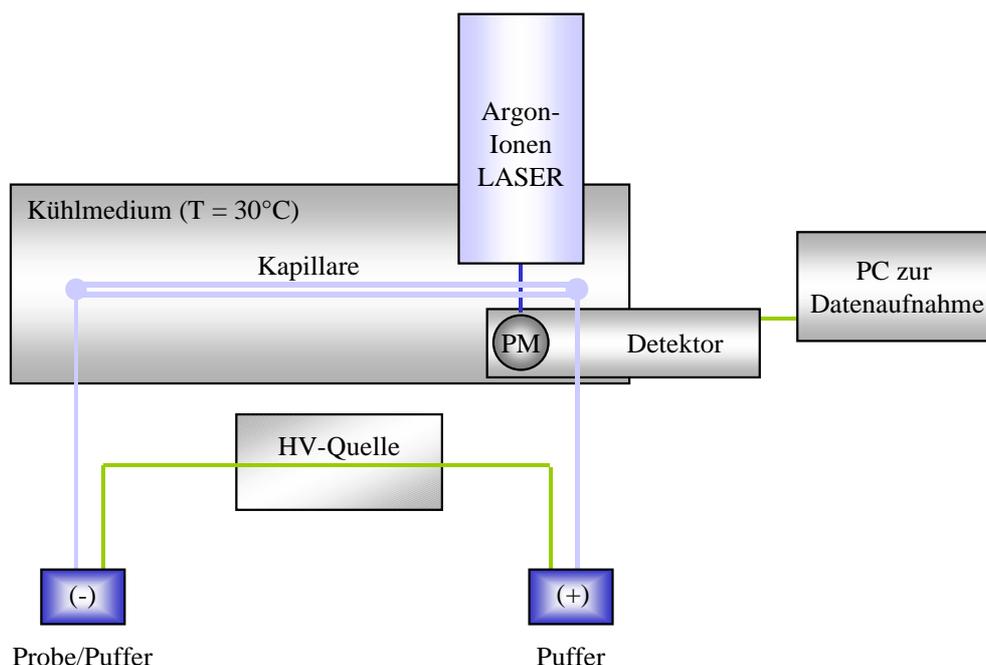


Abbildung 4.4 : Schematischer Aufbau der Kapillargelelektrophoreseapparatur. PM: Photomultiplier; HV: Hochspannungsquelle; PC: Personalcomputer.

Die Kühlung der Kapillare erfolgte durch ein integriertes Kühlsystem auf ca. $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Die Kapillarenden tauchen bei der Elektrophorese in puffergefüllte Gefäße (Salz/TE-Puffer mit $c(\text{KCl}/\text{NaCl}) = 100\text{mM}$), deren Inhalt nach drei Läufen erneuert wird. Über ein Detektorfenster wird das Licht ($\lambda = 488\text{nm}$) in die Kapillare eingekoppelt, das emittierte Fluoreszenzsignal mit einem Photomultiplier (PM) detektiert und dann mit einem Personal Computer zur Datenaufnahme (PC) aufgezeichnet. Die Steuerung der Apparatur erfolgt computergestützt.

²⁹ Im Anhang ist eine Vergleichsmessung mit einer CE mit LINF-Detektion [Mos00] aufgeführt (vergleichbarer Versuchsaufbau [Kapillartyp, Puffer, Spannung], jedoch mit Detektion der natürlichen Fluoreszenz der Heterozyklen – ohne Farbstoff, mit μM -DNA-Konzentrationen), die den gleichen Signalverlauf wie in der CGE zeigt, jedoch ohne entsprechende „Füße“ und mit schärferen Signalen. (vgl. Anhang_Abb 8).

4.2 PROBENPRÄPARATION

Die Vorbereitung der Proben für die dynamische Streulichtspektroskopie (Photonenkorrelationspektroskopie und Fabry-Perot Interferometrie), der UV-Spektroskopie und der CGE unterscheiden sich in einigen Punkten. Zunächst werden die gemeinsamen Präparationsschritte aller Proben erläutert.

Mit Ausnahme der RNA Sequenz r[UG₄U] (6mer)³⁰, werden alle Oligonukleotide in lyophilisierter Form von der Firma MIDLAND/Texas bezogen (salzfrei, Reinheit >98%). Alle verwendeten Chemikalien liegen hochrein vor; das Wasser wird aus einer MILLIPORE MILLI-Q water purification System Anlage entnommen und im Folgenden als tridest. Wasser bezeichnet. Alle verwendeten Gefäße zum Ansetzen der Lösungen werden mit Schwefelsäure/Wasserstoffperoxid gespült und anschließend sorgfältig mit tridest. Wasser behandelt, um jeglichen Eintrag von Salz zu vermeiden. Die Kunststoffeinweggefäße werden mit tridest. Wasser gespült. Verschweißte Einweggeräte wie Spritzen und Kanülen werden direkt eingesetzt. Das Lösungsmittel ist immer eine auf die entsprechende Ionenstärke eingestellte TE-Pufferlösung (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.1). Die Einstellung der Ionenkonzentration und Ionenart des Puffers geschieht durch Zugabe einer in tridest. Wasser angesetzten konzentrierten Salzlösung. Der TE-Puffer wird innerhalb der Diskussion der Ergebnisse nicht noch mal explizit aufgeführt, sondern es wird nur von einer Salzlösung (oder dem Alkalimetall des Salzes) in entsprechender Konzentration gesprochen.

Vor dem Befüllen sowie vor und nach jeder Messung werden alle Küvetten gewogen. Bei den UV-Messungen und den DDLS-Messungen sind dabei in Einzelfällen Gewichtsverluste bis zu 3% zu beobachten, die jeweils durch Zugabe von tridest. Wasser nach Beendigung der Messreihe ausgeglichen werden.

³⁰ OSWELL/England, der Übersichtlichkeit wegen wird in den folgenden Tabellen die Nomenklatur einheitlich auf DNA abgestimmt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.2.1 Probenvorbereitung für die dynamische Streulichtspektroskopie

Die Trockensubstanz wird in TE-Pufferlösung (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.1) entsprechender Ionenstärke aufgenommen und die Lösung in sterile, staubfrei gespülte Glasküvetten filtriert (Spritzenfilter WHATMAN ANOTOP 10 (plus) 0.02 μ m). Zur Entgasung und Sedimentation eventuell vorhandener Staubpartikel werden die Proben 25min bei 900g zentrifugiert (HERAEUS: Minifuge T). Alle Messungen werden in rechteckigen Küvetten aus optischem Spezialglas oder Quarzglas der Firmen HELLMA bzw. STARNA durchgeführt. Vor der Befüllung mit der Probenlösung erfolgt jeweils eine sorgfältige Reinigung durch ein Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und 30%-igem Wasserstoffperoxid sowie eine anschließende intensive Spülung mit frisch destilliertem Aceton zur Entfernung der Staubpartikel. Soll bei der gleichen Probe die Salzkonzentration erhöht werden, wird in die Küvette eine konzentrierte Salzlösung filtriert und nach vorsichtigem Durchmischen erneut zentrifugiert. Neben der Berechnung aus der Einwaage und jeweiligen Verdünnung durch Zugabe der Salzlösungen werden UV-VIS Messungen zur Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, finden die Konzentrationen aus den UV-VIS Messungen Verwendung.

4.2.2 Probenvorbereitung für die UV-Spektroskopie

Die verwendeten Küvetten (Quarzglas, Firma HELLMA, Typ 114F, 1cm Schichtdicke, Typ115F und 119F mit 0.2cm und 0.4cm Schichtdicke) werden mit konzentrierter Schwefelsäure und 30%-igem Wasserstoffperoxid 24h behandelt und anschließend gründlichst mit tridest. Wasser gespült.

Für die Konzentrationsbestimmung durch UV-VIS Messungen werden die nach der Filtration in der Kanüle verbliebenen Reste ausgewogen und mit TE-Puffer entsprechender Ionenstärke verdünnt. Die UV-Messungen finden an Geräten der Firmen KONTRON INSTRUMENTS (UVIKON 860) bzw. SHIMADZU (UV-2401 PC) statt.

Die temperaturabhängig aufzunehmenden Spektren werden mit dem UV-2401 PC gemessen. Als Proben dienen hier die in der Lichtstreuung verwendeten DNA-Lösungen, bzw. nach dort beschriebenem Muster angesetzte Trockensubstanz. Sie werden mit TE-Puffer entsprechender

Ionenstärke verdünnt und in Eppendorf-Gefäßen bis zur Verwendung bei 13°C gelagert. Mit diesen Stammlösungen werden die UV-Küvetten befüllt und die Lösungen in den Küvetten ggf. weiter verdünnt. Anschließend werden die Proben 15min bei 900g zu zentrifugiert.

4.2.3 Probenvorbereitung für die Kapillargelelektrophorese

Die DNA-Proben werden direkt aus den Streulichtküvetten Probenvolumina von 50µl - 100µl entnommen, bis zur Verwendung eingefroren (-12°C) oder direkt verarbeitet. Soweit nicht anders beschrieben, werden 5µl dieser DNA-Lösung mit 45µl des Fluoreszenzfarbstoffpuffers der gleichen Ionenstärke versetzt (1µl YOYO [1mM Lsg. in DMSO] von MOLECULAREPROBES mit 44µl Salz/TE-Puffer). Die Messung erfolgen in einer P/ACE 2050 Kapillarelektrophoreseapparatur (BECKMAN Coulter, Fullerton, CA, USA). Als Trennmatrix wird ein 0.5% Polyacrylamidgel von (POLYSCIENCES, Eppelheim) in Salz/TE-Puffer verwendet. Dafür wird das Polyacrylamid 12h in dem Puffer gerührt und anschließend durch eine Glasfilternutsche Porengröße 4 von Schwebeteilchen gereinigt. Aus technischen Gründen können nur Puffersysteme (für den Laufpuffer) mit einer Salzkonzentration von 100mM an NaCl oder KCl eingesetzt werden. Um Wechselwirkungen mit anderen DNA-Molekülen zu vermeiden, wird auf den Zusatz eines Laufzeiten-Markers³¹ zur analysierenden Probe verzichtet.

Die Probengeber des Gerätes können nicht in der oben beschriebenen Weise speziell gespült werden. Eine etwaige Kontamination der Proben mit Fremdsalzen wird dadurch gering gehalten, indem der Gerätevorlauf auf zwei Proben begrenzt wird. Dadurch ist die Kontaktzeit mit eventuell verschmutzten Glaswänden der Probengefäße auf maximal eine Stunde begrenzt. Da das verwendete Probenvolumen nur wenige nl beträgt und aus der Mitte der Vorlage gesaugt wird, ist eine Vermischung mit Fremdionen durch Diffusion oder Konvektion (alle Teile haben Raumtemperatur) aus den Randbereichen nahezu ausgeschlossen.

³¹ Kurzes doppelhelikales DNA-Fragment bekannter Konzentration (und damit Signalhöhe und Integral), auf dessen Signallage die Elektropherogramme unterschiedlicher Läufe normiert werden können.

5 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden vorgestellt und der wechselseitige Nutzen der Daten für die Tetraplexanalytik in Lösung diskutiert.

In Kapitel 5.1 wird auf die Modellrechnungen als theoretische Technik eingegangen. Hier werden zuerst die Modellsequenzen besprochen, die zur Verifizierung der Methodik der Modellrechnungen verwendet wurden. Dann werden die Betrachtungen auf zunehmend anisotrope und komplexere Strukturen ausgedehnt und abschließend Tetraplexsysteme polymorpher G-DNA Sequenzen behandelt.

An zwei rein intramolekularen Tetraplexen wird in Kapitel 5.2 die Vorgehensweise bei der Identifizierung und Charakterisierung von Quadruplexen in Lösung demonstriert und dabei Wert auf die Darstellung der mit den verschiedenen Methoden gewonnenen komplementären Versuchsergebnisse gelegt. Anschließend werden tetramere Systeme mit in die Untersuchungen einbezogen (Kapitel 5.3) und die Ergebnisse zusammengefasst (Kapitel 5.4).

Kapitel 5.5 und Kapitel 5.6 behandeln die Anwendung der komplementären Methoden zur Identifizierung von Tetraplexen polymorpher G-DNA Sequenzen, sowie Sequenzen die potentiell in der Lage sind, höhermolekulare Assoziate zu bilden. Die Lösungsbedingungen werden so variiert, dass die Ausbildung unterschiedlichster Strukturen ein und derselben Sequenz zu beobachten ist.

In allen Abschnitten wird die Vorgehensweise in Durchführung und Auswertung immer an bekannten Systemen mit entsprechenden Literaturdaten verifiziert, bevor jeweils neue Sequenzen und/oder Lösungsbedingungen untersucht werden.

Wie schon bei den einzelnen Strukturtypen (Kapitel 5.2 – intramolekulare Tetraplexe bis Kapitel 5.6 – supramolekulare Strukturen) angesprochen, werden die Möglichkeiten der UV-Spektroskopie und die mit dieser Methode gewonnen Erkenntnissen ausführlich in Kapitel 5.7

diskutiert und Wege aufgezeigt, diese einfache und schnelle Technik als „hochauflösende“ Untersuchungsmethode in der Tetraplexanalytik einzusetzen.

5.1 MODELLRECHNUNGEN

Die in [Gar77][Gar81][Blo77][Nie96] deduzierten Berechnungsmöglichkeiten der hydrodynamischen Eigenschaften von Makromolekülen in Lösung werden in diesem Kapitel für verschiedene DNA-Systeme verifiziert.

Wie in Kapitel 2.4 dargelegt, werden in die Modellrechnungen Teile der Wassermoleküle der Lösungsmittelbox als hydrodynamisch wirksame Reibungszentren³² mit einbezogen. Hierfür werden die Wassermoleküle beachtet, die innerhalb eines definierten Abstandes, von der DNA Oberfläche ausgehend, liegen. Schon in [Nie96] wurden Untersuchungen zum Einfluss der Wasserhülle auf die Ergebnisse der hydrodynamischen Modellrechnungen durchgeführt. Ziel war und ist eine, für alle Sequenztypen (z.B. B-DNA-bildende oder Tetraplex-bildende Basenabfolgen) und sich organisierenden Strukturen konsistente, möglichst exakte Beschreibung der Wasserhüllendicke zu finden.

Die (komplementäre) DNA Sequenzen können auf Grund der spezifischen Basenpaarung nur eine bestimmte Anzahl an kombinatorisch möglichen Strukturen ausbilden. Hierdurch können mit Kenntnis³³ der zu berücksichtigenden Wasserhülle alle für eine Sequenz in Frage kommenden Typen aufgebaut und solvatisiert werden. Die anschließenden hydrodynamischen Modellrechnungen ermöglichen dann eine exakte Zuordnung von experimentellen Ergebnissen der DLS zu definierten Strukturen. So ist eine quasi atomare Strukturauflösung auf der Basis von streulichtspektroskopischen Untersuchungen in Lösung zu realisieren.

Wie in Tabelle 2.1 zu erkennen ist, nimmt die Komplexität der gerechneten Systeme zu, wobei zu den wichtigen Tetraplexsystemen zusätzliche Strukturinformationen aus NMR-Untersuchungen zur Verfügung stehen. Gerade diese Informationen (vgl. Kapitel 2.4.2.1) ermöglichen es in Kombination mit der DLS, ein universelles Modell zu entwickeln und dadurch beliebige Tetraplexstrukturen polymorpher G-DNA Sequenzen in solvatisierter Form

³² Diese Wassermoleküle werden über intermolekulare Wechselwirkungen stark an die DNA gebunden.

aufzubauen und die hydrodynamischen Größen theoretisch exakt zu berechnen. Damit können den DLS-Ergebnissen und dort verwendeten Lösungsbedingungen definierte Strukturen zugewiesen werden, was besonders bei den G-DNA Sequenzen, die je nach Lösungsbedingung Strukturen unterschiedlicher Stöchiometrie, bzw. Strukturisomere bilden können, von großer Bedeutung ist.

Bedingt durch die Vielzahl an experimentellen Ergebnissen zu unterschiedlichsten Strukturen aus der Lichtstreuung einerseits und der größeren Rechenkapazität andererseits, kann die Vorhersagegenauigkeit der hydrodynamischen Größen beliebiger Systeme maßgeblich im Vergleich zu [Nie96] verbessert werden. Zudem ist es erstmalig möglich, für (polymorphe) G-DNA hydrodynamische Modellrechnungen in atomarer Auflösung durchzuführen.

5.1.1 B-DNA und Z-DNA, Duplex- und Hairpinstrukturen

Zunächst wird die Qualität der Modellrechnungen anhand des Vergleiches der experimentellen Ergebnisse mit den theoretischen Berechnungen zu einer homologen Reihe an B-DNA (Modellsequenzen) überprüft. Dann werden die Betrachtungen auf eine Hairpinstruktur ausgedehnt und abschließend noch eine Z-DNA [Bol98] bildende Sequenz³⁴ mit einbezogen.

Die einzelnen DNA-Gerüste werden in einer Lösungsmittelbox solvatisiert sowie unterschiedlich dicke Wasserhüllen um die DNA gelegt (vgl. Abbildung 2.13). In die Modellrechnungen gehen damit zu den die DNA aufbauenden Atome, auch die Wassermoleküle als Reibungszentren mit ein³⁵, die innerhalb des jeweiligen Abstandes d , also innerhalb einer fiktiven Schale (SCHALENMODELL) liegen.

Um festzustellen, ob bei B-DNA bildenden Sequenzen ein konsistentes Bild bezüglich der Dicke der Wasserhülle besteht, werden, wie in Abbildung 5.1 exemplarisch gezeigt, die Daten

³³ Z.B. bei B-DNA stimmen DLS-Ergebnisse und Modellrechnungen überein, wenn alle H₂O Moleküle im Abstand von $d = 305\text{pm} \pm 6\text{pm}$ berücksichtigt werden, d.h. divergieren die hydrodynamischen Größen aus beiden Methode, so liegt in Lösung keine B-DNA vor.

³⁴ Alternierende CG-Abfolgen können leicht von der B-Form zur Z-Form wechseln. Auf Grund der Probenpräparation (Zugabe konz. Salzlösungen zur Einstellung der Ionenstärke) liegt diese Sequenz als Z-DNA vor [Eim93].

³⁵ Wie in Kapitel 2.4 ausführlich gezeigt, werden nur die dem Lösungsmittel zugänglichen DNA/Wassermoleküle berücksichtigt (ASA und CSA Konzept).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

der Modellrechnungen für Wasserhüllen unterschiedlicher Schichtdicke mit Werten aus streulichtspektroskopischen Untersuchungen verglichen. Die experimentellen Daten sind als horizontale Linien dargestellt. Diesen Größen wird ein Fehler von $\pm 4\%$ zugeordnet und als Fehlerbalken mit aufgenommen (vgl. Kapitel 2.3.5, 2.3.8 und 2.4.3).

Die theoretischen Werte für den Translationsdiffusionskoeffizienten D_T und die Rotationsrelaxationszeit τ_R werden für die verschieden dicken Wasserhüllen berechnet und gegen die Hüllendicke d aufgetragen (vgl. Abbildung 5.1 orange und rote Linien).

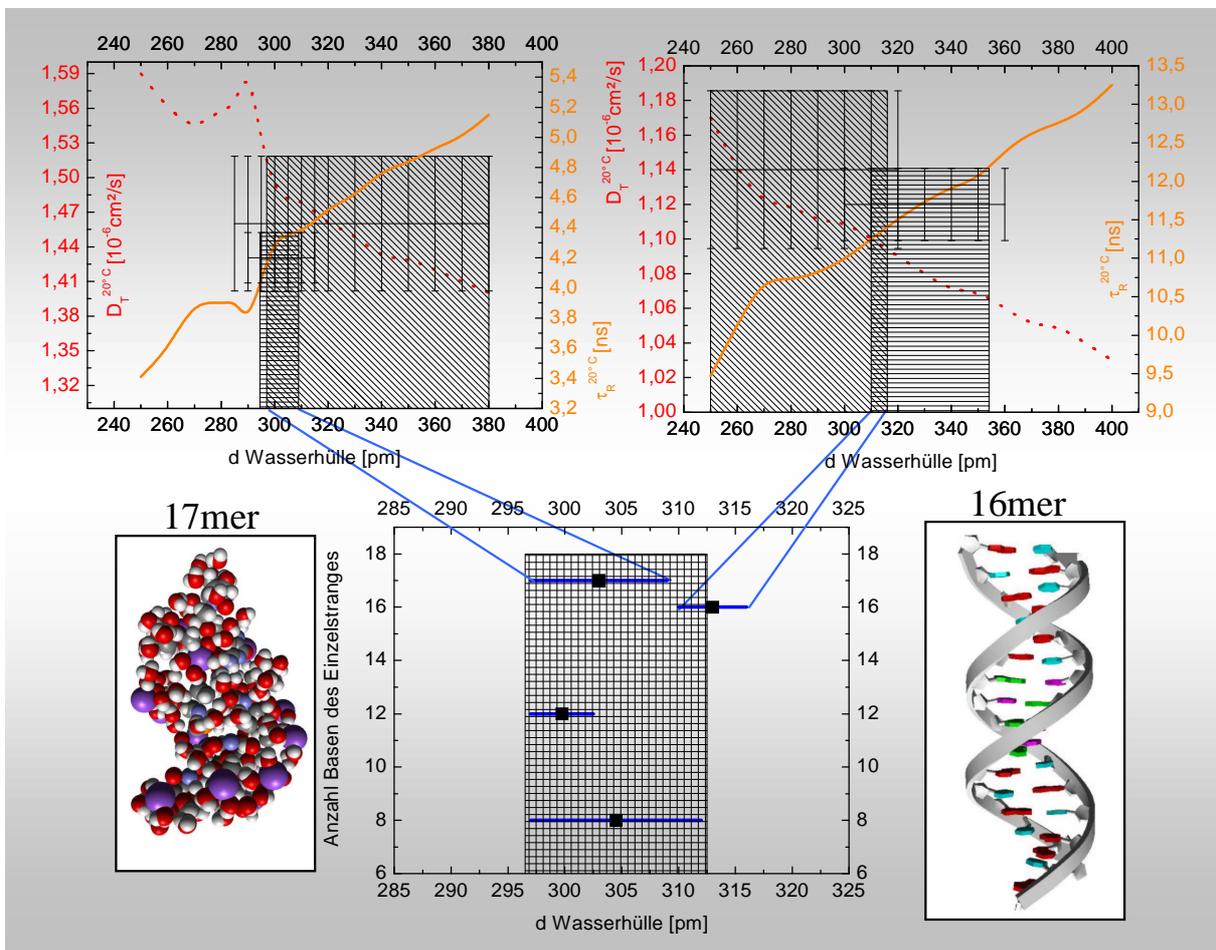


Abbildung 5.1: Theoretische und experimentelle Transportgrößen für verschiedene Duplex- und Hairpinstrukturen. Links oben: Ergebnisse zu einer 17mer Hairpinstruktur mit einem Kalottenmodell der solvatisierten ($d=305\text{pm}$) DNA-Struktur. Rechts oben: ein 16mer Duplex in einfacher Darstellung. Mitte unten: Überlappungsbereich der experimentellen Werte bei gleichzeitiger Berücksichtigung von Rotation und Translation mit einem Fehler von $\pm 4\%$ mit den hydrodynamischen Modellrechnungen entsprechender Wasserhüllendicke. Schraffierte Fläche: Lineare Regression über die Mittelwerte der vier berechneten Modellsysteme ($305\text{pm} \pm 8\text{pm}$).

Jeweils der Bereich von d , in dem sich die experimentellen Daten mit den theoretischen überschneiden, wird als Fläche markiert. Der Bereich von d , in dem sich die markierten Bereiche für Translation **und** Rotation decken, wird als „wahrer“ Wert der Wasserhüllendicke angenommen. Abbildung 5.1-links oben zeigt dieses Verfahren am Beispiel einer 17 Basen langen Hairpinstruktur. Rechts oben sind die Werte für eine 16 Basen lange doppelhelikale B-DNA Sequenz gezeigt.

Bei dem 17mer Hairpin werden in Abbildung 5.1 für eine Wasserhüllendicke von 297pm – 309pm, ausgehend von einer solvatisierten Hairpin-DNA Struktur, die experimentell für diese Sequenz ermittelten Werte erhalten. Der Mittelwert von 303pm ist in Abbildung 5.1-Mitte unten zusammen mit den Mittelwerten für die anderen Modellsequenzen aufgetragen. Es ergibt sich ein konsistentes Bild, das für eine Wasserhülle mit $d = 305\text{pm} \pm 8\text{pm}$ ³⁶ eine Vorhersagegenauigkeit von $\pm 4\%$ für die experimentellen Größen zulässt.

Bei der Berechnung der hydrodynamischen Größen der 17mer Hairpinstruktur wird, anders als beim hier gezeigten 16mer Duplex, eine erhebliche Variation der Ergebnisse im Bereich von $d = 260\text{pm}$ bis $d = 300\text{pm}$ beobachtet. Innerhalb dieses Bereiches liegen die Wassermoleküle, die mit zunehmendem d berücksichtigt werden, zum großen Teil in den Furchen der DNA und in stark gefalteten Loopbereichen. Wie schon in Kapitel 2.4 (Abbildung 2.5) gezeigt, führt beim Schalenmodell der **lineare** Anstieg der Wasserhüllendicke in Abhängigkeit von der Oberflächentopologie zu einem **nicht linearen** Anstieg der Transportgrößen³⁷. Dies ist damit zu begründen, dass bei einer sukzessiven Auffüllung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche die Struktur „glatter“ wird. Eine glattere Schale führt hier zu einer verbesserten Hydrodynamik und damit zu einer schnelleren BROWNSCHEN MOLEKULARBEWEGUNG und den dazugehörigen kleineren Translationsdiffusionskoeffizienten und kürzeren Rotationsrelaxationszeiten. Gerade dieses Verhalten zeigt das 17mer in Abbildung 5.1-links oben für $d = 280\text{pm}$, 285pm und 290pm . Damit wird auch die hohe Sensitivität des Verfahrens dokumentiert und der zusätzliche Rechenaufwand bei Verwendung einer Schrittweite von 5pm bis

³⁶ Lineare Regression über die Überlappungsbereiche der Hüllendicken für Rotation und Translation; Schraffierte Fläche in Abbildung 5.1-mitte unten.

³⁷ In [Nie96] wurde bei einer Schrittweite für d von 50pm linear zwischen den hydrodynamischen Größen interpoliert, was ebenfalls die Differenzen zwischen [Nie96]($d=360\text{pm}$) und dieser Arbeit ($d=305\text{pm}$) erklärt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

10pm für d gerechtfertigt. In Tabelle 5.1 ist eine Übersicht für die verwendeten Sequenzen und Strukturtypen gegeben.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit der gegenüber [Nie96] modifizierten Generierung der Startdateien (vgl. Kapitel 2.4.2.1), der gewählten Schrittweite für d (5pm bis 10pm) und der Verwendung einer atomaren Auflösung der Strukturdaten für die Modellrechnungen eine wesentliche Verbesserung in der Vorhersagegenauigkeit der hydrodynamischen Größen erzielt werden kann. So beträgt die maximale Abweichung der Ergebnisse der Modellrechnungen von denen der Lichtstreuung im Falle des Translationsdiffusionskoeffizienten 4.7% und für die Rotationsrelaxationszeit 6.1% (12mer Duplex mit $d=305\text{pm}$).

Strukturtyp	Bezeichnung	experimentelle Werte		Modell ($d=305\text{pm}$)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
B-DNA, Duplex	8mer	3.22	1.53	1.55	3.28
	12mer	6.39	1.34	1.28	6.65
	16mer	11.70	1.14	1.10	11.40
B-DNA, Hairpin	17mer	4.20	1.46	1.48	4.35
Z-DNA, Duplex	24mer	30.71	0.90	0.91	32.34

Tabelle 5.1: Gegenüberstellung der experimentellen hydrodynamischen Größen der Duplex- und Hairpinstrukturen mit theoretischen Vorhersagen aus den Modellrechnungen.

Die mit diesen einfachen Strukturen verifizierte Durchführung der Modellrechnungen erlaubt es im Folgenden, die Betrachtung auf die komplexeren Tetraplexe auszudehnen.

5.1.2 G-DNA, intra- und intermolekulare Tetraplexstrukturen

Da sich die viersträngigen Tetraplexstrukturen in ihrer Morphologie und (elektrostatischen) Oberflächentopologie von den DNA Duplexstrukturen stark unterscheiden (vgl. Kapitel 2.2),

bedarf es einer Überprüfung der in Kapitel 5.1.1 bestimmten Parameter³⁸ bezüglich des Vorgehens bei der Generierung der Eingabedateien für die Modellrechnung. So muss auch geklärt werden, ob bei identischer Vorgehensweise erneut ein in sich konsistentes Bild bezüglich der zu berücksichtigenden Dimensionen der Wasserhüllen besteht.

Es werden drei, durch verschiedene Messmethoden (DLS, NMR, vgl. Kapitel 2.4.1) gut charakterisierte Tetraplexsysteme eingesetzt. Wie der Abbildung 5.2 zu entnehmen ist, ergibt sich ein für intra- und intermolekulare Tetraplexe konsistentes Bild bezüglich d. Damit lassen sich die in Kapitel 5.1.1 bestimmten Parameter und die Vorgehensweise (vgl. ³⁸) auch auf die neuen Systeme übertragen.

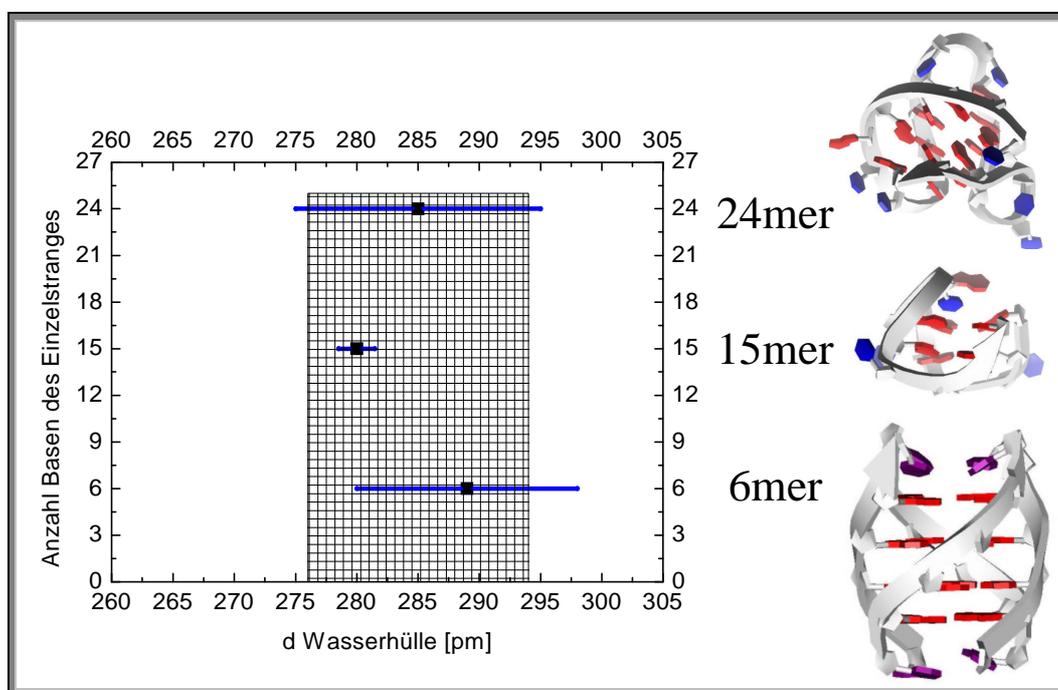


Abbildung 5.2: Links: Vergleich der experimentellen Daten mit hydrodynamischen Modellrechnungen für intra- (15mer und 24mer) und intermolekulare (6mer) Tetraplexstrukturen. Die Balkenlänge repräsentiert den Überlappungsbereich von experimentellen Rotations- und Translationsgrößen mit den Modellrechnungen entsprechender Wasserhüllen. Rechts: Die entsprechenden Tetraplexstrukturen ohne Solvathülle.

Die andere Furchengeometrie (vgl. Kapitel 2.2 und [Nie96]) und elektrostatische Oberflächentopologie begründen die Abnahme der zu berücksichtigenden Wasserhüllendicke. Für die

³⁸ Neben d, der zu berücksichtigenden Wasserhüllendicke, die in Kapitel 5.1.1 für B-DNA zu $305\text{pm} \pm 8\text{pm}$ bestimmt wurde, ist zu prüfen, ob die in Kapitel 2.4 durchgeführten Optimierungsschritte (und deren Abbruchkriterien) beibehalten werden können.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vorhersage der hydrodynamischen Größen ist bei den Modellrechnungen eine Wasserhülle mit $d = 285\text{pm} \pm 9\text{pm}$ *unabhängig* von der Molekularität der betrachteten Struktur zu berücksichtigen. In Tabelle 5.2 ist eine Übersicht für die einzelnen Modellsystem dargestellt. Bei der gemeinsamen Betrachtung von Abbildung 5.2 und Tabelle 5.2 wird ersichtlich, dass der Fehlerbereich der zu berücksichtigenden Wasserhülle für die Vorhersage der Transportgrößen auf $\pm 8\text{pm}$ (Duplex) und $\pm 9\text{pm}$ (Tetraplex) gegenüber $\pm 80\text{pm}$ in [Nie96] reduziert werden kann. Der Fehler in den Modellrechnungen liegt jetzt im Fehlerbereich der Lichtstreuungsmessungen selbst (vgl. Kapitel 2.3.5 und Kapitel 2.3.8).

Strukturtyp	Bezeichnung	experimentelle Werte		Modell	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
B-DNA, Duplex	8mer	3.22	1.53	1.55	3.28
	12mer	6.39	1.34	1.28	6.65
	16mer	11.70	1.14	1.10	11.4
G-DNA intramolekular	15mer	2.54	1.62	1.65	2.76
	24mer	3.40	1.45	1.45	3.41
G-DNA interm.	6mer	3.43	1.46	1.48	3.50

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der experimentellen hydrodynamischen Größen mit theoretischen Vorhersagen. Die berechneten Werte der Duplexstrukturen mit $d = 305\text{pm}$, bei den Tetraplexen mit $d = 285\text{pm}$.

Das eingesetzte Verfahren erlaubt damit die zuverlässige Vorhersage der Transportgrößen *beliebiger* Tetraplexsysteme.

Somit wird die eindeutige Identifizierung der Tetraplexstrukturen polymorpher G-DNA Sequenzen unter physiologischen Bedingungen durch Kombination der Modellrechnungen mit der dynamischen Streulichtspektroskopie und weiteren Methoden ermöglicht (vgl. Kapitel 4.1.1 bis 4.1.4). Dabei werden im Folgenden noch einmal die Ergebnisse für die hier verwendeten Modellsysteme (15mer, 24mer und 6mer) präsentiert und damit verbunden die Möglichkeiten und Grenzen der weiteren Untersuchungsmethoden (UV-Spektroskopie und CGE) aufgezeigt.

5.2 INTRAMOLEKULARE TETRAPLEXE

Die unter den hier eingestellten Bedingungen³⁹ als intramolekulare Tetraplexe vorliegenden Sequenzen des 15mers und 24mers [Mer98][Pat94] wurden bereits in Kapitel 5.1.2 im Rahmen der Verifizierung der hydrodynamischen Modellrechnungen kurz behandelt. Auf Grund der in Kapitel 2.2 aufgeführten biologischen Relevanz des 15mers, liegen zu diesem System eine Vielzahl von Daten zur Struktur und Dynamik vor. Auch zu dem 24mer existieren neben Lichtstremessungen NMR-Untersuchungen in Lösung⁴⁰. Zu den homologen Sequenzen sind bereits umfangreiche UV-spektroskopische Untersuchungen [Mer98] durchgeführt worden. So eignen sich beide Systeme, um die Kombination von DLS, hydrodynamischen Modellrechnungen, UV-Spektroskopie und CGE auf ihre Leistungsfähigkeit, im Hinblick auf die Untersuchung von G-DNA in Lösung, zu überprüfen. Dies ist notwendig, da mit der UV-Spektroskopie, mehr noch mit der CGE, Neuland bei der Identifizierung und Charakterisierung von G-DNA betreten wird.

5.2.1 $G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2$ und $(T_2G_4)_4$ – dynamische Lichtstreuung und Modellrechnungen

In [Mar00][Fei93][Kel96] und [Mar96] wurde die räumliche Struktur des Thrombin-Binding Aptamers (15mer) mittels NMR-Spektroskopie in Lösung sowie mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt. In allen Fällen liegt ein rein intramolekularer Tetraplex mit zwei G-Ebenen vor (vgl. Abbildung 5.3). Die Transportgrößen des Aptamers $d[G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2]$ wurden in [Bol98] unter Verwendung der dynamischen Streulichtspektroskopie in Lösung ermittelt. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den hydrodynamischen Modellrechnungen für eine entsprechende, auf den NMR-Daten beruhende Struktur zeigt, dass auch unter den in [Bol98] be-

³⁹ Bei beiden Sequenzen handelt es sich auf Grund der repetitiven Guanin-reichen Sequenzabschnitte um potentiell polymorphe G-DNA.

⁴⁰ Die Untersuchungsbedingungen der NMR-Daten unterscheiden sich nur unwesentlich von denen der Lichtstreuung (pH-Wert, Ionenstärke, DNA-Konzentration).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

schriebenen Bedingungen ($c(\text{DNA}) \approx 1\text{mM}$, $c(\text{NaCl}) = 74\text{mM}$, bzw. $c(\text{KCl}) = 55\text{mM}$) ein rein intramolekularer Tetraplex vorliegt.

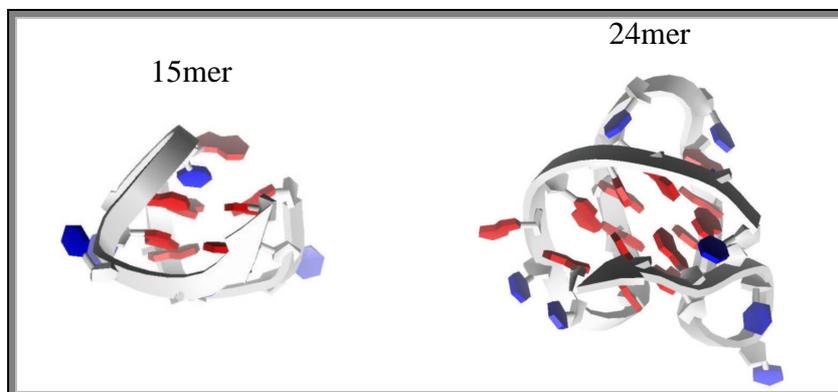


Abbildung 5.3 : 15mer und 24mer als intramolekulare Tetraplexe. Das 15mer mit zwei G-Ebenen, das 24mer mit drei G-Ebenen.

Das 24mer mit der Sequenz $d[(T_2G_4)_4]$ wird in [Pat94] mittels NMR in Lösung als intramolekularer Tetraplex (mit drei G-Ebenen) beschrieben. In Abbildung 5.4 sind die mittels der DLS temperaturabhängig ermittelten Translationsdiffusionskoeffizienten D_T (SE-Plot) dargestellt.

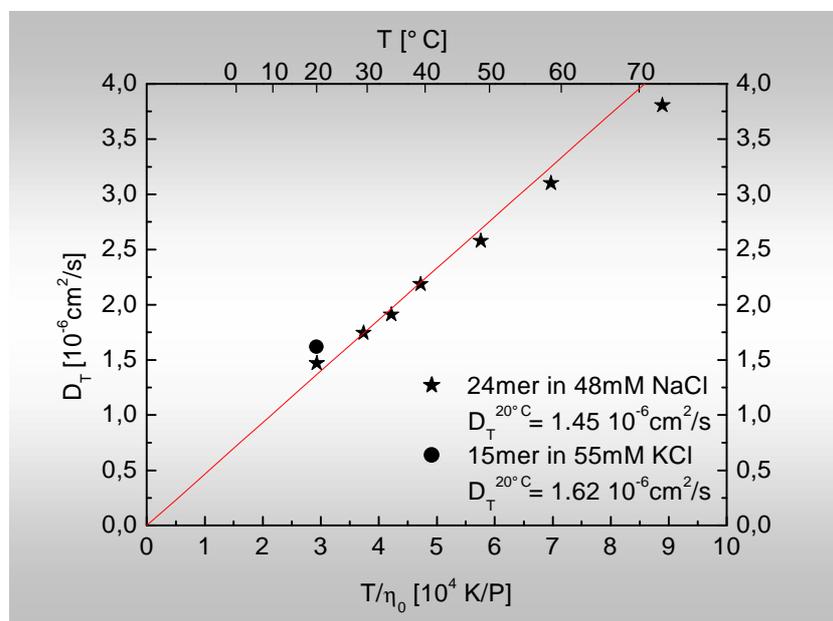


Abbildung 5.4: Stokes-Einstein Plot des 15mers⁴¹ und 24mers.

⁴¹ Aus [Bol98].

Der Stokes-Einstein-Debye Plot mit den Rotationsrelaxationszeiten τ_R ist im Anhang aufgeführt (Anhang_Abb 1). Das System zeigt über einen weiten Temperaturbereich ideales Stokes-Einstein-(Debye)-Verhalten, wobei die Abweichungen bei höheren Temperaturen im SE-Plot (ab ca. 50°C) mit einem Aufschmelzen der Struktur zu einem „random coil“ Einzelstrang mit entsprechend langsameren D_T zu begründen sind.

In Tabelle 5.3 sind die Ergebnisse als Übersicht mit dem unten behandeltem 24mer (vgl. Kapitel 5.5.1) zusammengefasst.

Strukturtyp	Bezeichnung	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ C}$ [10^{-6} cm ² /s]	$D_T^{20^\circ C}$ [10^{-6} cm ² /s]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
intramolekularer Tetraplex G-DNA	15mer	2.54	1.62	1.65	2.76
	24mer	3.40	1.45	1.45	3.41

Tabelle 5.3: Übersicht der intramolekularen Tetraplexe. Vergleich der experimentellen Werte aus der DLS mit den Ergebnissen aus den Modellrechnungen.

Die in Tabelle 5.3 gezeigte Übersicht belegt, dass unter den eingestellten Bedingungen beide Sequenzen als intramolekulare Tetraplexe vorliegen. Damit ist es möglich, die weiteren Messmethoden UV-Spektroskopie und CGE auf ihre Leistungsfähigkeit und Aussagekraft hin zu überprüfen.

5.2.2 $G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2$ und $(T_2G_4)_4$ – UV-Spektroskopie und CGE

Die UV-Spektroskopie und CGE liefern komplementäre⁴² Informationen zu der dynamischen Streulichtspektroskopie (vgl. Kapitel 2.5 und Kapitel 2.6). Die hier vermessenen Modellsequenzen sollten auf Grund ihrer Struktur (intramolekularer Tetraplex – keine Isomere mit anderer Strangstöchiometrie) ein besonders einfaches Schmelz-/Assoziationsverhalten in der UV-Spektroskopie [Mer98] aufweisen. Darüber hinaus ist zu erwarten, dass das Elektrophoreogramm in der CGE nur ein Hauptsignal je Sequenz zeigt.

⁴² Anderer Konzentrationsbereich bzgl. der DNA Konzentration, präzise Schmelzpunktbestimmung und thermodynamische Daten (UV) und keine Maskierung von Minoritätenspezies (CGE).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, wird zur Bestimmung der Schmelztemperatur von G-DNA die Temperaturabhängigkeit der Absorption bei einer Wellenlänge von 297nm analysiert. Die Wendestelle der sigmoidalen Kurvenanpassung wird als T_m -Wert (Schmelztemperatur) definiert.

Zusätzliche Informationen bietet die Auswertung der Assoziationskurve. Dieser Aspekt wird in Kapitel 5.7 ausführlich diskutiert. Bei einem intramolekularen Tetraplex ist zu erwarten, dass die Assoziation nahezu instantan und konzentrationsunabhängig verläuft [Mer98]. Die in Abbildung 5.5 exemplarisch gezeigte Schmelz- und Assoziationskurve des 24mers in NaCl und des 15mers in KCl (vgl. Abbildung 2.15-rechts) zeigen eindrucksvoll das für diesen Strukturtyp postulierte Verhalten.

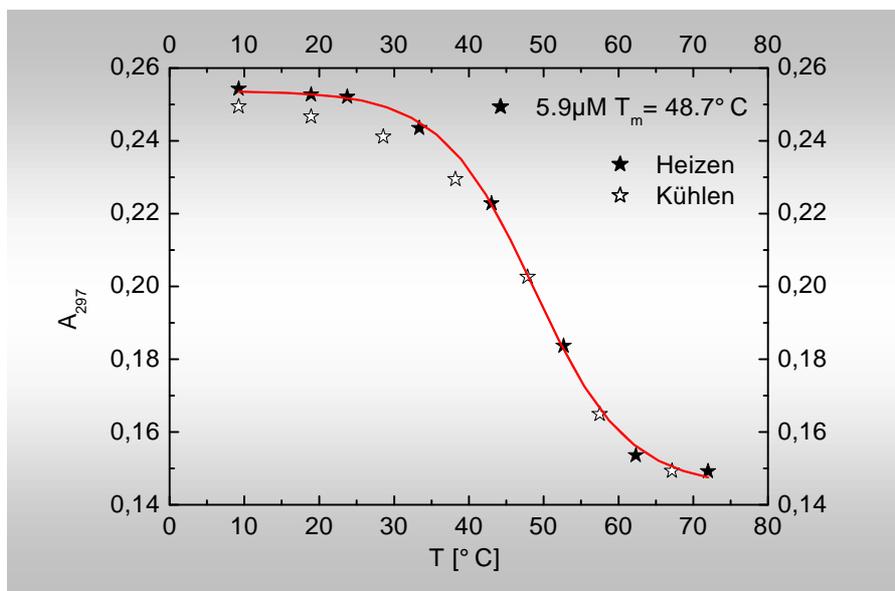


Abbildung 5.5 : Schmelz-(geschlossene Symbole) und Assoziationskurve (offene Symbole) des 24mer mit $c(\text{DNA}) = 5,9\mu\text{M}$ in 48mM NaCl .

Ergänzend wird das Schmelzverhalten in Abhängigkeit von der Ionenart (Natrium- vs. Kaliumsysteme) untersucht. In Tabelle 5.4 sind die ermittelten T_m -Werte aufgelistet. Es zeigt sich die in Kapitel 2.2 beschriebene stärkere Stabilisierung der Tetraplexstruktur bei Kaliumsystemen im Vergleich der T_m -Werte des Aptamers in Kaliumchlorid und Natriumchlorid.

Die Anzahl der G-Ebenen hat Einfluss auf die Schmelztemperatur. Dieses ist im Vergleich der T_m -Werte des Aptamers (zwei G-Ebenen) und des 24mers (drei G-Ebenen) mit $23,0^{\circ}\text{C}$ vs.

47.2°C sehr deutlich zu erkennen. Die Auswirkung der inneren Spannung auf die Schmelztemperatur kann bei diesen intramolekularen Tetraplexstrukturen nicht quantifiziert werden, da die Länge und die Sequenz der Loopbereiche nicht identisch sind.

Bezeichnung	Konzentration DNA/Kation	Schmelztemperatur
15mer	8.7µM/57mM NaCl	23.0°C (20°C)
2 G-Ebenen	7.4µM/56mM KCl	46.7°C (50°C)
24mer 3 G-Ebenen	3µM-22.9µM/48mM NaCl ⁴³	Ø 47.2°C

Tabelle 5.4 Übersicht zum Einfluss der Ionenart und der Anzahl an G-Ebenen auf die Schmelztemperatur. In () Literaturwerte aus [Mer98].

Da die in den hier aufgezeigten UV-Messungen verwendeten DNA-Konzentrationen um ca. $1 \cdot 10^3$ niedriger liegen als in den zur eigentlichen Strukturbestimmung durchgeführten DLS- und NMR-Messungen, werden die Schmelzkurven aus den depolarisierten statischen Intensitäten der DLS mit den Schmelzkurven aus der UV-Spektroskopie verglichen. Würden sich in den unterschiedlich konzentrierten DNA-Lösungen unterschiedliche Tetraplexstrukturen bilden, so müssten sich auf Grund der verschiedenen Anzahl an G-Ebene die Schmelzprofile unterscheiden.

In Abbildung 5.6 sind die entsprechenden Daten der Systeme in Natrium abgebildet. Die statischen Intensitäten des depolarisierten Streulichts der DDLS-Messungen des Aptamers sind [Bol98] entnommen (Aptamer in KCl siehe Anhang_Abb 2). Sowohl für das Aptamer, als auch für das 24mer in NaCl, zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung des Schmelzverhaltens aus der DDLS und der UV-Spektroskopie. Damit steht mit der UV-Spektroskopie eine weitere Methode zur Analyse des Schmelzverhaltens von Tetraplexen zur Verfügung, die den zugänglichen Konzentrationsbereich um fast drei Dekaden nach unten erweitert. Inwieweit diese Ergebnisse auf die inter-/intra- und supramolekularen G-DNA Strukturen übertragen werden können (vgl. Kapitel 5.3, 5.5 und 5.6), wird in den jeweiligen Kapiteln belegt. Die

⁴³ Die Schmelzkurven der vier in diesem Konzentrationsbereich vermessenen Proben sind in Kapitel 5.7, bzw. Anhang_Abb 6 gezeigt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

weitergehende Analyse der UV-spektroskopisch bestimmten Schmelz- und Reaggregationskurven, sowie die Auswertung der thermodynamischen Daten, werden in Kapitel 5.7 ausführlich behandelt.

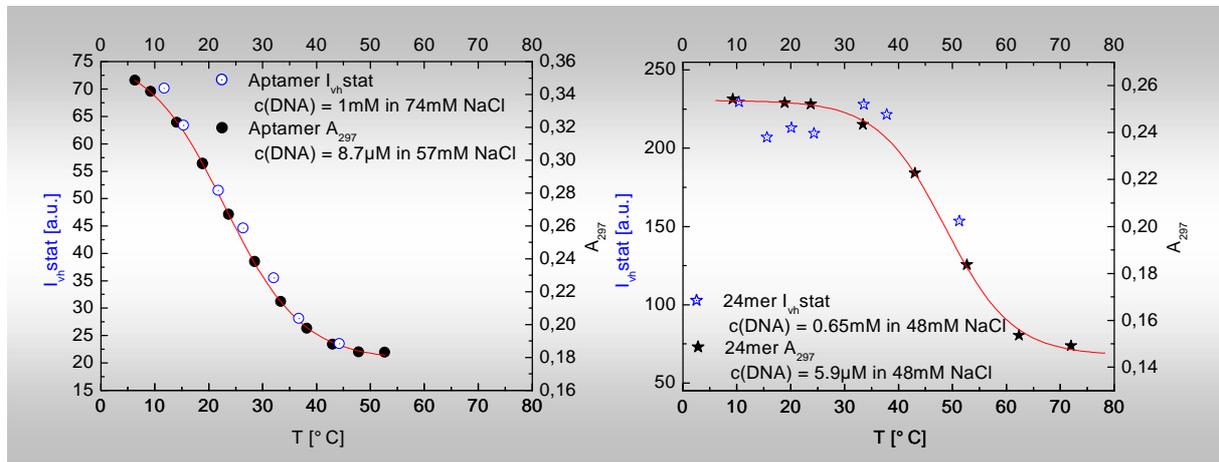


Abbildung 5.6 : Vergleich der Schmelzkurven für das Aptamer und das 24mer in NaCl. Meßmethoden DDLS (geschlossene Symbole) vs. UV-Spektroskopie (offene Symbole).

In Ergänzung zur UV-spektroskopischen Untersuchung wird eine Kapillargelelektrophoreselauf mit dem 24mer durchgeführt. Das Elektropherogramm aus der CGE zeigt ein Hauptsignal, das nochmals in zwei Maxima differenziert ist. In Abbildung 5.7 ist diese Feinaufspaltung nach einer Laufzeit von ca. 11 min zu erkennen.

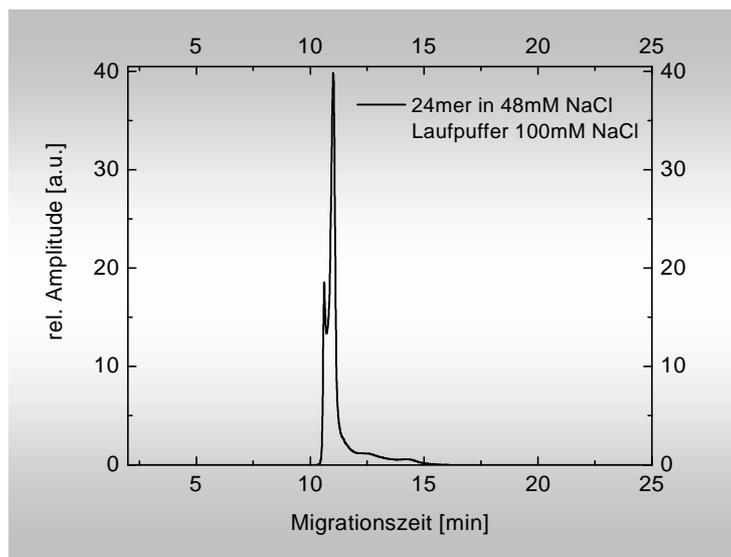


Abbildung 5.7 : Elektropherogramm des 24mers in 48 mM NaCl.

Das Signal läuft anschließend in einem breiten flachen Fuß bis zu einer Migrationszeit von ca. 15min aus. Der Signalverlauf in Abbildung 5.7 schließt Isomere mit anderer Stöchiometrie aus, da diese deutlich verschiedene Migrationszeiten aufweisen müssen (vgl. Gleichung (2.55)). Damit kann anhand des vorliegenden Profils von einem rein intramolekularen Tetraplex ausgegangen werden. Der bis zu einer Zeit von 15min reichende Fuß ist zum einen mit der eingesetzten DNA-Menge zu begründen⁴⁴, da auf Grund der schlechten Einlagerung des Farbstoffes sehr hohe DNA-Konzentrationen vorgelegt werden mussten. Zum anderen ist der Laufpuffer mit 100mM NaCl, wie in Kapitel 5.5.1 noch gezeigt wird, so konzentriert, dass eine Strukturumlagerung stattfinden kann⁴⁵.

Für die beobachtete Aufspaltung des Hauptsignals gibt es zwei Interpretationsansätze. Zum einen kann mit der schlechten und langsamen Farbstoffeinlagerung argumentiert werden. Mit der Interkalation des YOYOs sind Änderung in der Morphologie, der Oberflächentopologie und der Ladung möglich. Diese können eine weitere Farbstoffeinlagerung erschweren und/oder auf Grund der einhergehenden Größen-/Ladungsänderung zu unterschiedlichen Migrationsverhalten der unterschiedlich mit Farbstoff gesättigten intramolekularen Quadruplexe führen [Pul75].

Zum anderen sind verschiedene Loopkonformationen denkbar. Wie in Abbildung 2.8 (intramolekularer Tetraplex des Thrombin-Binding Aptamers) gezeigt, kommt es in intramolekularen Tetraplexen auf jeden Fall zu syn-anti Konformationen, die mit einer makroskopischen Strukturänderung (unterschiedlich lange Außenkanten der G-Ebene) einhergehen. Da die syn-anti Anordnungen durch die Polarität der DNA von der relativen Lage der Loops abhängig sind, ist auch bei rein intramolekularen Strukturen eine Isomerisierung möglich, gerade wenn wie beim 24mer auch Strukturen mit eventuell nur zwei G-Ebenen und damit sehr variablen Loop-längen (zwei bis vier Basen), denkbar sind. Ob eine solche Loopisomerisierung auch von interkalierenden Farbstoffen wie dem hier eingesetzten YOYO induziert werden kann, ist hier nicht zu klären.

⁴⁴ [Mit95] (vgl. Kapitel 4.1.4).

⁴⁵ Umlagerungen von Tetraplexstrukturen sind kinetisch stark gehemmt [Bol98][Nie96][Wil94], so dass im betrachteten Zeitfenster dieser Einfluss der Pufferkonzentration auf das Hauptsignal (nicht auf den Fuß) redundant ist.

5.3 INTERMOLEKULARE TETRAPLEXE

Zwei Sequenzen, die intermolekulare tetramere Strukturen bilden können, werden im folgenden Kapitel behandelt (vgl. Abbildung 5.8). Zu beiden Quadruplexen liegen Literaturdaten in Form von NMR-Strukturdaten (6mer) bzw. aus molekulardynamischen Simulationen (8mer) vor. Nach den intramolekularen Spezies im Kapitel 5.2 wird mit diesen rein intermolekularen Strukturen der andere Grenzfall bei der Bildung von Tetraplexen untersucht (intramolekular vs. intermolekular).

5.3.1 UG₄U und T₂G₄T₂ - Lichtstreuung und Modellrechnungen

Die als 6mer bezeichnete Sequenz d[UG₄U] weist nur einen G-Bereich mit vier aufeinanderfolgenden Guaninbasen auf. Am 5'Anfang und 3'Ende ist jeweils eine Uracilbase, welche diese RNA-Sequenz (abgesehen vom Zucker) von allen anderen hier vorgestellten DNA-Sequenzen unterscheidet. Da nur ein Guanin-reicher Sequenzabschnitt vorliegt, ist ausschließlich die Bildung eines tetrameren Tetraplexes möglich.

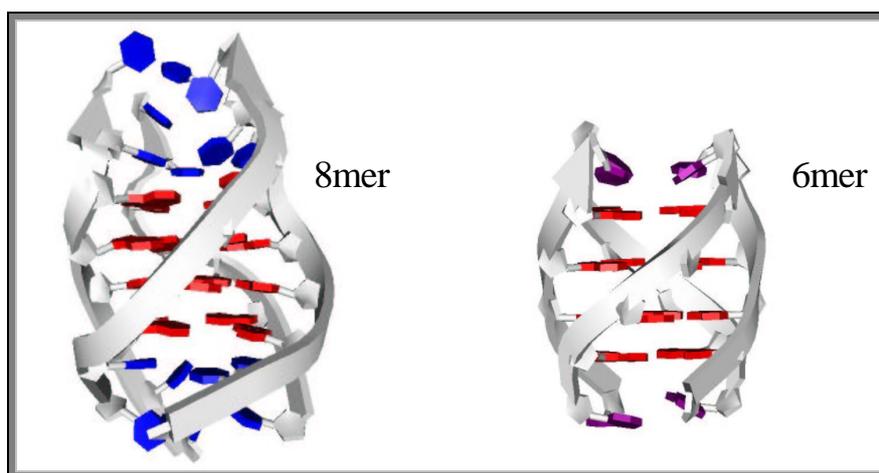


Abbildung 5.8 : Das 8mer und das 6mer als intermolekulare tetramere Tetraplexe mit paralleler Stranganordnung.

In [Che92] wird über eine, auch in NaCl ungewöhnlich starke Tetraplexbildung berichtet und zudem keine wie bei dem DNA-Analogen d[TG_4T] [Lui97] Stapelbildung zwischen mehreren Quadruplexeinheiten beobachtet. Die hydrodynamischen Größen und das Schmelzverhalten⁴⁶ des 8mers mit der Sequenz d[$\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2$] in NaCl wurden in [Nie96] charakterisiert. Gleichzeitig ist dieses System in umfangreichen MD-Simulationen als Modell für Tetraplexsysteme von [Kro00] untersucht worden.

Damit stehen, durch entsprechende Literaturdaten gestützt, zwei Modellsequenzen für rein intermolekulare Tetraplexsysteme zur Verfügung. Wie in Kapitel 5.2 ist die hier eingesetzte Methodik auch für tetramere Strukturen zu verifizieren. Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen nach [Che92] und [Nie96] kann das experimentelle Parameterfeld bezüglich der Ionenart und -stärke erweitert werden.

Sowohl das 6mer, als auch das 8mer werden in KCl/TE Puffer in der Lichtstreuung vermessen, wobei zum besseren Vergleich (identische Ionenkonzentration) der NaCl-Daten aus [Nie96] das 8mer in 43mM KCl, das 6mer in 55mM KCl angesetzt wird. Dies entspricht der gleichen Salzkonzentration wie in den vorliegenden NMR-Messungen. Die Auftragung des Translationsdiffusionskoeffizienten D_T bzw. der Rotationsrelaxationszeit τ_R zeigt für beide Systeme ein ideales Stokes-Einstein-(Debye) Verhalten (vgl. Abbildung 5.9). Trotz der hohen Temperaturen (Messbereich von 7°C bis 76°C) ist in den Stokes-Einstein Plots keine Abweichung vom idealen Verhalten festzustellen, was - wie in Kapitel 5.2 gezeigt - eine thermisch bedingte Strukturänderung (Schmelzen) anzeigen kann. Deutlich sichtbar ist auch die höhere Sensitivität der depolarisierten Lichtstremessungen in Bezug auf die Morphologie der Tetraplexe. Sind die ermittelten Translationsdiffusionskoeffizienten beider System nahezu identisch (Abbildung 5.9-links), unterscheiden sich die Rotationsrelaxationszeiten schon deutlich (Abbildung 5.9-rechts: 3.43ns – 6mer vs. 5.42ns – 8mer).

⁴⁶ Ein Schmelzverhalten wurde in [Nie96] ausschließlich auf Grund von Abweichungen im SE-Verhalten bei hohen Temperaturen postuliert.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

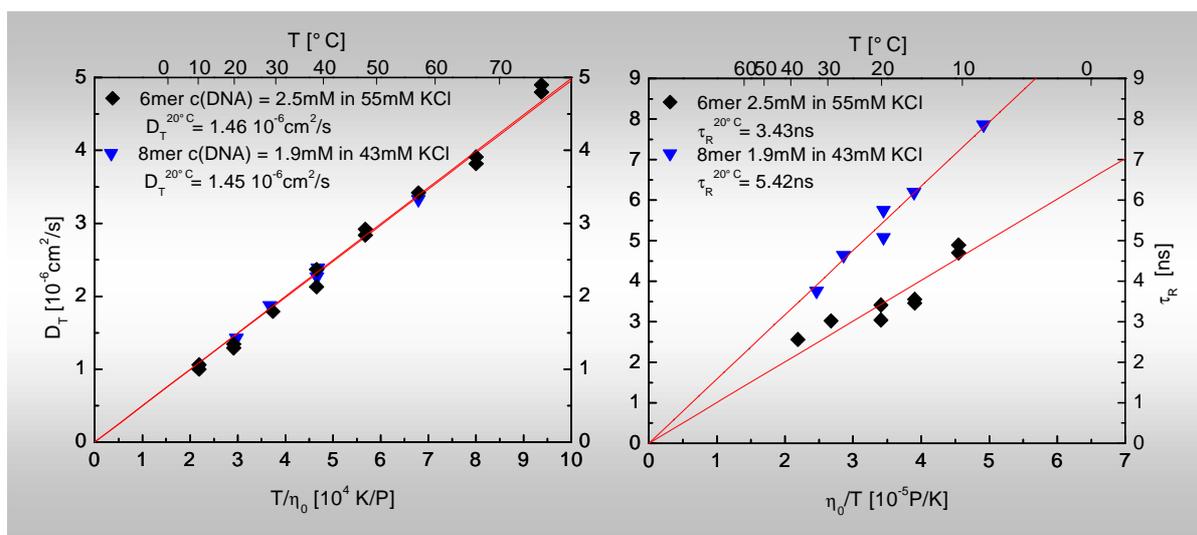


Abbildung 5.9 : Links: Stokes-Einstein Plot. Rechts: Stokes-Einstein-Debye Plot - 8mer vs. 6mer in KCl.

Die komplementären Ergebnisse aus den hydrodynamischen Modellrechnungen für die hier untersuchten intermolekularen Tetraplexe sind in Tabelle 5.5 aufgeführt. Sie zeigen deutlich die Übertragbarkeit der in Kapitel 5.2.1 für intramolekulare Tetraplexe bestimmten Dimension der zu berücksichtigenden Wasserhülle (mit $d = 285 \text{ pm}$).

Strukturtyp	Bezeichnung	experimentelle Werte		Modell ($d=285 \text{ pm}$)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
intermolekularer Tetraplex G-DNA	6mer	3.43	1.46	1.48	3.50
	8mer	5.42	1.45	1.45	5.42

Tabelle 5.5: Übersicht zu den vermessenen intermolekularen tetrameren Tetraplexen. Vergleich der Daten aus der DLS mit denen aus den Modellrechnungen.

Beide Systeme liegen unter den eingestellten Bedingungen als tetramere Quadruplexe vor. Diese zeigen über den vermessenen Temperaturbereich (6mer 7°C - 76°C , 8mer 20°C - 57°C) kein Schmelzverhalten in der Lichtstreuung.

In NaCl zeigt sich dagegen ein anderes Verhalten des 8mers bei hohen Temperaturen. Die in [Nie96] aufgeführten Daten belegen eine deutliche Abweichung vom Stokes-Einstein Verhalten ab ca. 55°C , was hier in KCl nicht zu beobachten ist (vgl. Abbildung 5.41-oben rechts).

Diese Unterschiede zwischen dem 8mer in NaCl und KCl dokumentieren den in Kapitel 2.2 und Kapitel 5.2 gezeigten Einfluss der Ionenart auf die Stabilität der G-DNA auch bei tetrameren Tetraplexen.

5.3.2 UG₄U und T₂G₄T₂ - UV-Spektroskopie und CGE

Die oben in der Lichtstreuung detektierten Unterschiede in der Temperaturstabilität des 6mers und des 8mers untereinander sowie in Abhängigkeit von der Ionenart bei gleicher Sequenz, werden mit den, in diesem Kapitel beschriebenen UV-spektroskopisch Untersuchungen beleuchtet und das Migrationsverhalten der Proben in der CGE analysiert.

Von beiden Sequenzen werden temperaturabhängige UV-Spektren aufgenommen, wobei zusätzlich zu den in Kapitel 5.3.1 eingestellten Bedingungen (alle Messungen in KCl) in Bezug auf die Ionenart und Ionenstärke jeweils noch Ansätze in NaCl vermessen werden.

Zunächst zeigen die temperaturabhängig aufgenommen Absorptionswerte der Kaliumsysteme bei $\lambda = 297\text{nm}$ (vgl. Abbildung 5.10-links) im gesamten, in wässriger Lösung unter Normaldruck zugänglichen Temperaturbereich keine Veränderung. Die geringe Drift in den Werten ist mit temperaturabhängigen Dichteänderungen bzw. dem Verdunsten und der damit einhergehenden Erhöhung der Konzentration der Lösung zu erklären (vgl. Kapitel 4.1.3 und Kapitel 4.2). Auch Veränderungen in der Überlappung der π -Orbitale der Basen auf Grund temperaturbedingter Schwingungen sind wahrscheinlich. Die hier beobachtete Stabilität der tetrameren G-DNA in KCl steht im Einklang mit den Ergebnissen der dynamischen Streulichtspektroskopie (vgl. Kapitel 5.3.1) und den Literaturdaten [Che92].

In Abbildung 5.10-rechts sind die Schmelzkurven des 8mers und 6mers in NaCl gezeigt. In beiden Fällen sind deutliche Abweichungen gegenüber den Kaliumsystemen (Abbildung 5.10-links) zu erkennen. Der T_m -Wert des 8mers in 50mM bzw. 100mM NaCl mit 53°C bzw. 55°C unterscheidet sich stark vom extrapolierten Wert von ca. 92°C des RNA-Systems, was die in [Che92] beschriebene Stabilität des 6mers bestätigt. Wie bei den vorangehenden UV-Untersuchungen werden auch hier Assoziationskurven aufgenommen. Die Auftragungen sind in Kapitel 5.7 diskutiert. Vorweggenommen sei, dass im μM Konzentrationsbereich keine

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Reaggregation zu beobachten ist, was für eine andere Molekularität im Vergleich zu den intramolekularen Spezies aus dem vorherigen Kapitel spricht und mit einer tetrameren Tetraplexstruktur zu begründen ist.

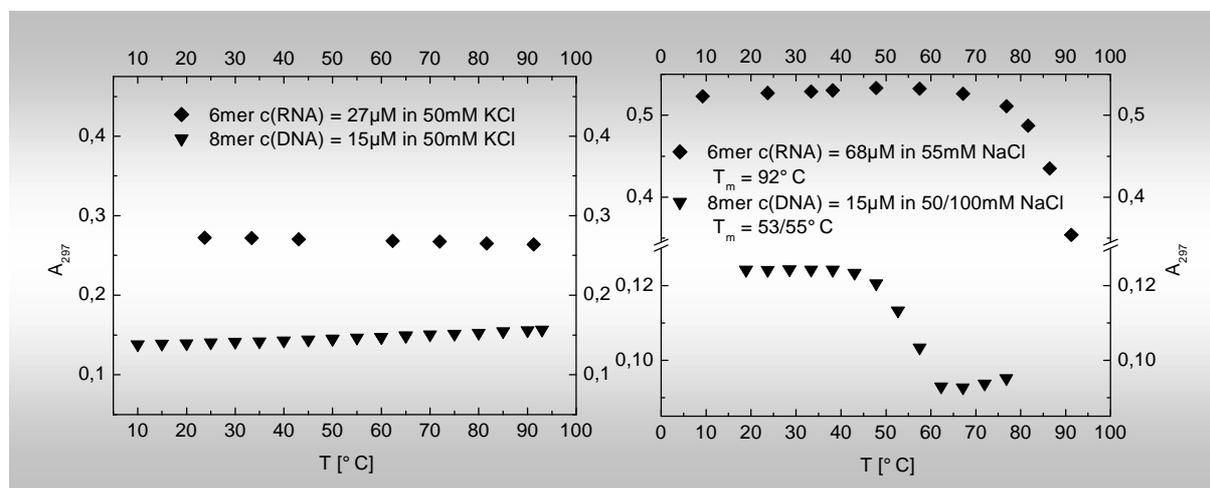


Abbildung 5.10 : Vergleich der temperaturabhängigen Absorptionsmessungen des 8mers und des 6mers. Links: In KCl. Rechts: In NaCl.

Die erhöhte Stabilität des 6mers gegenüber dem 8mer kann mit zwei synergetischen Effekten begründet werden. Die Länge der endständigen Basensequenz und die damit verbundenen Scherkräfte bei höheren Temperaturen spielen eine wichtige Rolle. Hier wirken die zwei endständigen Thyminbasen im 8mer destabilisierend. Dieser Längeneffekt wird in Kapitel 5.7 an mehreren Sequenzen im direkten Vergleich diskutiert.

Der andere Beitrag zur Stabilisierung des 6mers ist mit der Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken zwischen den Uracilbasen zu begründen. Wie in [Che92] gezeigt, wird am 5'-Anfang des Komplexes eine Uracilebene ausgebildet. In Abbildung 5.11 ist die Aufsicht auf eine U-Ebene am 5'-Anfang des 6mers gezeigt. Im Gegensatz dazu ist in Abbildung 5.8 zu erkennen, dass sich zwischen den 5'-endständigen, mehr noch zwischen den 3'-endständigen Thyminbasen des 8mers keine geordnete Struktur ausbildet und die kompakte, regelmäßige Helixanordnung im Endbereich gestört ist (Endstruktur⁴⁷ der MD-Simulation von [Kro00]).

⁴⁷ Laufzeit 122ns. Dass sich Thyminbasen am 5'-Anfang anders anordnen als am 3'-Ende (wie in Abbildung 5.8 am Beispiel des 8mers zu erkennen) und damit auch unterschiedliche Beiträge zur (De-)Stabilisierung der Quadruplexstruktur liefern, wird in [Kal93] beschrieben.

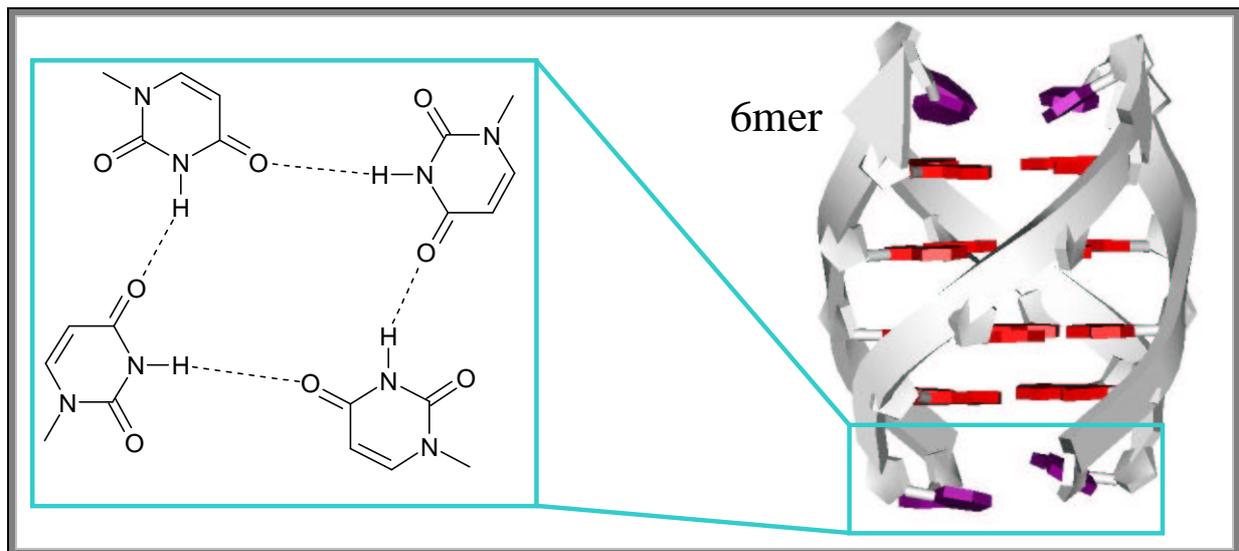


Abbildung 5.11 : Links: Aufsicht auf eine Uracilebene mit vier Wasserstoffbrücken. Rechts: 6mer in schematischer Darstellung mit markiertem 5'-Anfang.

Der Einfluss der Ionenart auf die Stabilität und damit Schmelztemperatur von tetrameren Tetraplexen ist in Tabelle 5.6 gezeigt.

Bezeichnung	Konzentration DNA/Kation	Schmelztemperatur
6mer	27 μ M/50mM KCl	- °C
	68 μ M/55mM NaCl	\approx 92°C
8mer	15 μ M/50mM KCl	-°C
	15 μ M/ 50/100mM NaCl	53.0°C/55.0°C
	3.12mM 48mM NaCl ⁴⁸	>55°C

Tabelle 5.6 : Vergleich der T_m -Werte des 8mers mit denen des 6mers in Na^+ - und K^+ -Systemen.

Mit den vorliegenden Daten und Messergebnissen der beiden Guanin-reichen Sequenzen lassen sich diese eindeutig als intermolekulare Tetraplexe charakterisieren. Mittels der UV-Spektroskopie kann der Einfluss der Ionenart auf die Stabilität der Strukturen untersucht und die in [Nie96] durch Auswertung von DLS-Daten ermittelte Schmelztemperatur des 8mers erstmalig UV-spektroskopisch verifiziert werden.

⁴⁸ [Nie96]

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Elektropherogramme der Kapillargelelektrophorese sind in Abbildung 5.12 gezeigt.

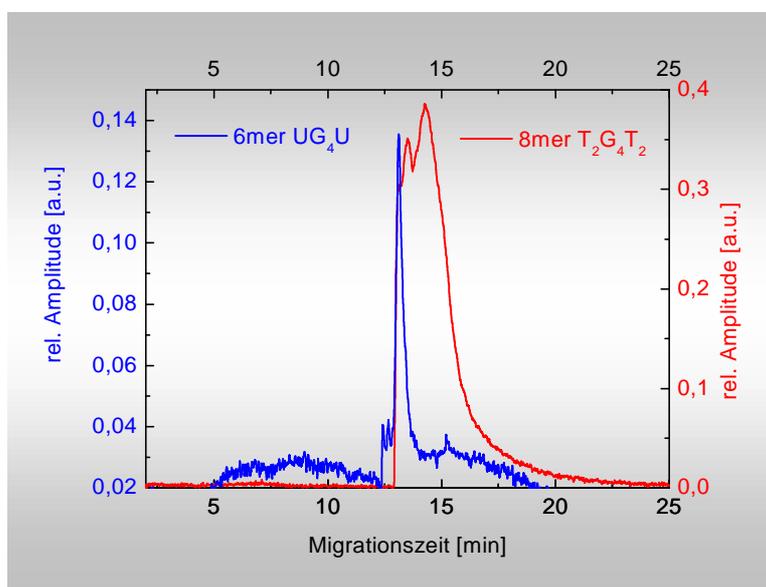


Abbildung 5.12 : Elektropherogramme der CGE des 6mers in 55mM KCl (blau) und des 8mers in 43mM KCl (rot), beide in 100mM KCl als Laufpuffer.

Das 6mer zeigt ein scharfes Signal mit niedriger Intensität, das mit einer definierten Struktur ohne Isomere in Einklang steht. Die denkbare syn-anti Isomerisierung (antiparallele Stranganordnungen) wird durch die zusätzliche U-Ebene verhindert. Gleichzeitig ist die Farbstoffeinlagerung extrem behindert (geringe Intensität), was dafür spricht, dass YOYO nur in die „offenen“ End- oder Loopbereiche interkalieren kann.

Das Hauptsignal des 8mers ist zu längeren Zeiten hin versetzt⁴⁹ und zeigt, wie auch schon das 24mer (vgl. Abbildung 5.7), eine Feinaufspaltung des Maximums.

Die Ausgangskonzentration ist in beiden Proben nahezu identisch (das 6mer mit $c(\text{DNA})=2.5\text{mM}$ sogar höher konzentriert als das 8mer mit $c(\text{DNA})=1.9\text{mM}$). Trotzdem unterscheiden sich die Integrale um den Faktor zehn. Aufspaltung und Unterschiede in der detektierten Menge lassen sich auf zwei Effekte zurückführen.

⁴⁹ Bezieht sich nur auf die Abbildung; ohne Laufzeitmarker sind Absolutbewertungen innerhalb der abgebildeten Zeitskalen nicht möglich.

Zum einen ist das Verhalten so zu erklären, dass sich durch die längere Inkubationszeit⁵⁰ und die im Vergleich zum 6mer offenere Struktur an den Enden mehr Farbstoff in die Tetraplexstruktur des 8mers einlagert und dies auch wieder (vgl. 24mer Kapitel 5.2.2) zu unterschiedlich gesättigten Strukturen und Laufzeiten führt. Als Beispiel wäre denkbar, dass das erste Signal durch eine Spezies des 8mers verursacht wird, in der nur zwischen den Thyminen des 3'-Endes YOYO eingelagert wurde. Das zweite Signal (langsamere Struktur) wird dann von einem Tetraplex verursacht, in dem zwischen allen Thyminen Farbstoff eingelagert ist und dadurch die Struktur entsprechend aufgeweitet, bzw. geringer geladen vorliegt.

Zum anderen sind im Gegensatz zum 6mer, bei dem die 5'Uracilbasen in eine zusätzliche U-Ebene eingebunden sind und damit die parallele Stranganordnung zusätzlich favorisiert wird, beim 8mer auch syn-anti Isomere möglich, die ebenfalls zu einer Feinaufspaltung führen könnten. Inwieweit durch die bei syn-anti Isomeren nicht mehr äquidistanten Kanten der G-Ebene und damit offeneren Furchengeometrie die Farbstoffeinlagerung (und damit Laufzeit und detektierte Menge) beeinflusst wird, ist hier nicht zu klären. Die Bedeutung dieser, sich bei anderen Strukturen wiederholenden Beobachtung für die Analytik und biologische Fragestellungen, wird in Kapitel 6 diskutiert.

⁵⁰ Beide Proben werden gleichzeitig präpariert, sind nacheinander gelaufen (zuerst das 6mer, dann das 8mer).

5.4 ZUSAMMENFASSUNG INTRA- UND INTERMOLEKULARE TETRAPLEXE

In den vorhergehenden Kapiteln sind die einzelnen Untersuchungsmethoden und die Auswertung der komplementären Ergebnisse anhand von Modellsequenzen sowohl für intra-, als auch intermolekulare Tetraplexe eingehend behandelt worden.

Für die G-DNA Sequenzen $d[(T_2G_4)_4]$ (24mer) und $d[G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2]$ (15mer/Aptamer) wurden Lichtstremessungen durchgeführt und die erhaltenen Diffusionskoeffizienten und Rotationsrelaxationszeiten mit Werten aus hydrodynamischen Modellrechnungen verglichen. Es zeigte sich eine exzellente Übereinstimmung der experimentellen und theoretischen Rotationsrelaxationszeiten τ_R und Translationsdiffusionskoeffizienten D_T . Bei den Modellrechnungen wurde als G-DNA Struktur ein intramolekularer Tetraplex angenommen; durch die Übereinstimmung der gemessenen hydrodynamischen Größen wurde diese Struktur bestätigt.

UV-spektroskopisch wurden durch die Analyse der Temperaturabhängigkeit der Absorption bei einer Wellenlänge von 297nm die Schmelzpunkte der Strukturen bestimmt und im Falle des 15mers mit Literaturdaten verglichen. Als entscheidender Verknüpfungspunkt zwischen den UV-Messungen und der DLS wurden die statischen Intensitäten aus der depolarisierten Lichtstreuung mit den Absorptionen der UV-Spektroskopie verglichen. Trotz der unterschiedlichen DNA-Konzentration zeigte sich mit beiden Methoden ein identisches Verhalten bei temperaturabhängigen Messungen. Da in beiden Messgrößen die gleiche Strukturinformation bezüglich der relativen Orientierung der (Guanin-)Basen zueinander enthalten ist, kann durch den Vergleich sichergestellt werden, dass mit beiden Methoden das Schmelzen der gleichen Spezies beobachtet wird. D.h., die mit der UV-Spektroskopie ermittelten Schmelztemperaturen gelten auch für die deutlich höher konzentrierten Lösungen, die in der DLS eingesetzt werden. In beiden Fällen liegen die gleichen Tetraplexe vor (vgl. Kapitel 5.7).

Im Einklang zu den Ergebnissen der DLS, den Modellrechnungen und der UV-Spektroskopie wurde bei der durchgeführten CGE ebenfalls ein intramolekularer Tetraplex des 24mers in 48mM NaCl detektiert.

Als Modellsequenzen für intermolekulare Tetraplexe wurden das 6mer und das 8mer untersucht und für die Verifizierung der Methodik eingesetzt. Der Vergleich der experimentell ermittelten Größen mit denen aus den Modellrechnungen unter Annahme einer intermolekularen tetrameren Struktur, lieferte eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Werte. Wie auch bei dem 15mer und 24mer (intramolekulare Tetraplexe) wurde für die zu berücksichtigende Wasserhülle d ein Wert von $285\text{pm} \pm 9\text{pm}$ ermittelt.

Für die Modellrechnungen sind damit sehr unterschiedliche Morphologien und Oberflächentopologien untersucht worden. Mit den intermolekularen Tetraplexen⁵¹ wurde für das 6mer eine Struktur gerechnet, die eine glatte Oberfläche (vgl. Abbildung 5.13-links) und hochsymmetrische Form (Zylinder) hat. Das 8mer weist auf Grund der endständigen Thymine schon eine deutliche Störung der Helixstruktur mit entsprechenden Unregelmäßigkeiten in der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche auf. Die mit je drei Loopbereichen stark gefalteten intramolekularen Tetraplexe des 15mers und 24mers sind deutlich tiefer zerklüftet und lassen sich nicht durch einfache geometrische Formen beschreiben (vgl. Abbildung 5.13-rechts).

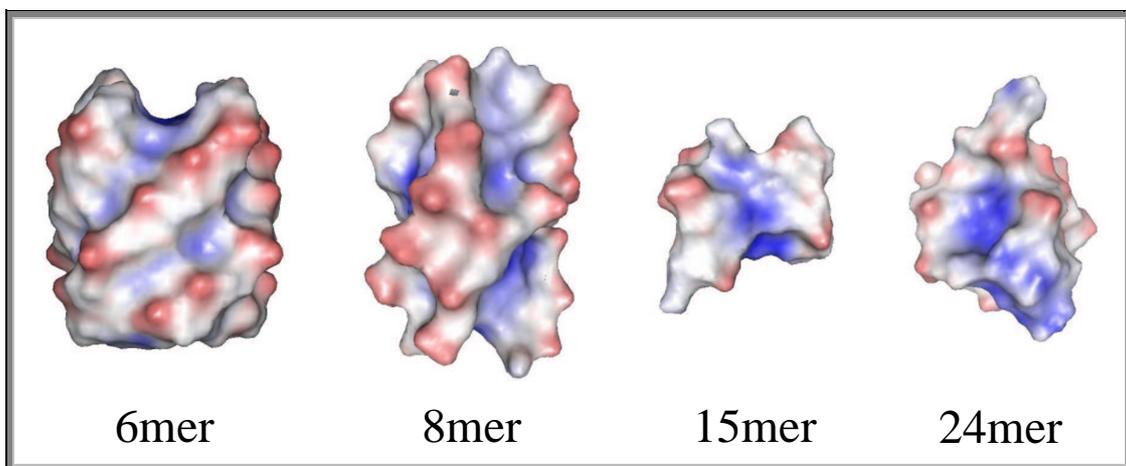


Abbildung 5.13 : Die Morphologie und die Oberflächentopologie von inter- und intramolekularen Tetraplexen. Links: 6mer und 8mer als tetramere Tetraplexe. Rechts: 15mer und 24mer als intramolekulare Tetraplexe. Einfärbung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche nach dem elektrostatischen Potential.

Mit diesem, für verschiedene Quadruplexmorphologien verifizierten konsistenten Bild bezüglich der Wasserhüllendicke, besteht für beliebige polymorphe G-DNA-Sequenzen und den

⁵¹ Die Struktur des 6mers ist auf Basis von NMR-Daten in Lösung generiert worden, die hier gezeigte Struktur des 8mers wurde MD-Simulationen [Kro00] entnommen.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

sich daraus bildenden Tetraplexen die Möglichkeit, hydrodynamische Größen zu berechnen und experimentelle Werte aus der Lichtstreuung exakt einzelnen definierten Strukturen zuzuordnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals unter physiologischen Bedingungen UV-spektroskopische Untersuchungen an tetrameren G-DNA-Strukturen durchgeführt. Hier konnte deutlich der Einfluss der Ionenart auf den Schmelzpunkt und damit die Stabilität der Tetraplexe gezeigt werden. Zudem wurde die besondere Stabilität des 6mers UV-spektroskopisch untersucht und dokumentiert. Das u.a. mit der Bildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken zwischen den 5'-endständigen Uracilbasen die beobachtete hohe Schmelztemperatur begründet werden muss, wird in Kapitel 5.6 und Kapitel 5.7 diskutiert.

In der CGE wurden ebenfalls erstmals Untersuchungen an tetrameren Tetraplexen unter physiologischen Rahmenbedingungen durchgeführt. Während beim 6mer eine sofortige Zuordnung zu einer definierten tetrameren Struktur möglich war, zeigten sich beim 8mer Aufspaltungen und eine erhebliche Verbreiterung des Signals im Elektropherogramm. Die dabei möglichen Einflüsse der Inkubationszeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff, möglicher syn-anti Isomere und/oder der Stabilität des Tetraplexes gegenüber der Interkalation kann hier nicht näher quantifiziert werden. Wird das 24mer noch in die Betrachtungen miteinbezogen, so ergeben sich folgende Möglichkeiten:

8mer und 24mer weisen, wie in Abbildung 5.13 gut zu erkennen, eine verschiedene elektrostatische Oberflächentopologie auf. 8mer und 6mer unterscheiden sich dann untereinander noch einmal sowohl in der „Rauhigkeit“ der Oberfläche, als auch in der Stabilität und Mobilität der Endbereiche, wobei zumindest eine zusätzliche versiegelte U-Ebene beim 6mer vorhanden ist. Zudem sind diese beiden Elektropherogramme von den entsprechenden Kaliumsystemen aufgenommen, was die Strukturen gegenüber dem 24mer stabilisiert. D.h. dass ein, wie YOYO interkalierender Farbstoff in der Reihenfolge 24mer » 8mer > 6mer eingelagert werden sollte. Der Vergleich der Abbildung 5.7 mit der Abbildung 5.12 zeigt diesen Effekt in der Signalhöhe und dem zugehörigen Integral sehr deutlich. Die mögliche Biorelevanz dieser Effekte wird in Kapitel 6 weiter ausgeführt.

Im Folgenden ist es nun möglich, die Methode der gezielten Auswertung komplementärer Informationen aus der dynamischer Streulichtspektroskopie, den hydrodynamischen Modellrechnungen, der UV-Spektroskopie und der Kapillargelelektrophorese zur Identifizierung der Tetraplexe polymorpher G-DNA zu verwenden. Dabei wird gerade die UV-Spektroskopie über die Charakterisierung des Schmelz- und Reaggregationsverhaltens weitreichende Aussagen zur Struktur ermöglichen (vgl. Kapitel 5.7). Ein kurzer Einblick wurde bei den intramolekularen Tetraplexen des 15mers und des 24mers gegeben (instantane Reaggregation bei intramolekularen Tetraplexen). Dieses ermöglicht, den für die Strukturbestimmung zugänglichen Konzentrationsbereich bis in den μM Bereich zu erweitern.

5.5 POLYMORPHE SEQUENZEN - INTER-/INTRAMOLEKULARE TETRAPLEXE

Die DNA-Sequenz $d[T_2G_4T_2G_4T_2]$, welche im Folgenden als 14mer bezeichnet wird, besitzt zwei G_4 -Bereiche, die durch eine T_2 -Einheit getrennt werden. Damit sind grundsätzlich zwei Tetraplexstrukturen möglich; eine Tetramere und eine hairpinähnliche Dimere (vgl. Abbildung 5.14-rechts). Durch die T_2 -Endeinheiten und die durch die Größe bedingten Scherkräfte der denkbaren Tetraplexe ist zudem davon auszugehen, dass eine Stapelbildung zwischen mehreren intermolekularen tetrameren Quadruplexen ausbleibt.

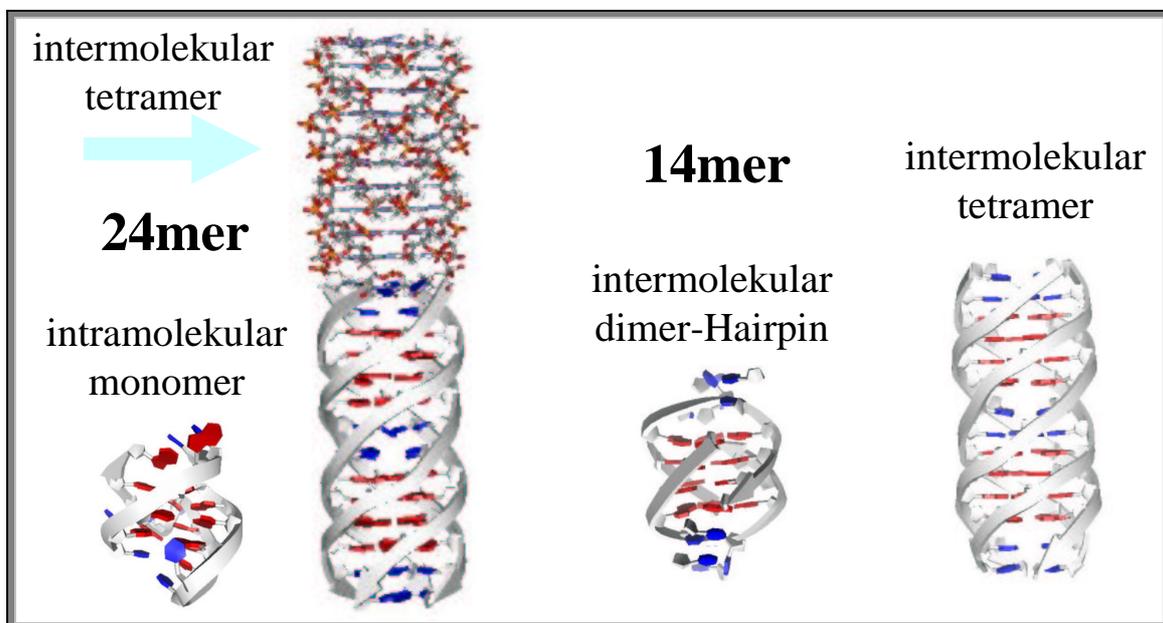


Abbildung 5.14 : Tetraplexstrukturen polymorpher G-DNA. Links: das 24mer (die dimer-Hairpin Anordnung des 24mers ist nicht abgebildet). Rechts: das 14mer (beim intermolekularen dimer-Hairpin ist die cross-Loop Konformation gezeigt).

Das 24mer mit der Sequenz $d[(T_2G_4)_4]$ kann auf Grund der sich wiederholenden G_4 -Einheiten Tetraplexe mit drei verschiedenen Stöchiometrien ausbilden. Neben dem in Kapitel 5.2 beschriebenen intramolekularen Tetraplex⁵² ist noch eine dimer-Hairpin und eine tetramere Struktur möglich (vgl. Abbildung 5.14). Da bei einer tetrameren Struktur bei parallelen Strän-

⁵² Drei T_2 -Loopbereiche in diesem intramolekularen Tetraplex sind zu gespannt. Daher entsteht unter Einbindung von Guaninbasen die in Abbildung 5.14 abgebildete Struktur mit nur drei G-Ebenen und drei TTG-Loops.

gen das 3' Ende des Tetraplexes direkt mit einer G-Ebene aufhört, ist eine *end-to-end*-Dimerisierung zweier Tetramereinheiten denkbar, welche bei den zu erwartenden Scherkräften wahrscheinlich nur bei tiefen Temperaturen stabil ist.

5.5.1 (T₂G₄)₄ - intramolekularer Tetraplex vs. intermolekularer tetramerer Tetraplex

Das 24mer wird in zwei verschiedenen Ionenstärken vermessen. Neben dem 48mM NaCl Ansatz, in dem nach Kapitel 5.2 ein intramolekularer Tetraplex vorliegt, wird die Konzentration auf 100mM NaCl mehr als verdoppelt.

Die Ergebnisse der dynamischen Streulichtspektroskopie sind in Abbildung 5.15 (Stokes-Einstein-Debye Plot) und in Anhang_Abb 3 (SE-Plot) gezeigt. Im Stokes-Einstein Plot (vgl. Abbildung 5.4 und Anhang_Abb 3) ist, wie in Kapitel 5.2 schon diskutiert, bei 48mM NaCl ideales SE-Verhalten bis zu einer Temperatur von ca. 45°C zu beobachten, was gleichzeitig der mittels der UV-Spektroskopie bestimmten Schmelztemperatur des intramolekularen Tetraplexes entspricht. Die Abweichungen darüber hinaus hängen ursächlich mit der Bildung eines nicht mehr so kompakt gefalteten und damit schnellen (Abweichung im SE-Plot nach unten – relativ zur Regressionsgeraden) „random coil“ Einzelstranges zusammen und wurden schon beim Aptamer beobachtet [Bol98].

In 100mM NaCl liegt eine Struktur vor, die sich mit $D_T^{20^\circ\text{C}} = 0.80 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ deutlich von der Spezies in 48mM NaCl ($D_T^{20^\circ\text{C}} = 1.36 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) unterscheidet.

In Abbildung 5.15 sind die temperaturabhängig ermittelten Relaxationszeiten aufgetragen. Mit $\tau_R^{20^\circ\text{C}} = 32.80\text{ns}$ ist die Rotationsrelaxationszeit des 24mers in 100mM NaCl fast um den Faktor zehn größer als in 48mM NaCl mit $\tau_R^{20^\circ\text{C}} = 3.40\text{ns}$. Dies weist auf eine massive Strukturänderung hin. Der Vergleich mit den hydrodynamischen Modellrechnungen zeigt, dass bei der geringeren NaCl-Konzentration ein intramolekularer Tetraplex vorliegt, wohingegen in 100mM NaCl eine gestreckte tetramere Struktur detektiert wird.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

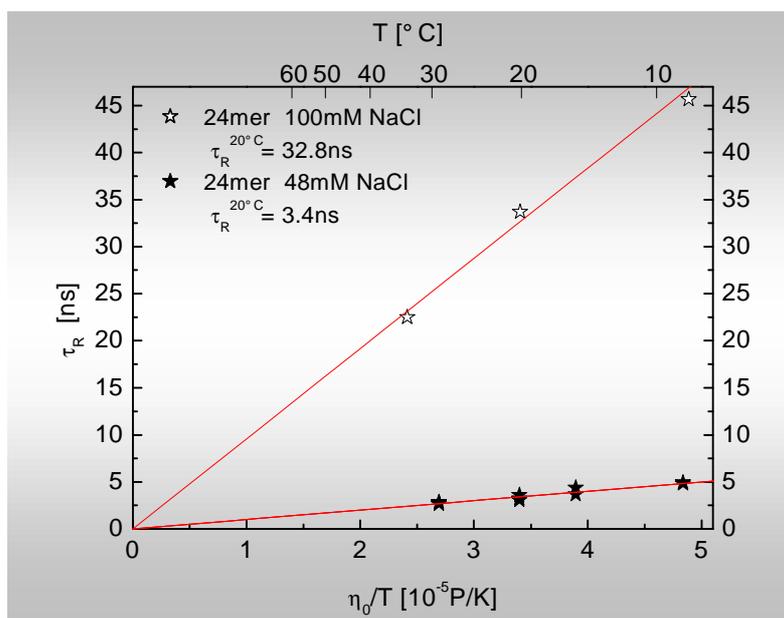


Abbildung 5.15 : Rotationsrelaxationszeiten des 24mers mit $c(\text{DNA}) = 0.65\text{mM}$. 48mM NaCl vs. 100mM NaCl.

In Tabelle 5.7 sind die entsprechenden Daten aufgeführt. In den Modellrechnungen wird dabei eine, der Sequenz nach mögliche, dimer-Hairpin Struktur mitberücksichtigt.

Strukturtyp des 24mers	Stöchiometrie	Experimentelle Werte		Modell ($d=285\text{pm}$)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
intramolekular	[24mer]	3.40	1.46 [48]	1.45	3.41
intermolekular, dimer	[24mer] ₂	-	-	1.16	9.50
intermolekular, tetramer	[24mer] ₄	32.80	0.80 [100]	0.85	31.50

Tabelle 5.7 : Vergleich der experimentellen Daten mit den theoretischen Werten des 24mers in intra- und intermolekularer Morphologie. dimer-Hairpin in cross-Loop Konformation. In [] die Konzentration an NaCl in der Lösung.

Es zeigt sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung der hydrodynamischen Modellrechnungen mit den experimentell ermittelten Größen⁵³. Zunächst ist eine mögliche Diversifikation zwischen einer rein intramolekularen und der tetrameren Struktur im Ansatz mit 48mM NaCl

zu diskutieren, für den Fall, dass nur ein Gleichgewicht zwischen den beiden Tetraplexen vorliegt.

In der Photonenkorrelationsspektroskopie müssten die Translationsbewegungen der intramolekularen Struktur von der tetrameren Spezies aufgelöst werden, da die zugehörigen Frequenzverteilungsfunktionen weit auseinander liegen (vgl. Inlay in Anhang_Abb 3). Zwei Prozesse werden aber nicht beobachtet. Auf Grund des Molekulargewichts und der damit verbundenen Streueigenschaften [Pec76] kann selbst die Existenz geringer Mengen des tetrameren Tetraplexes in der 48mM NaCl-Lösung ausgeschlossen werden.

In der depolarisierten Lichtstreuung wird bei der Vermessung des 24mers in 48mM NaCl ein 750MHz FPI verwendet, für den Ansatz mit 100mM NaCl sowohl ein 750MHz als auch ein 150MHz FPI. Der freie spektrale Bereich erlaubt in beiden Fällen zuverlässig die Detektion einer weiteren Spezies mit den für die dimer-Hairpin Struktur berechneten Rotationsrelaxationszeiten (vgl. Kapitel 4.1.2). Es werden keine Abweichungen im Spektrum beobachtet, die Rückschlüsse auf die parallele Existenz einer solchen dimer-Hairpin Anordnung zulassen. Damit kann auf Grund der Ergebnisse der depolarisierten Lichtstreuung die Entstehung einer dimer-Hairpin Struktur in beiden Systemen (48mM u. 100mM) weitestgehend ausgeschlossen werden (vgl. Anhang_Abb 8).

Wie groß der Anteil intramolekularer Tetraplexe in der 100mM NaCl Lösung ist, lässt sich mit der DLS nicht bestimmen. Das vierfach höhere Molekulargewicht und die große (optische) Anisotropie bedingen Streueigenschaften des tetrameren Tetraplexes, die zur Maskierung der deutlich kleineren und annähernd globulären intramolekularen Spezies führen.

Die UV-Spektroskopie liefert die komplementären Informationen zu diesem Problem der Koexistenz von intramolekularen und intermolekularen Quadruplexen in 100mM NaCl. Die Spektren zum intramolekularen Tetraplex in 48mM NaCl sind in Kapitel 5.2.2 ausführlich vorgestellt und diskutiert worden. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse der temperaturabhängigen Messungen zu beiden Systemen dargestellt. In dem 100mM NaCl Ansatz ist, wie in

⁵³ Die berechneten Größen einer hypothetisch möglichen dimer-Hairpin Struktur liegen in Bereichen, die apparativ (vgl. [Her98] [Nie96] und Kapitel 4.1.2) auflösbar sind, aber nicht detektiert werden, was, neben den Daten

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kapitel 5.7 deduziert, nur das Schmelzen der im Gleichgewicht mit der tetrameren Struktur vorliegenden rein intramolekularen Spezies zu beobachten. Dies wird durch die geringere Amplitude deutlich, die nur $\approx 3\%$ der Amplitude der rein intramolekularen Spezies (Spektrum in 48mM NaCl) beträgt. Die eigentlich vorherrschende tetramere Struktur ist mit den 16 stabilisierenden G-Ebenen zu stabil, um unter Normaldruck im wässrigen Medium geschmolzen zu werden. Dies wird durch den Vergleich zu den Daten des 8mers in 48mM und 100mM NaCl deutlich. In diesem spannungsfreien Tetraplex mit vier G-Ebenen liegt der Schmelzpunkt schon bei 53°C in 48mM NaCl und 55°C in 100mM NaCl. Dieser Vergleich ermöglicht es des Weiteren auszuschließen, dass das Schmelzen der dimer-Hairpin Struktur hier beobachtet wird. Diese dimere Anordnung sollte mit acht G-Ebenen ebenfalls einen deutlich höheren T_m -Wert aufweisen, als die hier detektierten 48.8°C.

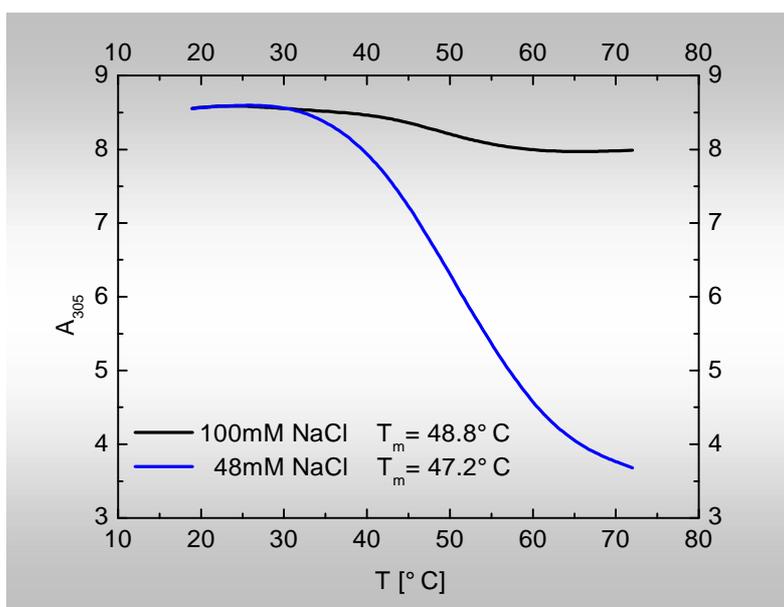


Abbildung 5.16 : Schmelzkurven 24mer in 48mM NaCl und 100mM NaCl. Die Kurven sind auf die DNA Konzentration normiert und die Amplitude des Systems in 100mM NaCl zur Visualisierung um Faktor vier verstärkt.

Mit den Elektropherogrammen der CGE (siehe Abbildung 5.17.) und den Daten aus der Lichtstreuung kann sicher von der alleinigen Existenz eines intramolekularen Tetraplexes in 48mM NaCl ausgegangen werden. Hierdurch ist es möglich, die auf die DNA-Konzentration normierte Amplitude des intramolekularen Tetraplexes zu bestimmen und mittels der Ampli-

der UV-Spektroskopie und der CGE, als ein weiteres Ausschlusskriterium für die Existenz dieser Spezies herangezogen werden kann.

tudenauswertung des 100mM NaCl Ansatzes, die Gleichgewichtslage zwischen den unterschiedlichen Stöchiometrien in dieser Lösung quantitativ zu bestimmen (vgl. Kapitel 5.7.4).

Die weiteren Untersuchungen mittels CGE sind in Abbildung 5.17 gezeigt. Neben dem schon in Kapitel 5.2.2 diskutierten Profil des 24mers in 48mM NaCl sind deutliche Laufzeitunterschiede zum 24mer in 100mM NaCl zu erkennen. Außer dem Hauptsignal bei ca. 15min ist ein erstes definiertes kleines Signal bei ca. 12min zu erkennen.

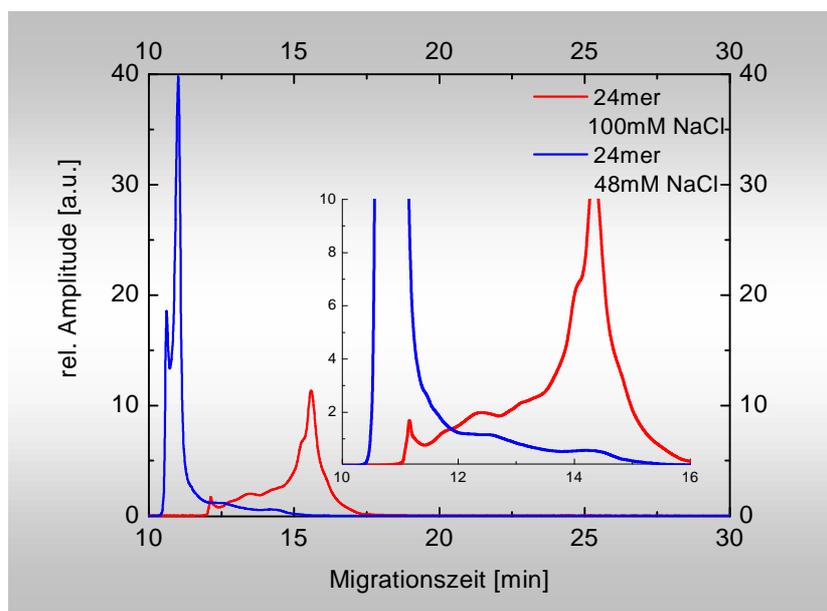


Abbildung 5.17 : Elektropherogramme des 24mers in 48mM und 100mM NaCl. Laufpuffer 100mM NaCl.

Dieses Signal ermöglicht auch ohne Marker einen direkten Vergleich der beiden Läufe. Aus der UV-Spektroskopie ist bekannt, dass geringe Mengen an intramolekularen Quadruplexen in 100mM NaCl vorhanden sind. Damit kann das erste Signal im 100mM NaCl System dieser Struktur zugeordnet werden und die Signallage auf das Maximum des 48mM NaCl Systems verschoben werden. Im Inlay der Abbildung 5.17-rechts oben wurden die beiden Läufe auf die Lage des Hauptsignals des 24mers in 48mM NaCl normiert⁵⁴. Auch jetzt zeigen sich zwei deutlich voneinander getrennte Fraktionen im Vergleich der beiden unterschiedlichen Ionenstärken.

⁵⁴ Laufzeitunterschiede von 0.5min bis 2min bei der gleichen Struktur aber unterschiedlichen Läufen sind möglich [Vos01] und legitimieren hier diese Vorgehensweise.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Weiterhin lässt sich die Signalform des 24mers in 100mM NaCl gut mit der tetrameren Struktur in Zusammenhang bringen. Signalbreite und „Schulterbildung“ bei ca. $t = 14\text{min}$ (vgl. Inlay Abbildung 5.17) wurden schon beim tetrameren Quadruplex des 8mers beobachtet und diskutiert. Da sich bei syn-anti Isomeren des 24mer-Tetraplexes Strukturen bilden, die asymmetrische Endbereiche aufweisen⁵⁵, kommt es zu einer zusätzlichen Signalverbreiterung/-unschärfe gegenüber dem Elektropherogramm des 8mers (vgl. Abbildung 5.12).

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Resultate beim 24mer die Existenz von zwei verschiedenen Strukturtypen bezüglich der Strangstöchiometrie in unterschiedlich konzentrierten Natriumchloridlösungen. In 48mM NaCl wird eine intramolekulare Tetraplexstruktur gebildet. Mit Erhöhung der Salzkonzentration findet eine Verlagerung des Gleichgewichtes hin zu einer intermolekularen tetrameren Spezies statt. Dies ist um so bemerkenswerter, als da die Umlagerung innerhalb eines bisher noch nicht beobachteten Konzentrationsbereichs zwischen 48mM und 100mM an NaCl erfolgt. Es ist jeweils von eindeutigen Gleichgewichtslagen auszugehen, bzw. wie noch in Kapitel 5.7 gezeigt wird, erlaubt die UV-Spektroskopie die quantitative Bestimmung der Gleichgewichtslage zwischen Tetraplexen unterschiedlicher Stöchiometrie.

Die Bedeutung, dass der Bereich, in dem die Umlagerung erfolgt, innerhalb durchaus physiologischen Randbedingungen liegt, wird in Kapitel 6 noch weiter diskutiert werden. Dass hier ein universelles Prinzip der Strukturbildung von Tetraplex aus polymorpher G-DNA vorliegt und erstmalig in Lösung unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen wurde, wird im folgenden Kapitel 5.5.2 am Beispiel des 14mers weiter ausgeführt.

5.5.2 $T_2G_4T_2G_4T_2$ – dimer-Hairpin Tetraplex vs. tetramerer Tetraplex

Die hier behandelte Sequenz $d[T_2G_4T_2G_4T_2]$ kann Tetraplexe mit zwei verschiedenen Stöchiometrien bilden. Neben einer gestreckten tetrameren Struktur mit insgesamt acht G-Ebenen, ist eine dimer-Hairpin Anordnung mit den beiden mittleren Thyminen im Loopbereich möglich (vgl. Abbildung 5.18).

⁵⁵ Das 8mer hat eine palindrome Sequenz $[Str99] d[T_2G_4T_2]$, d.h. parallele oder antiparallele Stranganordnung sind insgesamt gleichlang. Das 24mer $d[(T_2G_4)_4]$ ist bei antiparalleler Anordnung um zwei Thyminbasen länger,

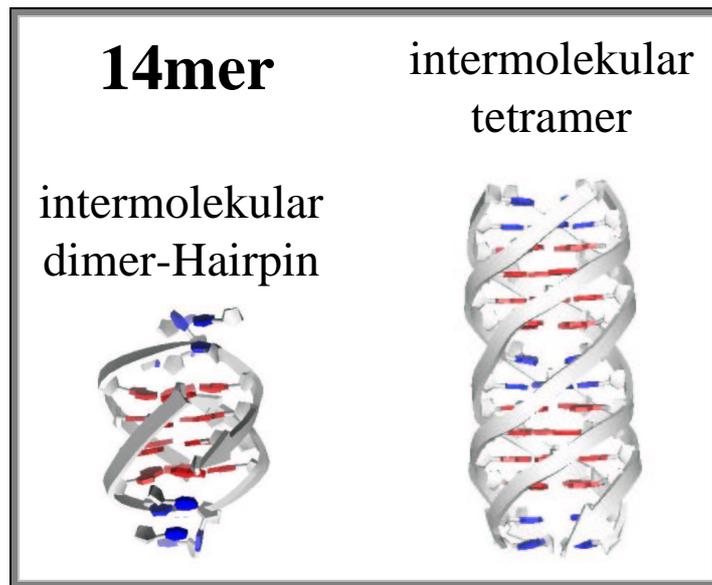


Abbildung 5.18 : Mögliche Tetraplexstrukturen der polymorphen Sequenz des 14mers. Links: Dimer-Hairpin in cross-Loop Konformation. Rechts: Intermolekularer tetramerer Tetraplex mit paralleler Stranganordnung.

Zusätzlich zu den Lösungsbedingungen mit $\approx 50\text{mM}$ und 114mM an NaCl (vgl. Kapitel 5.5.1), werden die Untersuchungen auf verschiedene Ionenarten, hier Kalium, ausgedehnt. Dabei werden vergleichbare Ionenkonzentrationen ($\approx 50\text{mM}$ bzw. $\approx 100\text{mM}$ an NaCl bzw. KCl) in den Proben eingestellt.

In Abbildung 5.19 sind die Ergebnisse der Natriumsysteme aus der dynamischen Lichtstreuung aufgetragen. In beiden Systemen (48mM und 114mM an NaCl) ist über den gesamten vermessenen Temperaturbereich mit beiden Messmethoden (PKS und DDLS) ideales Stokes-Einstein (Debye) Verhalten zu beobachten. Damit sind für das 14mer in 48mM NaCl in einem Temperaturbereich von 8°C bis ca. 33°C , in 114mM NaCl bis ca. 60°C keine Strukturänderungen (z.B. ein Schmelzen) zu detektieren.

Die ermittelten hydrodynamischen Größen des 14mers in 48mM NaCl unterscheiden sich signifikant von denen in 114mM NaCl. Ein Vergleich der experimentell bestimmten hydrodynamischen Größen mit ebenfalls durchgeführten Modellrechnungen ist in Tabelle 5.8 gezeigt. Die Gegenüberstellung belegt, dass sich zwei unterschiedliche Strukturen in Abhängigkeit von der Ionenstärke ausbilden. Demnach wird mit Hilfe der DLS in 48mM NaCl ein di-

was auch die Hydrodynamik und Farbstoffeinlagerung beeinflusst.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

mer-Hairpin Tetraplex detektiert, in 114mM NaCl entsprechend eine gestreckte tetramere Quadruplexstruktur.

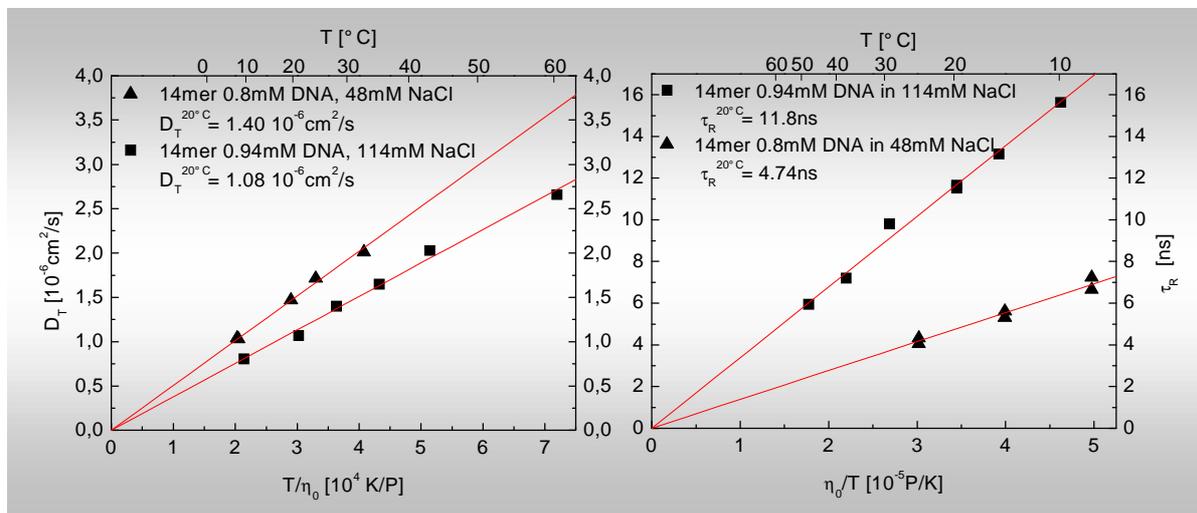


Abbildung 5.19 : Vergleich der DLS-Daten des 14mers in NaCl (48mM vs. 114mM). Links: Stokes-Einstein Auftragung der Translationsdiffusionskoeffizienten. Rechts: Stokes-Einstein-Debye Plot der Rotationsrelaxationszeiten.

Bei dem intermolekularen dimer-Hairpin sind mit einer parallelen, einer antiparallelen oder einer cross-Loop Konformation grundsätzlich drei Isomere denkbar, die den Modellrechnungen zufolge, auch andere hydrodynamische Eigenschaften aufweisen. Da die Unterschiede als gering einzustufen sind, ist eine Zuordnung anhand der DLS-Daten zunächst nicht eindeutig möglich, wird aber im Zusammenhang mit der ebenfalls durchgeführten UV-Spektroskopie (vgl. Kapitel 5.7) und den CGE Ergebnissen (s.u. Abbildung 5.21) noch diskutiert werden.

Strukturtyp des 14mers	Stöchiometrie	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
dimer-Hairpin	[14mer] ₂	4.74 [48]	1.40	1.37/1.34/1.39	4.74/4.95/5.05
Tetramer	[14mer] ₄	11.80 [114]	1.08	1.08	11.40

Tabelle 5.8 : Vergleich experimenteller Daten mit theoretischen Werten des 14mers in 48mM und 114mM NaCl. Modellwerte in cross-, paralleler und antiparalleler Loopgeometrie. In [] ist die Konzentration an NaCl in der Lösung angegeben.

Prinzipiell ist in beiden Systemen (48mM und 114mM an NaCl) ein Gleichgewicht zwischen dimerer und tetramerer Struktur mit jeweils unterschiedlicher Wichtung möglich.

In der depolarisierten Lichtstreuung wird bei der Vermessung des 14mers für beide Ansätze ein 750MHz FPI verwendet. Der freie spektrale Bereich ermöglicht in allen Fällen zuverlässig die gleichzeitige Detektion⁵⁶ beider Spezies. Da auf Grund der Streueigenschaften⁵⁷ schon geringe Mengen einer tetrameren Struktur die dimer-Hairpin Anordnung vollständig maskieren würden, kann in der 48mM NaCl Lösung von einer eindeutigen Gleichgewichtslage auf Seiten des dimer-Hairpins gesprochen werden. Hingegen ist auf Grund eben dieser Streueigenschaften der dimer-Hairpin Anteil in 114mM NaCl mittels Lichtstreuung nicht zu ermitteln. Hier bietet die UV-Spektroskopie eine sehr präzise und einfache Möglichkeit der quantitativen Analyse dieses Problems, wobei das komplexe Verhalten der unterschiedlichen Spezies in Kapitel 5.7 diskutiert wird.

Ein Beispiel für die zu den beiden Natriumsystemen durchgeführten UV-Messungen ist in Abbildung 5.20 aufgeführt. Die exemplarische Schmelz- und Assoziationskurve zeigt den sigmoidalen Kurvenverlauf der temperaturabhängig aufgenommenen Absorptionen des Schmelzprozesses ($T_m = 47.2^\circ\text{C}$). Die Absorptionen der Reaggregation zeigen ein Hystereseverhalten, wobei die Ausgangsabsorption nicht wieder erreicht wird.

Dass im Gegensatz zu den Schmelzkurven des intramolekularen Tetraplexes des 24mers eine Hysterese im Assoziationsverhalten vorliegt, deren Ausmaß konzentrationsabhängig ist (vgl. Kapitel 5.7), belegt, dass es sich bei dem Reaggregationsprozess um mindestens einen bimolekularen Mechanismus handeln muss.

⁵⁶ Für die eigentliche Bestimmung der Rotationsrelaxationszeiten ist die Anpassung an eine Summe aus zwei Lorenzfunktionen zu ungenau. Hierfür muss der freie spektrale Bereich variiert werden (vgl. Kapitel 4.1.2, [Pec76][Nie96]).

⁵⁷ Der tetramere Tetraplex streut deutlich stärker [Pec76] als die Dimere und wird daher auch bei Vorliegen geringer Mengen nicht von den anderen Quadruplexen maskiert.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

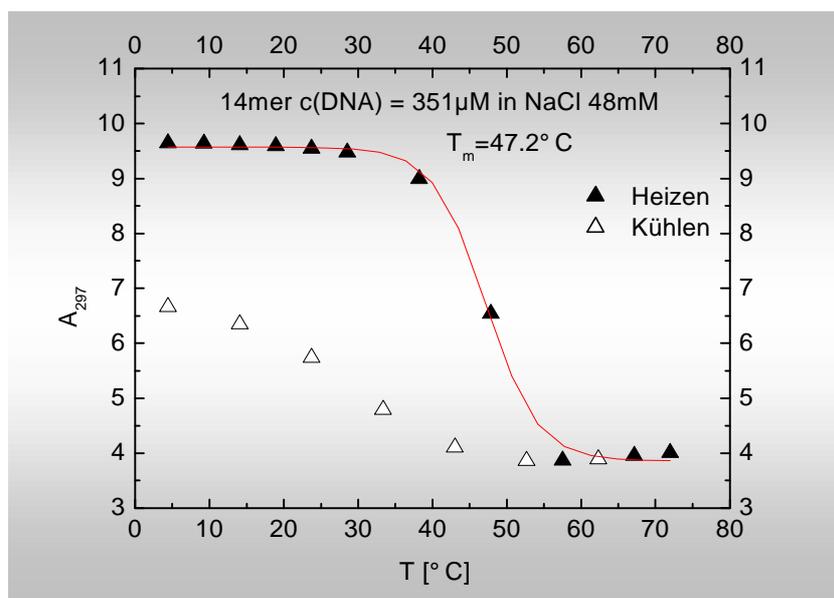


Abbildung 5.20 : Schmelz-(geschlossene Symbole) und Assoziationskurve (offene Symbole) des 14mer mit c(DNA) = 351 µM in 48mM NaCl.

Vergleicht man die Schmelztemperatur mit Referenzsystemen (vgl. Kapitel 5.3.2 und 5.6.2), so liegt die ermittelte Temperatur mit $T_m = 47.2^\circ\text{C}$ um 6°C niedriger als z.B. bei dem 8mer System $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2]$, das durch vier G-Ebenen stabilisiert wird. Daraus folgt, dass eine tetramere Anordnung für das 14mer in 48mM NaCl als Struktur ausscheidet, da mit den zu berücksichtigenden acht G-Ebenen die Schmelztemperatur deutlich höher liegen muss [Mer98]. Die beobachtete Abnahme von 53°C (8mer) auf 47.2°C (14mer) lässt sich mit der in einem dimer-Hairpin System vorhandenen Spannung⁵⁸ auf Grund der Loopbildung sehr gut begründen.

In 100mM NaCl liegt der Schmelzpunkt des 14mers bei 45.4°C . Dieser Wert befindet sich in dem, schon beim 24mer beobachteten Schwankungsbereich (vgl. Abbildung 5.16). Jedoch ist dieser Wert bei der Annahme, dass acht G-Ebenen geschmolzen werden, zu gering. Wie in Kapitel 5.7 dargestellt, wird nur die im Gleichgewicht vorhandene Hairpinstruktur detektiert. Die in der Lichtstreuung festgestellte tetramere Struktur ist zu stabil, um unter diesen Bedingungen in wässriger Lösung ein Schmelzverhalten zu zeigen (vgl. Kapitel 5.5.1 (24mer in 100mM NaCl)).

⁵⁸ Bei der Bildung von (cross-) Loop-Konformationen ist es möglich, dass eine Guaninbase mit in den Loopbereich eingebaut wird, das entstehende System dann aber nur drei G-Ebenen aufweist, was ebenfalls die dem 8mer gegenüber verringerte Schmelztemperatur begründet.

Von dem 14mer in 48mM NaCl wurde ein CGE-Lauf in 100mM NaCl-Laufpuffer durchgeführt. Das in Abbildung 5.21 gezeigte Elektropherogramm zeigt ein Hauptsignal mit einer Migrationszeit von ca. 12min. Dieses Signal weist eine gering ausgeprägte Feinaufspaltung auf. Vorgelagert, mit einer Migrationszeit von ca. 11min, liegt ein weiterer kleiner Peak. Der im Inlay vergrößerte Fuß ist wieder auf die eingesetzte DNA-Menge zurückzuführen, wobei die Ionenstärke des Laufpuffers (mögliche Umlagerung zu einer tetrameren Struktur) für das schwache Signal bei $t = 17\text{min}$ verantwortlich sein kann.

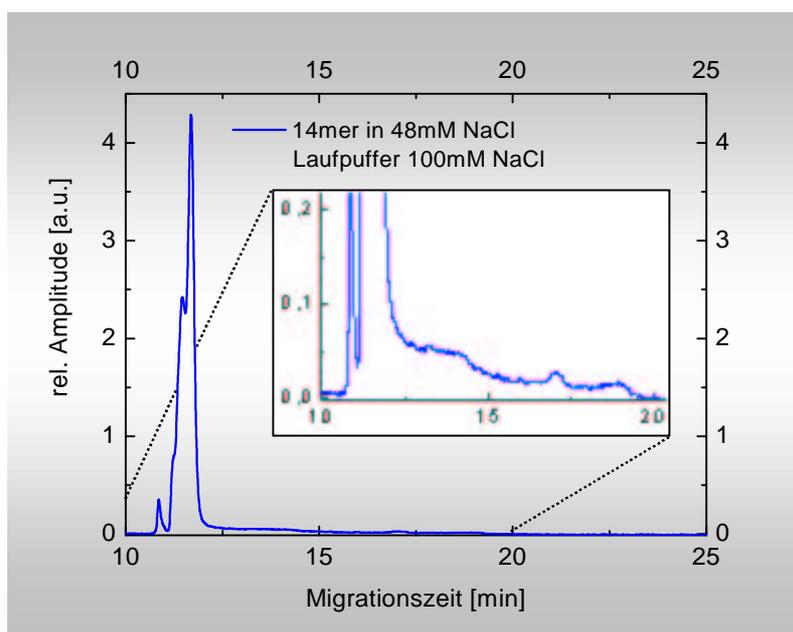


Abbildung 5.21 : Elektropherogramm des 14mers in 48mM NaCl. Laufpuffer 100mM NaCl. Das Inlay zeigt den Zeitbereich zwischen $t = 10\text{min}$ und $t = 20\text{min}$ vergrößert.

Betrachtet man das Hauptsignal, so sind neben den oben beschriebenen Effekten einer sukzessiven Farbstoffeinlagerung, die mit entsprechenden Laufzeitänderungen der unterschiedlich gesättigten Strukturen einhergeht, auch die möglichen Isomeren auf Grund verschiedener Loop-Konformationen als Ursache für die Aufspaltung, mehr noch für das Signal bei $t = 11\text{min}$, zu diskutieren.

Zunächst ist festzuhalten, dass das ermittelte Elektropherogramm in Einklang mit dem in der DLS und der UV-Spektroskopie detektierten dimer-Hairpin steht. Eine ebenfalls denkbare tetramere Tetraplexstruktur kann damit in 48mM NaCl weitgehend ausgeschlossen werden.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Aufspaltung des Profils mit einer Bewertung bezüglich möglicher Loop-Konformationen wird bei der Diskussion des 14mers in einem Kaliumsystem eingegangen. Das System 14mer in 100mM NaCl wird nicht weiter untersucht, da die Probe zum Zeitpunkt der CGE-Messungen nicht mehr zur Verfügung stand und schon mittels UV-Spektroskopie die Gleichgewichtslage zwischen dimer-Hairpin und tetrameren Quadruplex untersucht worden ist.

Damit folgt aus der Kombination der Ergebnisse aus der dynamischen Streulichtspektroskopie, Kapillargelelektrophorese, Modellrechnungen und wie in Kapitel 5.7 ausführlich gezeigt der UV-Spektroskopie, dass in einer NaCl-Lösung das 14mer in Abhängigkeit von der Ionenstärke in unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Dabei wird in 48mM NaCl eine dimer-Hairpin Struktur detektiert, in 114mM NaCl ein tetramerer Tetraplex im Gleichgewicht mit einer dimeren Spezies.

Im Folgenden wird das 14mer in einem Kaliumchlorid/TE-Puffersystem (55mM und 119mM an KCl) aufgenommen und vermessen. Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Lichtstreuungsmessungen sind in Abbildung 5.22 gezeigt.

In der Abbildung 5.22-links ist bei dem 55mM KCl-System bis zu einer Temperatur von 45°C ideales Stokes-Einstein Verhalten zu erkennen. Darüber hinaus kommt es zu Abweichungen, die auf eine temperaturbedingte Veränderung der Struktur hinweisen. Da derartige Veränderungen mittels der UV-Spektroskopie mit geringerem (Zeit-)Aufwand analysiert werden können, wird bei der Messreihe in 119mM KCl auf die DLS-Untersuchung oberhalb von 45°C verzichtet, darunter ist ebenfalls ideales SE-Verhalten zu beobachten. In der Stokes-Einstein-Debye Auftragung (vgl. Abbildung 5.22-rechts) sind in dem vermessenen Temperaturbereich keine systematischen Abweichungen von einer Ursprungsgeraden festzustellen. Die Unterschiede im Translationsdiffusionskoeffizienten D_T zwischen den beiden Systemen in der Photonenkorrelationsspektroskopie liegen innerhalb des maximalen Fehlerbereiches von $\pm 4\%$. In der Interferometrie sind jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Systemen bezüglich der gemessenen Rotationsrelaxationszeiten festzustellen (Abbildung 5.22-rechts). Diese geben Anlass, die Daten für die Translation ebenfalls einer weitergehenden Auswertung und Deutung zu unterziehen.

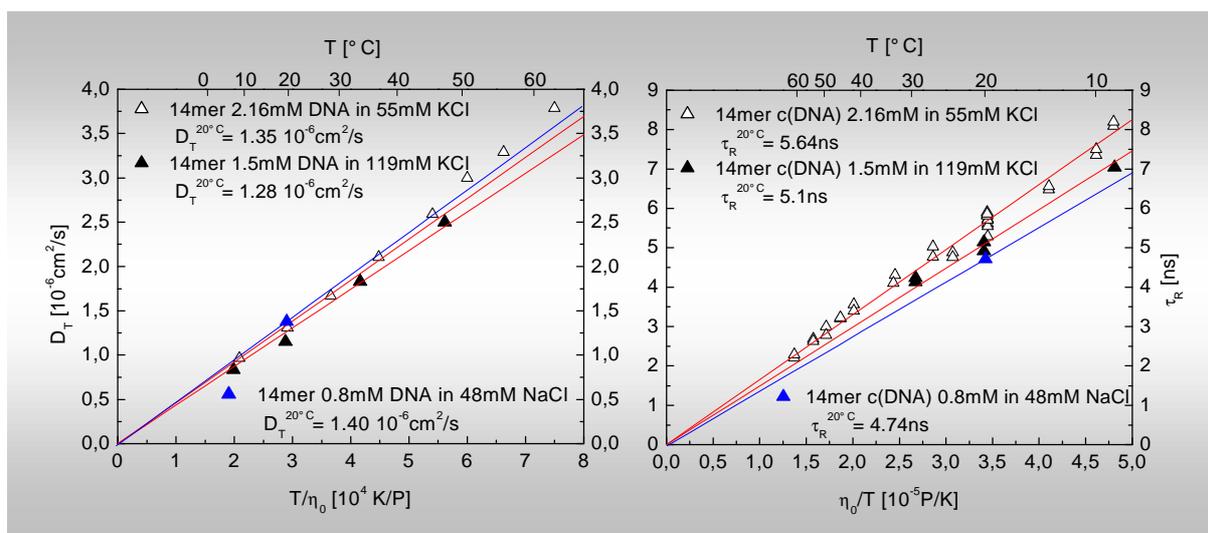


Abbildung 5.22 : Vergleich der DLS-Daten des 14mers in KCl (55mM vs. 119mM). Als Bezugspunkte dienen Daten des 14mers in 48mM NaCl (blau). Links: Stokes-Einstein Auftragung der Translationsdiffusionskoeffizienten. Rechts: Stokes-Einstein-Debye Plot der Rotationsrelaxationszeiten.

Prinzipiell sind Veränderungen in der Morphologie bei Tetraplexen stark kinetisch gehemmt [Bol98][Wil94]. Die Probe mit 119mM KCl wird aus der Probe mit 55mM KCl durch Zusatz einer konzentrierten KCl-Lösung und anschließender Filtration präpariert. Auf Grund des während der KCl Zugabe in der Lösung vorhandenen Konzentrationsgradienten bezüglich der KCl- und der DNA-Konzentration (vgl. Kapitel 4.2.1) muss von der Bildung weiterer, z.T. unspezifischer Tetraplexstrukturen, ausgegangen werden [Eim92][Bol98]. Die Translationsdiffusionskoeffizienten dieser Strukturen können zunächst nicht aufgelöst werden, so dass die CONTIN-Analyse einen gemittelten Diffusionskoeffizienten ergibt. Da nach der temperaturabhängigen Messreihe in der PCS eine weitere Messung bei 20°C eine deutliche Verschiebung der Messwerte in Richtung einer definierten, wie in 55mM KCl detektierten Struktur ergibt⁵⁹, ist davon auszugehen, dass vorher ein metastabiles Gleichgewicht zwischen verschiedenen Spezies bestand. Durch die, einem Tempren ähnlichen Bedingungen während der temperaturabhängigen Messungen, wurden die Verhältnisse in Richtung dimer-Hairpin Struktur neu eingestellt. In Abbildung 5.23 sind die Frequenzverteilungsfunktionen der CONTIN-Analyse vor und nach der temperaturabhängigen Messreihe gezeigt.

⁵⁹ $1.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, Wert in Tabelle 5.9 *fett-kursiv*.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

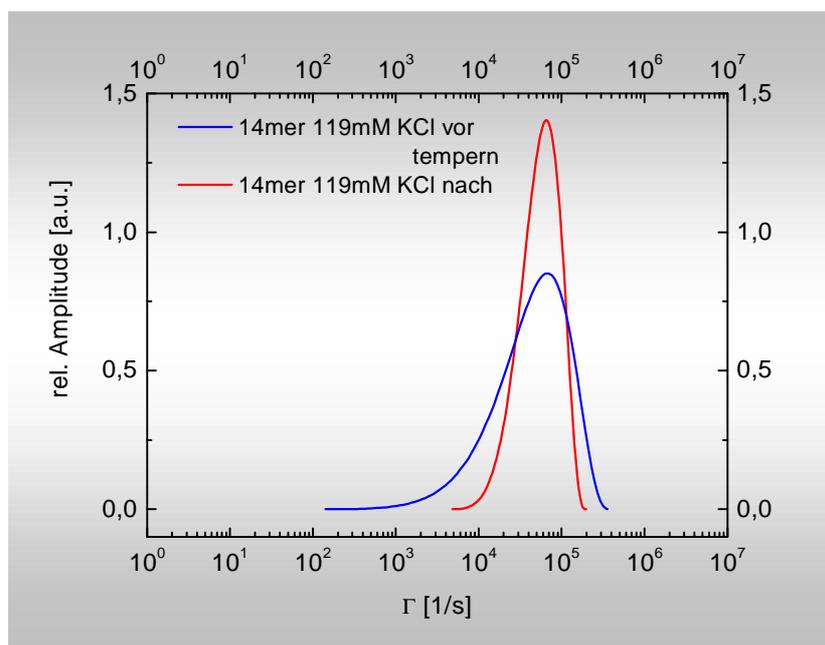


Abbildung 5.23 : Frequenzverteilungsfunktionen des 14mers in 119mM KCl. Gezeigt sind die Ergebnisse der CONTIN-Analyse direkt vor und nach der temperaturabhängigen Messreihe.

Nach dem Tempnern ist die Frequenzverteilungsfunktion deutlich schmaler, der ermittelte apparente Translationsdiffusionskoeffizient mit $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ gegenüber $1,28 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ vor dem Tempnern signifikant schneller. Dieses für Tetraplexe typische Verhalten wurde bereits in [Bol98] und [Nie96] ausführlich beschrieben und zeigt in diesem speziellen Fall den Einfluss der Probenpräparation und der Versuchsdurchführung auf die Messergebnisse.

Die anschließenden DDLS-Messungen zur Bestimmung der Rotationsrelaxationszeiten bestätigen die Gleichgewichtslage auf Seiten der dimer-Hairpin Struktur, da auf Grund der höheren Sensitivität dieser Messmethode für größere anisotrope Strukturen, diese beim Vorliegen signifikanter Mengen mit Sicherheit detektiert worden wären. Eine Gegenüberstellung der experimentell bestimmten hydrodynamischen Größen mit entsprechenden Modellrechnungen (vgl. Tabelle 5.9) zeigt, dass sowohl in 55mM als auch in 119mM KCl eine dimer-Hairpin Struktur vorliegt, wobei die absolute Loopkonformation hier nicht aufgelöst werden kann.

Strukturtyp des 14mers	Stöchiometrie	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ C}$ [$10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ C}$ [$10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
dimer-Hairpin	[14mer] ₂	5.64 [55]	1.35 [55]	1.37/1.34/1.39	4.74/4.95/5.05
		5.10 [119]	1.28/ 1.40 [119]		
tetramer	[14mer] ₄	-	-	1.08	11.40

Tabelle 5.9 : Vergleich experimenteller Daten mit theoretischen Werten zum 14mer in 55mM und 119mM KCl mit Modellrechnungen. In [] ist die Konzentration an KCl in der Lösung angegeben, Modellwerte in cross-, paralleler und antiparalleler Hairpinanordnung.

Auszüge der ebenfalls zu beiden Kaliumsystemen durchgeführten UV-Messungen sind in Abbildung 5.24 gezeigt. Das komplexe Verhalten der unterschiedlichen Spezies wird in Kapitel 5.7 diskutiert. Die in Abbildung 5.24 exemplarisch abgebildete Schmelz- und Assoziationskurve zeigt den sigmoidalen Kurvenverlauf der temperaturabhängig aufgenommen Absorptionen des Schmelzprozesses ($T_m = 76.0^\circ\text{C}$). Nach hystereseeähnlichem Kurvenverlauf der Absorptionen während der Aggregation wird die Ausgangsabsorption erreicht. Da in tetrameren Referenzsystemen (vgl. Kapitel 5.3.2) bei vier stabilisierenden G-Ebenen in Kalium kein Schmelzen zu beobachten ist, und dieser Trend bei acht G-Ebenen, also einer hypothetisch möglichen tetrameren Anordnung noch stärker ausfallen muss, ist die Schmelztemperatur nur mit einer gespannten dimeren Hairpinanordnung zu erklären. Das Assoziationsverhalten (hystereseeähnlicher Verlauf der Absorptionen) spricht, wie auch schon bei den Natriumsystemen, für einen mindestens bimolekularen Mechanismus.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

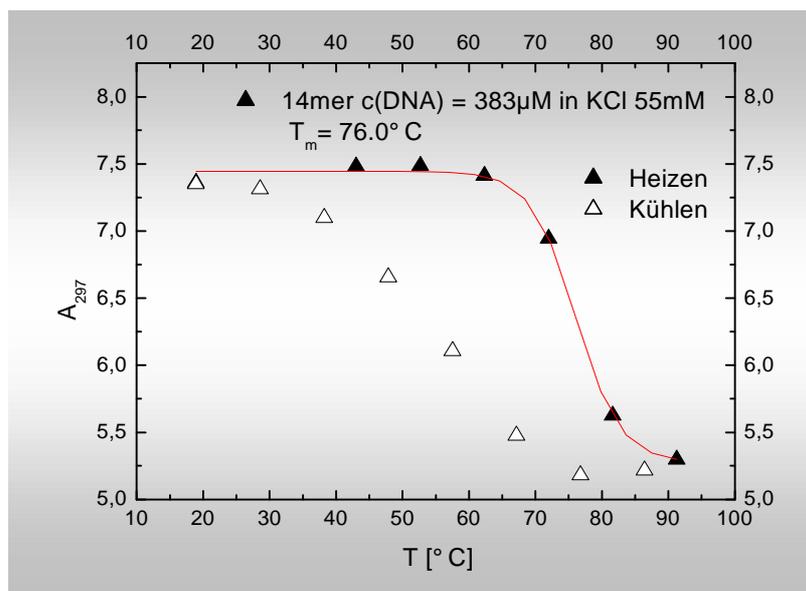


Abbildung 5.24 : Schmelz-(geschlossene Symbole) und Assoziationskurve (offene Symbole) des 14mer mit $c(\text{DNA}) = 383\mu\text{M}$ in 55mM KCl.

In 100mM KCl beträgt die Schmelztemperatur des 14mers $78,9^\circ\text{C}$ und liegt damit in dem, schon beim 24mer und 14mer in NaCl beobachteten Schwankungsbereich (vgl. Abbildung 5.15), wobei die Amplitude normiert auf die DNA-Konzentration mit der in 55mM KCl vergleichbar ist (vgl. Abbildung 5.42). Dies lässt den Schluss zu, dass in beiden Ionenstärken die gleiche Anzahl an G-Ebenen, normiert auf die Einzelstrangkonzentration, schmelzen. Damit kann, anders als in 114mM NaCl, die Existenz einer tetrameren Tetraplexstruktur in 119mM KCl ausgeschlossen werden.

In Abbildung 5.25 sind die Ergebnisse der CGE denen der DLS gegenübergestellt. Links ist neben dem bereits diskutierten Profil des 14mers in 48mM NaCl, das Profil des 14mers in 119mM KCl normiert auf den ersten Peak des 48mM NaCl-Systems gezeigt. Die Ausschnittsvergrößerung präsentiert die Übereinstimmung der ersten drei Maxima, wobei im Kaliumsystem insgesamt eine deutliche Verbreiterung zu erkennen ist. Zudem wird ein weiteres Maximum bei einer Migrationszeit von ca. $12,5\text{min}$ aufgelöst. Die Integrale der Profile unterscheiden sich deutlich. Die Proben wurden gleichlang dem Fluoreszenzfarbstoff ausgesetzt, so dass die Inkubationszeit nicht als Begründung für die unterschiedlich detektierten DNA-Mengen (entsprechend den Integralen) herangezogen werden kann. Die DNA-Konzentration in dem Natrium-System ist dabei mit $c(\text{DNA}) = 0,8\text{mM}$ fast halb so hoch wie im Kaliumsys-

tem mit $c(\text{DNA}) = 1.5\text{mM}$. Die Integrale verhalten sich jedoch umgekehrt proportional⁶⁰, ein Effekt, der auf die stärkere Stabilisierung durch das Kalium zurückzuführen ist. Die relativen Peakhöhen der ersten drei Maxima der beiden Systeme verhalten sich ähnlich, was für ein vergleichbares relatives Verhalten bezüglich der Einlagerung des Farbstoffes und/oder vergleichbarer Anteile verschiedener Loopkonformationen spricht.

Die Elutionsprofile der Kapillargelelektrophorese zeigen eine gute Kohärenz mit den Daten aus der dynamischen Lichtstreuung. Das deutlich breitere Laufprofil des Kaliumsystems in der CGE, sowie der zusätzlich detektierte Peak bei 12.5min („langsamere“ Struktur) korreliert mit der breiten und zu längeren Zeiten asymmetrischen Frequenzverteilungsfunktion der CONTIN-Analyse der DLS. Mit diesem Befund lassen sich auch die unterschiedlichen hydrodynamischen Größen, die in der DLS ermittelt wurden, mit der CGE erklären. Zusätzlich wird die Präzision der DLS-Messungen, gerade der FABRY-PEROT Interferometrie, bestätigt und die Diskussionswürdigkeit der detektierten geringfügigen Unterschiede in den Transportgrößen des 14mers in Natrium und Kalium belegt (vgl. Tabelle 5.8 u. Tabelle 5.9).

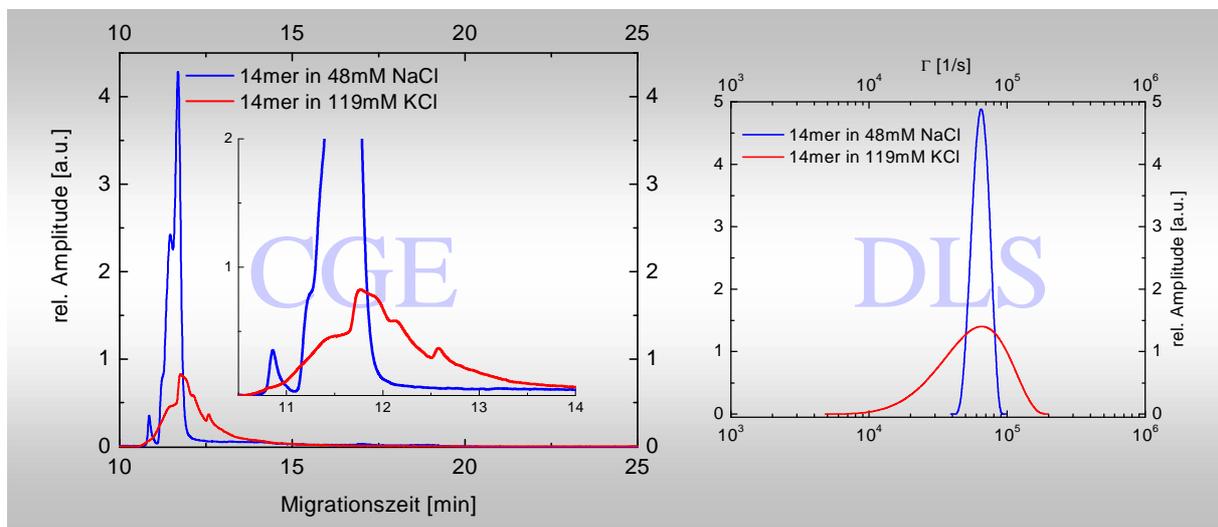


Abbildung 5.25 : Elektropherogramme und Frequenzverteilungsfunktionen des 14mers in 48mM NaCl und 119mM KCl.

⁶⁰ Die Integrale unterscheiden sich um den Faktor drei. Bezieht man die DNA-Konzentration mit ein, so ergibt sich ein Faktor sechs. Damit ist die detektierte DNA-Menge im Kaliumsystem um Faktor sechs zu niedrig. Hiermit liegt eine signifikante Differenz vor, da Schwankungen auf Grund der geringfügig variierenden Injektionsmenge deutlich geringer ausfallen ($\pm 10\%$ [Vos01]).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter Berücksichtigung der aus den verschiedenen Messmethoden gewonnenen Daten liegt damit in den Kaliumsystemen immer eine dimere Hairpin Struktur vor.

5.5.3 Zusammenfassung

In den beiden vorhergehenden Kapiteln wurden zwei Modellsysteme für polymorphe G-DNA mittels komplementärer Untersuchungsmethoden charakterisiert. Es wurde sowohl die Anzahl der Guanin-reichen Bereiche innerhalb der Sequenzen, als auch die Art und Konzentration der zugesetzten Kationen variiert.

Bei dem 24mer waren dabei kombinatorisch drei Stöchiometrien bezüglich der Einzelstränge denkbar. Eine rein intramolekulare globuläre Anordnung, eine dimer-Hairpin und eine rein intermolekulare tetramere Tetraplexstruktur. Erstere konnte in 48mM NaCl Lösung, letztere in 100mM NaCl nachgewiesen werden. Die dimer-Hairpin Anordnung war mit den vorliegenden Daten auszuschließen (vgl. Anhang_Abb 8 und Kapitel 6).

Das 14mer mit nur zwei Guanin-reichen Sequenzabschnitten war in der Lage, eine dimer-Hairpin und eine langgestreckte tetramere Quadruplexstruktur zu bilden. In KCl war dabei sowohl in dem 55mM als auch in dem ≈ 100 mM Ansatz nur eine dimer-Hairpin Struktur präsent, wohingegen in NaCl sich in 114mM der tetramere Tetraplex ausbildete. Bei einer Salzkonzentration von 48mM an NaCl wurde, wie in KCl, nur die dimer-Hairpin Struktur detektiert.

Auf die UV-spektroskopische Analyse der Gleichgewichtslagen zwischen polymorphen Tetraplexen wurde hier nur eine kurze Übersicht über den bisherigen Erkenntnisstand gezeigt. Ausführliche, auch thermodynamische Betrachtungen werden in Kapitel 5.7 diskutiert.

In Abbildung 5.26 sind die vermessenen Systeme und die detektierten Morphologien als Schaubild präsentiert. Die Strukturinformation des 24mers in ≈ 50 mM KCl ist [Wan94] entnommen.

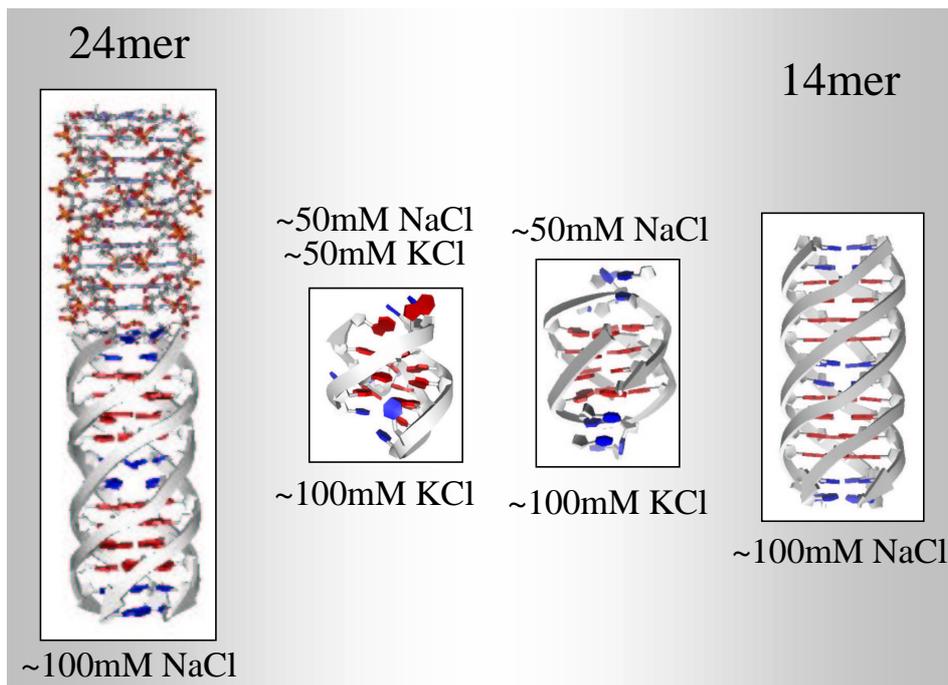


Abbildung 5.26 : Abhängigkeit der Struktur von der Ionenart und Ionenstärke bei den Modellsequenzen des 24mers und des 14mers. Beim 14mer ist nur die cross-Loop Konformation gezeigt.

Als genereller Trend zeichnete sich die Stabilisierung tetramerer Tetraplexe in hohen Ionenstärken (NaCl-Systeme) ab, wohingegen in den $\approx 50\text{mM}$ -Systemen eine stark gefaltete dimer-Hairpin Struktur (14mer) oder ein rein intramolekularer Tetraplex (24mer) vorlag. Dabei konnte bei den niedrigen Ionenstärken auf Grund der Ergebnisse der CGE von einer eindeutigen Gleichgewichtslage auf Seiten der gefalteten Spezies ausgegangen werden.

Nicht nur die Ionenstärke, sondern auch die Ionenart ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung polymorpher Tetraplexe, was bei dem 14mer in 100mM KCl deutlich wurde. Sowohl in 50mM als auch in 100mM KCl bildeten sich dimer-Hairpin Quadruplexe aus. Im Natriumsystem lagen unter gleichen Bedingungen unterschiedliche Tetraplexe vor. Gleichzeitig variierten die Rotationsrelaxationszeiten des 14mers in Abhängigkeit von der Konzentration der Kaliumkationen, was auf unterschiedliche Konformationen der endständigen Thyminbasen, wenn nicht sogar der Loop-Bereiche hindeutete.

Damit wird die Charakterisierung polymorpher G-DNA unter physiologischen Bedingungen durch die Kombination der Ergebnisse aus polarisierter und depolarisierter dynamischer

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Streulichtspektroskopie, Kapillargelelektrophorese einerseits und hydrodynamischen Modellrechnungen andererseits zunächst abgeschlossen. Die weitergehenden Möglichkeiten der UV-Spektroskopie werden wie auch die Diskussion der thermodynamischen Daten in Kapitel 5.7 vorgestellt.

In den vorhergehenden Kapiteln ging es ausschließlich um die Analyse von polymorphen Quadruplexstrukturen jeweils einer Sequenz. In diesem Zusammenhang konnte eindrucksvoll der Synergismus der Messverfahren dokumentiert werden. Im Folgenden sollen nun die Erkenntnisse auf die Erforschung supramolekularer Strukturen angewendet werden, wobei verschiedene Sequenzen als Mischung vermessen werden.

5.6 SUPRAMOLEKULARE STRUKTUREN

Wie in Kapitel 2.2 aufgezeigt, handelt es sich bei supramolekularen Strukturen um hochgeordnete Konstrukte, die dreidimensionalen Netzwerken maßgeschneiderter Morphologie entsprechen. Die Grundüberlegung bei der Generierung dieser Gebilde aus Guanin-reichen DNA-Sequenzen ist, dass, im Gegensatz zur ausschließlichen Verwendung doppelhelikaler DNA [See97], durch die Verwendung von doppelhelikal-funktionalisierter G-DNA deutlich mehr stabile Bauelemente zur Verfügung stehen.

Die erhöhte Anzahl an Bauelementen beruht dabei nicht nur auf der strikten, sequenzbedingten Trennung von Knotenpunkten (viersträngige Tetraplexe) und Verbindungselementen (doppelhelikale DNA). Vielmehr erlauben die Tetraplexe wegen ihrer hohen Symmetrie eine feine Abstufung der Länge (Anzahl repetetiver G-Ebenen) der Knotenbereiche. So liegen nach nur drei G-Ebenen ($3 \cdot 30^\circ$ Drehung) die 5'Anfangs und 3'Endpunkte (während der ersten 270° von verschiedenen Einzelsträngen) exakt übereinander (vgl. Abbildung 5.27, bei B-DNA alle zehn Ebenen [Str99]). D.h., dass nur vier G-Ebenen als symmetrischer Knotenpunkt ausreichen, bzw. die Länge des Knotenpunktes in 1.02nm-Schritten variiert werden kann.

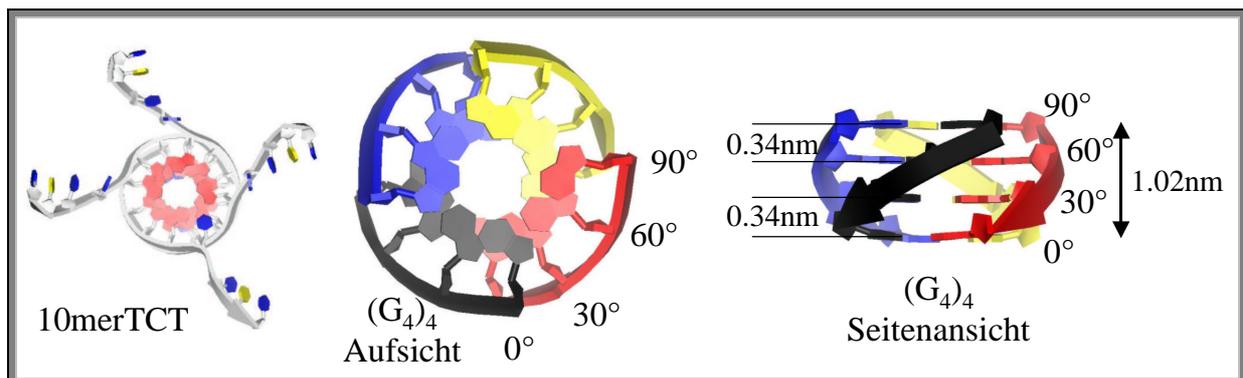


Abbildung 5.27 : Links: Aufsicht auf die funktionalisierte G-DNA $d[T_2G_4TTCT]$ (10merTCT). Mitte: Aufsicht auf einen Knotenpunkt mit vier aufeinanderfolgenden G-Ebenen. Rechts: Seitenansicht mit Abstand der G-Ebenen untereinander.

Gleichzeitig beinhaltet dieser Ansatz auch eine Fülle von Möglichkeiten für die knotenpunktverbindenden, doppelhelikalen Bereiche. Deren Länge, Basensequenz und einhergehend die

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Temperaturstabilität dieser Abschnitte lassen sich frei wählen. Die Einschränkungen, dass stabile Holliday-Junctions oder Superspiralisierung durch die Sequenzwahl erreicht werden muss [See97][See98][Str99][Leh94][Voe95] um die Ausbildung von Knoten umzusetzen, entfällt. Damit lassen sich problemlos Sequenzabschnitte für den doppelhelikalen Bereich wählen, die z.B. leicht von B-DNA in Z-DNA Konformation und zurück wechseln (alternierende CG-Sequenzen [Voe95][Str99]). Da sich dieser Wechsel u.a. in einer erheblichen Längenvariation niederschlägt, wäre dies eine Möglichkeit, die Struktur in Abhängigkeit der Umgebungsparameter (hier: Ionenstärke, vgl. [Eim93]) dynamisch zu beeinflussen, quasi ein „atmen“ des Konstruktes zu ermöglichen.

Die Schmelztemperaturen von Tetraplexen (Knotenpunkte) und den tetraplexverbindenden Duplexbereichen unterscheiden sich i.a. bei gleicher Ionenstärke. Zusätzlich lässt sich noch durch die Wahl der Basensequenz (doppelhelikaler Bereich) und/oder der Anzahl der G-Ebenen (Knotenpunkt) das dynamische Verhalten gezielt auf den Einsatzzweck ausrichten.

Durch den Einsatz der vorangehend spezifizierten *polymorphen Sequenzen* (vgl. Kapitel 5.5) ist es denkbar, supramolekulare Konstrukte aufzubauen, die in Abhängigkeit von der Ionenart verschiedene Morphologien aufweisen. Wie in Kapitel 5.5.1 gezeigt, ist ein solcher Strukturwechsel durch Variation der Ionenstärke (48mM NaCl vs. 100mM NaCl) möglich, wenn z.B. Analoga der Sequenz des 24mers für die Knotenpunkte eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst die prinzipielle Umsetzbarkeit des G-DNA CORE – B-DNA JUNCTION Konzeptes beleuchtet werden. Ausgehend von den in Kapitel 5.3 charakterisierten intermolekularen Tetraplexen, wird die Sequenz $d[T_2G_4T_2]$ für den Core-Bereich ausgewählt, da hier nur eine intermolekulare Tetraplexform möglich ist, was zunächst die Analytik stark vereinfacht.

Unter Berücksichtigung der Arbeiten von [Kro00] und [See97] wird die Sequenz dahingehend modifiziert, dass am 3'-Ende T_2 gegen TTCT bzw. TAGA ausgetauscht wird. Auf Grund der in [Kro00] beobachteten hohen Flexibilität der T_2 -Gruppe (3'-endständigen Thymin) und der von [See97] publizierten möglichen Verwindung bei der Paarung selbstkomplementärer Sequenzen während der Bildung von Netzwerken aus B-DNA, sollte es möglich sein, dass es zur Ausbildung von Duplexstrukturen zwischen den Tetraplexen kommt. Da nur das 3'-Ende

funktionalisiert wird und die Bildung von parallelen Doppelhelices thermodynamisch und kinetisch gehemmt ist [Tai98], sind die Möglichkeiten für die Aggregation der Tetraplexe weiter eingeschränkt. Durch diesen Gedankenansatz ist ausschließlich⁶¹ eine *end-to-end* Annäherung der Tetraplexe bei der Ausbildung der Doppelhelices möglich. In Abbildung 5.28 ist eine Übersicht über die verwendeten Sequenzen und die Projektplanung gezeigt.

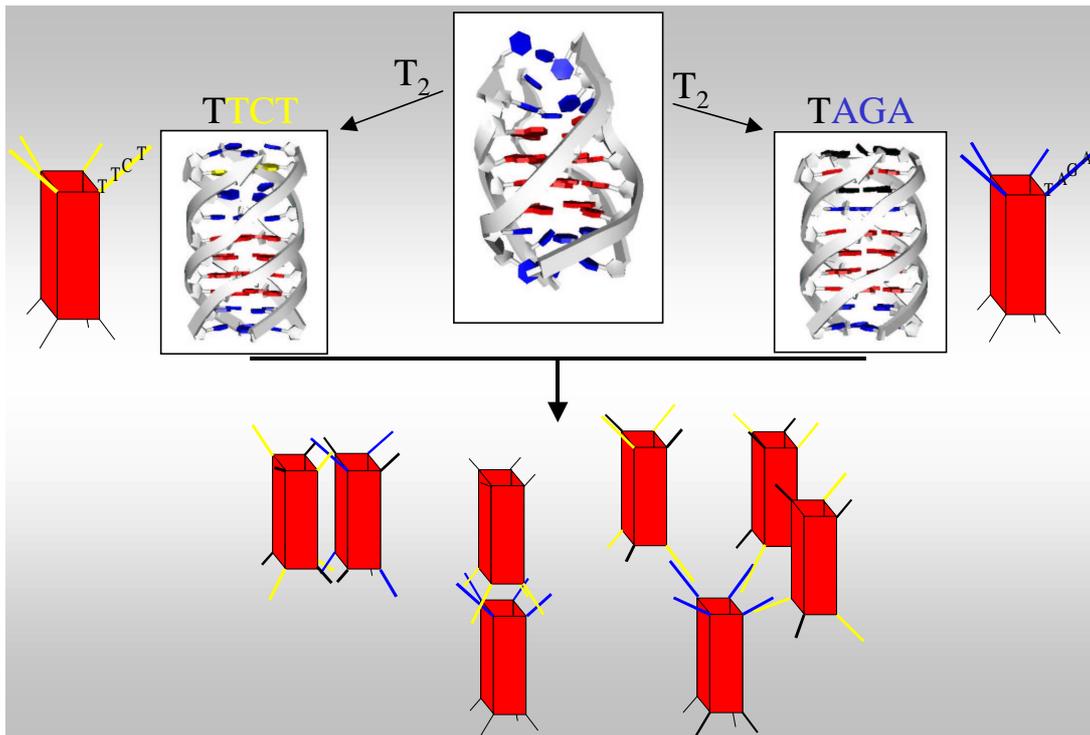


Abbildung 5.28 : Projektplanung zur Synthese supramolekularer Nanostrukturen aus funktionalisierter G-DNA.

Im Folgenden werden die Sequenzen einzeln charakterisiert (vgl. Kapitel 5.3) und anschließend als Mischung in verschiedenen Verhältnissen untersucht.

5.6.1 T_2G_4TTCT – 10merTCT

Mit der Basenabfolge $d[T_2G_4TTCT]$ (10merTCT) wird zunächst eine Sequenz gewählt, die nur einen intermolekularen Tetraplex mit vier G-Ebenen bilden kann. Da prinzipiell gegen-

⁶¹ Dies gilt für den Fall von tetrameren Tetraplexen mit paralleler Stranganordnung. Werden die Einzelsysteme wie unten gezeigt auf 62°C getempert und vollständig aufgeschmolzen, so ist bei der Reaggregation eine antipa-

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

über dem 8mer mit $T_2G_4T_2$ keine neuen Ergebnisse in Bezug auf Struktur (intermolekularer tetramerer Tetraplex) und Dynamik (Schmelztemperatur und Reaggregationsverhalten) zu erwarten sind, wird im Folgenden nur eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse gezeigt. Weiterführende Daten sind im Anhang (DLS-Daten Anhang_Abb 4) verfügbar. Ebenfalls mit den schon gesammelten Ergebnissen ist die ausschließliche Vermessung des Systems in NaCl-Lösungen zu begründen, da in KCl-Lösungen im zugänglichen Temperaturbereich der Tetraplex nicht aufzuschmelzen ist. Bei der in Kapitel 5.6.2 behandelten Sequenz $d[T_2G_4TAGA]$ besteht zudem die Gefahr, dass die Duplexbildung auf Grund einer weiteren, in KCl sehr gut stabilisierten G-Ebene, die ein komplementäres Endstück „versiegelt“, vollständig ausbleibt. Dieses Verhalten, dass das 3' Ende des 10merAGAs eine kompakte Helixstruktur aufweist und damit die 3'AGA Sequenz nicht für die Basenpaarung mit dem 3'TCT des 10merTCTs zur Verfügung steht, ist, wie in Kapitel 5.6.3 gezeigt wird, schon in NaCl-Lösungen nicht unproblematisch.

Ein Vergleich der beiden Strukturen ist in Abbildung 5.29 gezeigt. Besonders die kompaktere Form auf Grund der zusätzlichen G-Ebene beim 10merAGA fällt auf.

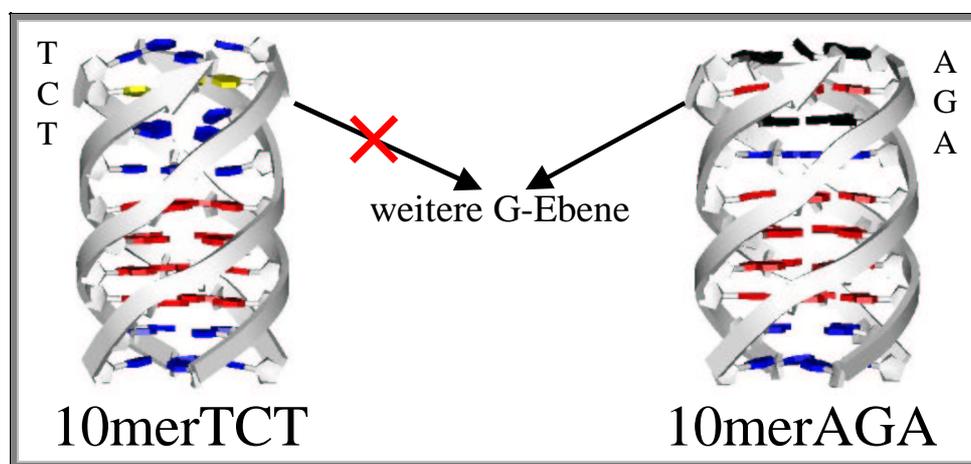


Abbildung 5.29 : Seitenansicht des 10merTCTs und 10merAGAs in schematischer Darstellung. Gezeigt sind die Startstrukturen vor⁶² der Generierung der Wasserhülle und den weiteren Optimierungsschritten.

parallele Assoziation nicht ausgeschlossen, was zu den in Abbildung 5.28-links unten aufgeführten Strukturen führen kann.

⁶² Da für die eigentlichen Optimierungen die 5'-Phosphatgruppen gegen 5'-OH-Gruppen ausgetauscht werden, lassen sich die Endstrukturen, die noch deutlichere Unterschiede in den Helixstrukturen der Endbereiche zeigen, nicht mehr in der hier gezeigten Form visualisieren.

Die Daten aus UV-Spektroskopie, Lichtstreuung und Modellrechnungen sind in Tabelle 5.10 gezeigt. Gleichzeitig werden die Daten des 8mers und auch die UV-Ergebnisse eines 12mers $d[T_2G_4T_6]$ aufgeführt, die den Einfluss der Länge der Endstücke auf die Schmelztemperatur dokumentieren. Wie schon in Kapitel 5.3.1 diskutiert, sind in der Stokes-Einstein Auftragung (siehe Anhang_Abb 4) erst oberhalb des mit der UV-Spektroskopie verifizierten Schmelzpunktes von 43°C Abweichungen vom idealen Verhalten festzustellen. Die Verringerung des Schmelzpunktes von 53°C beim 8mer mit 4 stabilisierenden G-Ebenen auf 43°C bei dieser Sequenz mit eben dieser Anzahl an G-Ebenen kann mit den thermisch bedingten Scherkräften der hier längeren Endstücke begründet werden. Der Einfluss der Länge der 3'Enden bei tetrameren Tetraplexen auf die Schmelztemperatur wird in Kapitel 5.7.3 ausführlich diskutiert.

Sequenz	T_m 50/100mM NaCl	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)	
		τ^{20° [ns]	$D_t^{20^\circ C}$ [$10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$]	$D_t^{20^\circ C}$ [$10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$]	τ^{20° [ns]
$T_2G_4T_2$	53°C/55°C	5.42 [48]	1.45 [48]	1.45	5.42
T_2G_4TCT	43°C/ -	6.79 [115]	1.25 [115]	1.24 (1.23)	6.46 (7.02)
$T_2G_4T_6$	- /43°C	-	-	-	-

Tabelle 5.10 : Übersicht über die Eigenschaften des 10merTCTs im Vergleich zu den 8mer und 12mer Analoga. In [] die Konzentration an NaCl in der Lösung. Bei den theoretischen Werten (Modell) sind in () die Transportgrößen für alternierende (syn-anti) Stranganordnung⁶³ angegeben.

Der Vergleich der aufgeführten theoretischen und experimentellen Ergebnisse charakterisiert das 10merTCT als rein intermolekularen Tetraplex mit paralleler⁶⁴ Stranganordnung.

5.6.2 T_2G_4TAGA – 10merAGA

Bei den durchgeführten Untersuchungen an der Sequenz $d[T_2G_4TAGA]$ (10merAGA) sind auf Grund einer zusätzlich möglichen G-Ebene im Falle paralleler Stranganordnung gegenüber dem 10merTCT bzw. 8mer Abweichungen zumindest in der Schmelztemperatur

⁶³ Daten vom 10merAGA mit nur einem antiparallelen Strang, also einem Nettoüberhang von AG am 5'Anfang, alle weiteren Anordnungen müssen in ihren hydrodynamischen Eigenschaften noch langsamer sein.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

und/oder dem Schmelzverhalten zu erwarten. Mit der Stabilisierung des 3' Endes durch eine G-Ebene könnten sich auch signifikante Veränderungen in den hydrodynamischen⁶⁵ Eigenschaften ergeben. Die Diskussion der DLS-Daten gibt darüber Aufschluss.

In Abbildung 5.30 sind die ermittelten Translationsdiffusionskoeffizienten und Rotationsrelaxationszeiten gezeigt. Zusätzlich sind in der SE-Auftragung die Messpunkte des 10merTCT-Systems kenntlich gemacht, die bei hohen Temperaturen auf ein Schmelzen der Tetraplexstruktur schließen lassen.

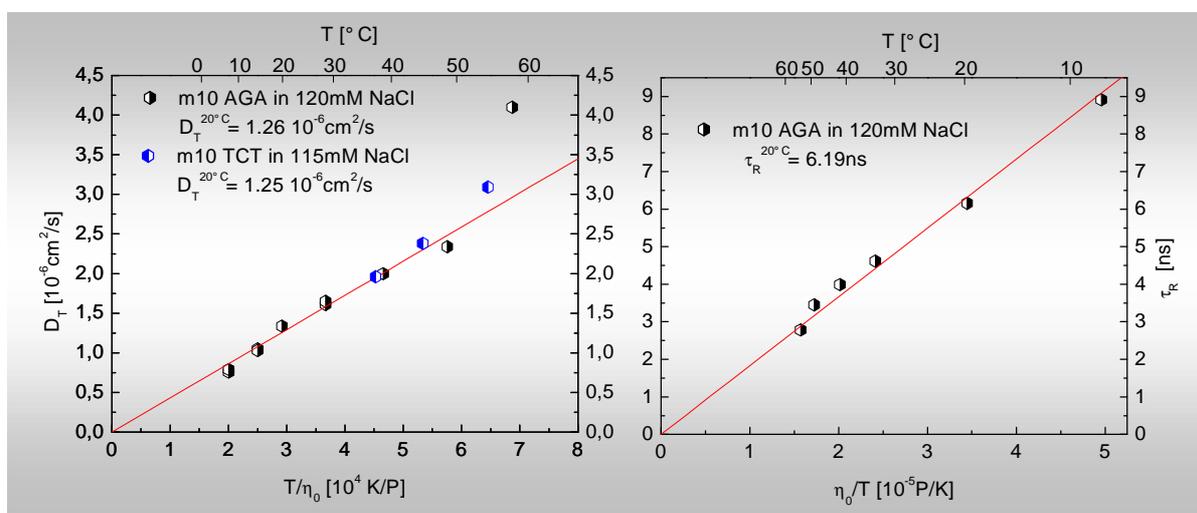


Abbildung 5.30 : DLS-Daten des 10merAGAs (120mM NaCl) und des 10merTCTs (115mM NaCl). Links: Stokes-Einstein Auftragung der Translationsdiffusionskoeffizienten beider Systeme. Rechts: Stokes-Einstein-Debye Plot der Rotationsrelaxationszeiten des 10merAGAs.

In beiden Auftragungen ist bei niedrigen Temperaturen ideales SE(D)-Verhalten zu erkennen. In Abbildung 5.30-links ergeben sich erst Abweichungen im Bereich der mittels UV-Spektroskopie ermittelten Schmelztemperatur (43.0°C für 10merTCT und 55.6°C für 10merAGA).

Ein Vergleich mit den Modellrechnungen in Tabelle 5.11 zeigt, dass hier ein intermolekularer Tetraplex mit paralleler Stranganordnung vorliegt. Dies wird durch die signifikant höhere

⁶⁴ Ein weiterer Beweis, dass eine parallele Stranganordnung vorliegt, wird in Kapitel 5.6.2 gezeigt.

⁶⁵ Durch eine weitere G-Ebene würde sich die kompakte Helixstruktur über den gesamten Endbereich fortsetzen, was zu einer messbar schnelleren Reorientierung führen sollte (vgl. Abbildung 5.29).

Schmelztemperatur gestützt, die in erster Linie⁶⁶ mit einer zusätzlichen G-Ebene am 3'Ende erklärt werden kann. Auch die im Vergleich zum 10merTCT schnellere Rotationsrelaxationszeit spricht für die Ausbildung einer zusätzlichen G-Ebene, da die kompakte Helixstruktur damit auch im 3'Endbereich erhalten bleibt. Eine Beobachtung, die sich bei Modellrechnungen jedoch nicht auswirkt und damit auch die Grenzen der hydrodynamischen Berechnungen aufzeigt⁶⁷. In Anhang_Abb 7 wird das Spektrum des 10merAGAs mit dem des 10merTCTs direkt verglichen ($T = 20^\circ\text{C}$), wobei deutlich die stärkere Linienverbreiterung beim 10merAGA zu erkennen ist.

Sequenz	Tm ≈50/100mM NaCl	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)	
		$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^\circ\text{C}}$ [$10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^\circ}$ [ns]
T ₂ G ₄ T ₂	53.0°C/55.0°C	5.42 [48]	1.45 [48]	1.45	5.42
T ₂ G ₄ TAGA	- /55.6°C	6.19 [120]	1.26 [120]	1.25 (1.23)	6.40 (7.02)
T ₂ G ₄ TTCT	- /43.0°C	6.79 [115]	1.25 [115]	1.24	6.46

Tabelle 5.11 : Vergleich DLS, UV und Modellrechnungen zum 10merAGA. In [] die Konzentration an NaCl in der Lösung. Bei den theoretischen Werten (Modell) sind in () die Transportgrößen für alternierende (syn-anti) Stranganordnung angeführt.

Von dem 10merAGA wurde ein CGE-Lauf durchgeführt, dessen Elektropherogramm in Abbildung 5.31 gezeigt ist. Es wird nur ein symmetrisches Signal mit einem Maximum bei einer Migrationszeit von 16min detektiert. Die Intensität fällt deutlich kleiner aus als bei den anderen tetrameren Tetraplexen. Betrachtet man die auf die Konzentration normierten Integrale ($c(6\text{mer}) = 1.9\text{mM}$, $c(8\text{mer}) = 2.5\text{mM}$, $c(10\text{merAGA}) = 0.65\text{mM}$), so lagert sich der Farbstoff am schlechtesten in das 6mer ein, gefolgt vom 10merAGA und dem 8mer⁶⁸. Zudem

⁶⁶ Da bei der RNA-Sequenz des 6mers eine ungewöhnliche Stabilisierung des Tetraplexes, ausgehend von der veränderten Basensequenz, beobachtet wird, muss auch ein Einfluss des Adenins angenommen werden. Auf Grund der größeren räumlichen Ausdehnung dieser Purinbase gegenüber den in der Sequenz 10merTCT vorhandenen Pyrimidinbasen steht der Stabilisierung durch die G-Ebene eine mögliche Destabilisierung durch sterische Hinderung gegenüber, so dass eine nähere Quantifizierung nicht durchgeführt werden kann.

⁶⁷ Hier bieten sich allerdings noch Berechnungen mit Modellsystemen an, die MD-Simulationszeiten im ns-Bereich aufweisen. Die hier durchgeführten Äquilibrierungen können für die Berücksichtigung solcher Phänomene zu kurz gewesen sein.

⁶⁸ Dabei muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass ohne eingesetzten Marker bezüglich Kurvenintegral und Peakhöhe nur qualitative Aussagen gemacht werden können.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

ist das 10merAGA die einzige Sequenz die über drei Stunden mit dem Farbstoff inkubiert worden ist, was sich auf die detektierte Menge positiv auswirken sollte.

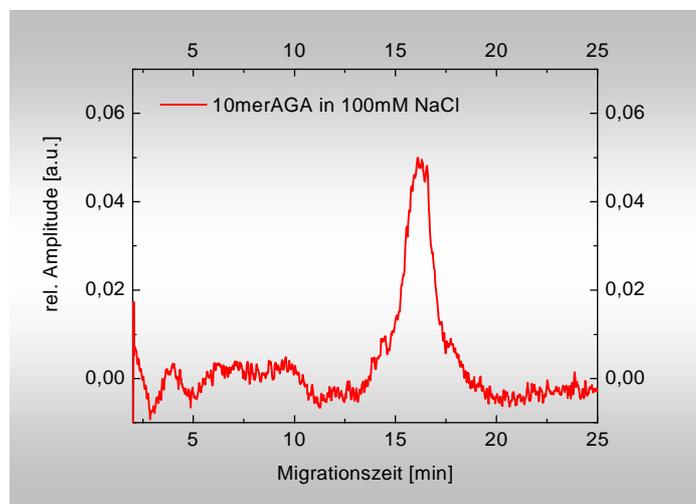


Abbildung 5.31 : Elektropherogramm des 10merAGAs in 100mM NaCl.

Da ein vergleichbarer Effekt schon zwischen dem 6mer und dem 8mer (vgl. Abbildung 5.12) mit der „Versiegelung“ des Anfangsbereiches durch eine zusätzliche U-Ebene begründet wurde, kann auch hier der Einfluss der fünften G-Ebene in ursächlichen Zusammenhang gebracht werden. Damit ist davon auszugehen, dass der verwendete Fluoreszenzfarbstoff kaum in der Lage ist, sich in die tetramere Helix einzulagern und nur die Anfangs- und die Endbereiche⁶⁹ hierfür Angriffspunkt sind.

Nach der durchgeführten Charakterisierung der beiden Sequenzen $d[T_2G_4TTCT]$ und $d[T_2G_4TAGA]$ werden nun Mischungen in zwei verschiedenen Verhältnissen angesetzt und untersucht.

⁶⁹ Die in der tetrameren Struktur des 24mers vorhandenen helikalen T_2 -Bereiche scheinen ebenfalls von YOYO interkalierbar zu sein (vgl. Abbildung 5.17).

5.6.3 T₂G₄TTCT : T₂G₄TAGA – 10:1 / 4:1

Die funktionalisierten G-DNA Sequenzen d[T₂G₄TTCT] (10merTCT) und d[T₂G₄TAGA] (10merAGA) werden im folgenden Kapitel in verschiedenen Verhältnissen gemischt und untersucht.

Von dem 10merAGA werden zunächst sehr geringe Mengen zugegeben (Verhältnis 10:1 TCT zu AGA). Dadurch wird vermieden, dass sich direkt nur große, schwer zu charakterisierende Assoziate der beiden Tetraplexsysteme bilden⁷⁰. So ist davon auszugehen, dass neben den eventuell entstehenden gemischten Komplexen aus den beiden Sequenzen mit Stöchiometrien von 1:1 (ein 10merTCT Tetraplex bildet mit einem 10merAGA Tetraplex 1-4 verbrückende Bereiche) bis 4:1 (vier 10merTCT Tetraplexe bildet mit einem 10merAGA Tetraplex je eine Doppelhelix) weiterhin auch nur die einfachen tetrameren Tetraplexe des 10merTCTs zu detektieren sind.

In den Voruntersuchungen der beide Sequenzen wurde eine Schmelztemperatur von 43.0°C (10merTCT) bzw. 55.6 °C (10merAGA) detektiert (vgl. Kapitel 5.6.1 und 5.6.2). Die ersten streulichtspektroskopischen Untersuchungen der 10:1 Mischung finden in einem Temperaturbereich von $T < 25^{\circ}\text{C}$ statt, um eine Interaktion aufgeschmolzener Tetraplex(bereiche) sicher ausschließen zu können⁷¹. Für den Fall, dass im 10merAGA tatsächlich eine zusätzliche G-Ebene ausgebildet wird, sollten bei diesen Untersuchungen keine großen, langsamen Strukturen detektiert werden. In Abbildung 5.32 sind die ermittelten hydrodynamischen Größen aufgetragen. Im betrachteten Temperaturintervall ist ideales SE(D) Verhalten zu beobachten. Der Vergleich mit den Translationsdiffusionskoeffizienten und Rotationsrelaxationszeiten der reinen 10mer-Systeme zeigt nur geringfügige Abweichungen, die sich im Falle der Translation innerhalb des Fehlerbereiches von $\pm 4\%$ befinden.

⁷⁰ Zu 1:1 Mischungen wurden Vorversuche mittels UV-Spektroskopie durchgeführt, die auf große Assoziate schließen lassen (vgl. Kapitel 5.7)

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

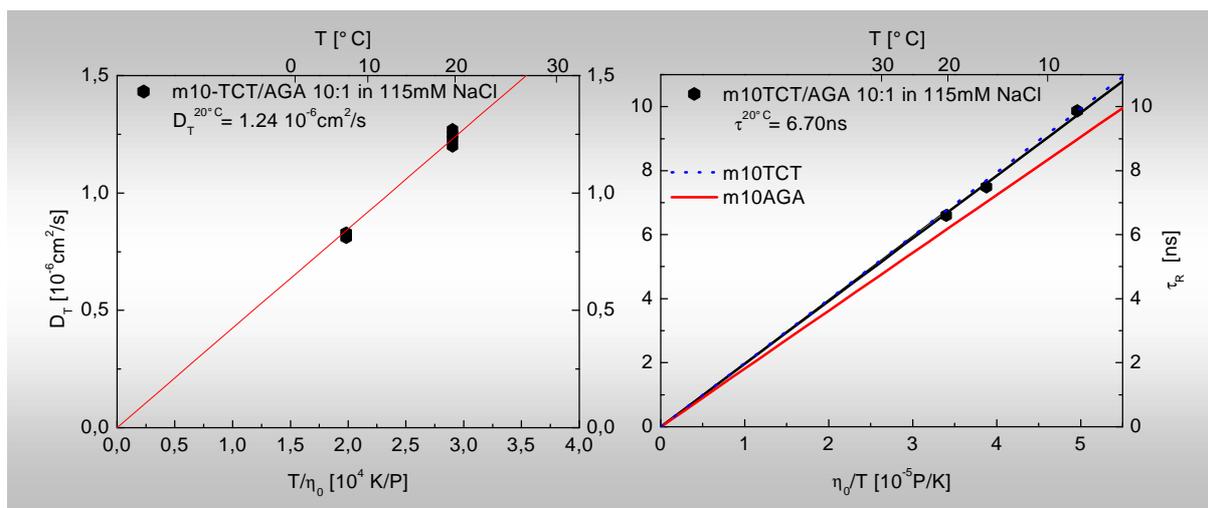


Abbildung 5.32 : Links: Stokes-Einstein Auftragung der 10:1 Mischung des 10merTCTs mit dem 10merAGA. Rechts: Stokes-Einstein-Debye Plot Ausgleichsgeraden der Rotationsrelaxationszeiten der Reinsysteme.

Die Rotationsrelaxationszeit der Mischung entspricht dem Mittelwert der Einzelsysteme gewichtet mit dem vorliegenden Mischungsverhältnis⁷². In Tabelle 5.12 ist eine Übersicht gegeben.

Sequenz	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)	
	$\tau_R^{20^{\circ}}$ [ns]	$D_T^{20^{\circ}\text{C}}$ [$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$]	$D_T^{20^{\circ}\text{C}}$ [$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$]	$\tau_R^{20^{\circ}}$ [ns]
10:1 TCT/AGA	6.70	1.24	-	-
T ₂ G ₄ TAGA	6.19	1.26	1.25	6.40
T ₂ G ₄ TTCT	6.79	1.25	1.24	6.46
kompakt	-	-	0.9	22
ausgedehnt	-	-	0.5	398

Tabelle 5.12 : Vergleich der DLS-Daten der 10:1 – Mischung der Sequenzen 10merTCT mit dem 10merAGA und den experimentellen Daten der einzelnen Tetraplexe mit hydrodynamischen Modellrechnungen.

⁷¹ Die Schmelztemperatur ist als Wendestelle der sigmoidalen Kurvenanpassung an die temperaturabhängig aufgenommenen Absorptionswerte definiert. Gerade beim 10merAGA *beginnt* der Schmelzprozess jedoch schon ab ca. 28°C, was ursächlich mit dem Aufbrechen der endständigen G-Ebene zusammenhängen kann.

⁷² Auf Grund der fast identischen molekularen Eigenschaften des 10merAGAs und 10merTCTs ist eine solche Mittlung möglich. I.a. müssen noch die unterschiedliche Anisotropie, Strukturfaktoren, Molekulargewichte etc. [Pec76] berücksichtigt werden.

Als Referenzwerte für mögliche 1:1 oder 1:2 Aggregate aus den 10merAGA und 10merTCT Tetraplexen sind vier Anordnungen der Tetraplexe in hydrodynamischen Modellrechnungen berechnet worden. Die kompakteste⁷³ Anordnung stellt eine *end-to-end* Dimerisierung zu einer langen stäbchenförmigen Spezies dar. Der andere Fall mit maximaler räumlicher Ausdehnung ist wie die anderen Spezies (side-on Dimer und end-to-end Trimer) in der Übersicht Abbildung 5.33 gezeigt, wobei die hydrodynamischen Daten des *end-to-end* Dimers und der Spezies mit der maximalen Ausdehnung in die Tabelle 5.12 aufgenommen sind.

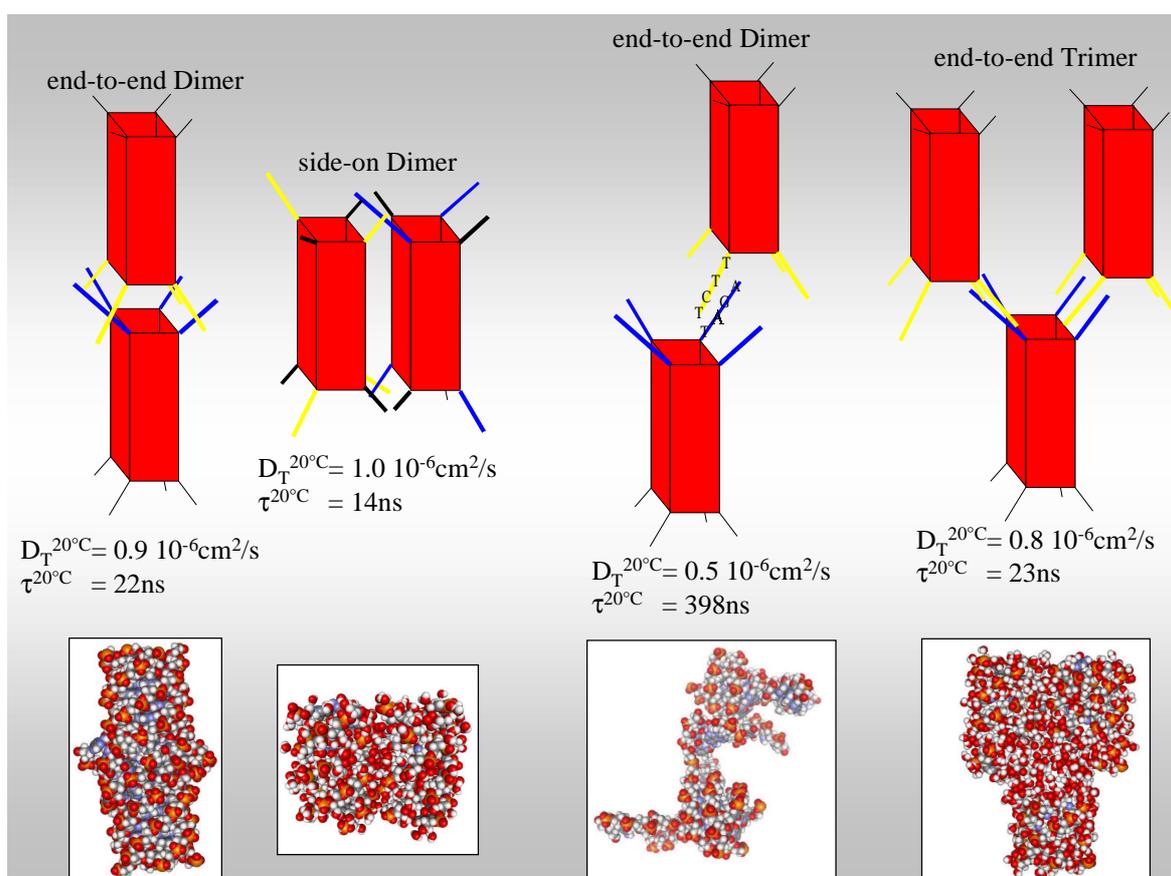


Abbildung 5.33 : Übersicht über die möglichen niedermolekularen Assoziante bei Aggregation des 10merTCTs mit dem 10merAGA. Zugeordnet sind je die Ergebnisse der hydrodynamischen Modellrechnungen und die berechneten Strukturen in der atomaren Auflösung in VdW-Darstellung (nicht maßstabsgetreu). Side-on Dimer und ent-to-end Trimer *einschließlich* der berücksichtigten Wasserhülle mit $d=285\text{pm}$. Die beiden end-to-end Dimere sind *ohne* Solvathülle abgebildet.

⁷³ Da in den Untersuchungen der Einzelsysteme tetramere Tetraplexe mit einer parallelen Stranganordnung detektiert wurden, ist *vor* der in Abbildung 5.34 dargestellten Messreihe, in der das 10merTCT *in der Mischung* aufgeschmolzen wird, nur eine *end-to-end* Dimerisierung möglich.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Daten in Tabelle 5.12 und Abbildung 5.33 zeigen, dass bei diesem 10:1 Ansatz im beobachteten Temperaturbereich es nicht zur Ausbildung von höheren Aggregaten aus den einzelnen Tetraplexen gekommen ist.

Um ausschließen zu können, dass die niedrige 10merAGA Konzentration für die fehlende Bildung höherer Spezies bei niedrigen Temperaturen verantwortlich ist, oder die gebildeten Aggregate auf Grund der geringen Konzentration maskiert sind, wird das Mischungsverhältnis auf 4:1 erhöht. Auch dieser Ansatz wird erst bei Raumtemperatur charakterisiert und anschließend in mehreren Stufen über die Schmelztemperatur der Tetraplexe hinaus erhitzt. Die Ergebnisse der temperaturabhängigen polarisierten Lichtstreuungsmessungen sind in Abbildung 5.34 gezeigt.

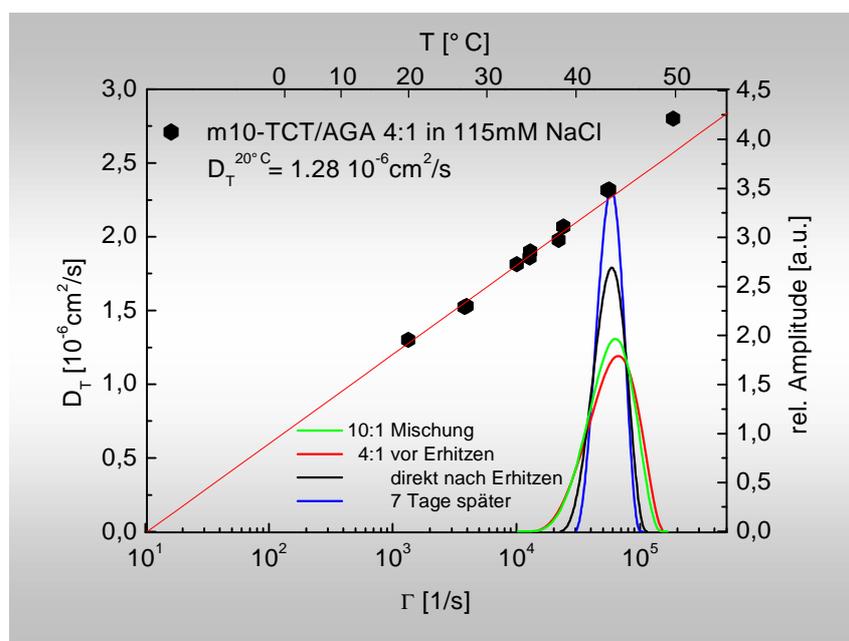


Abbildung 5.34 : Stokes-Einstein Plot der 4:1 Mischung aus 10merTCT/AGA. Die Probe wird bis 49.4°C vermessen. Die farbigen Kurven zeigen die Frequenzverteilungsfunktionen der CONTIN-Analysen ($T=20^{\circ}\text{C}$) zu verschiedenen Zeitpunkten der Messreihe. Zum Vergleich wird die Verteilungsfunktion der 10:1 Mischung gezeigt (grüne Kurve).

Bis zu der Schmelztemperatur des 10merTCT (43°C) ist ideales Stokes-Einstein Verhalten zu erkennen. Darüber hinaus kommt es zu Abweichungen, die mit dem Aufschmelzen der Tetraplexstruktur zu random-coil Einzelsträngen zu begründen sind. Nach den Messungen bei

49.4°C⁷⁴ wird die Küvette direkt wieder auf 20°C temperiert und erneut vermessen. Es ergeben sich keine Änderungen in der Relaxationsratenverteilung⁷⁵ und damit für D_T gegenüber dem Messbeginn. Die Bildung von Assoziaten zwischen verschiedenen Tetraplexeinheiten kann daher ausgeschlossen werden, was auch die temperaturabhängigen DDLS-Messung erübrigt. Bei der Charakterisierung nach dem Ansetzen der Probe ergeben sich 6.90ns für die Rotationsrelaxationszeit $\tau_R^{20^\circ\text{C}}$ und $1.28 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ für den Translationsdiffusionskoeffizienten $D_T^{20^\circ\text{C}}$ (vgl. Abbildung 5.34: rote Kurve). Nach den temperaturabhängigen PCS-Messungen wird für $D_T^{20^\circ\text{C}}$ $1.29 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ ermittelt (vgl. Abbildung 5.34: blaue Kurve).

Anschließend wird die Probe bei 62°C 20min getempert, was nach den Ergebnissen aus der UV-Spektroskopie zum vollständigen Aufschmelzen des 10merTCTs und zur weitest gehenden Dissoziation des 10merAGAs führt. Nach zwei Tagen Lagerung bei ca. 14°C werden winkelabhängige Messungen bei 20°C und zwei temperaturabhängige Messreihen zwischen 12°C und 52°C (Messreihe M1) und 8°C und 68°C (M2) durchgeführt.

In Abbildung 5.35 sind die Ergebnisse der winkelabhängigen Messungen gezeigt. Neben dem vor dem Tempern auf 62°C detektierten schnellen Prozess erscheint jetzt auch eine langsame Mode. Auf Grund der geringen Winkelabhängigkeit und dem unten diskutierten idealen Stokes-Einstein Verhalten (vgl. Anhang_Abb 5), kann auch bei der langsamen Mode von einem rein diffusiven Prozess ausgegangen werden [Pec76].

Dieses Verhalten der Ausbildung eines zweiten, langsamen Prozesses kann nur mit der Wechselwirkung der funktionalisierten Endbereiche des 10merAGAs mit denen des 10merTCTs begründet werden. In den nicht gemischten Einzelsystemen werden bei deren Charakterisierung jeweils Messungen oberhalb der Schmelztemperatur der Tetraplexe durchgeführt. Dabei wird nach dem Abkühlen keine langsame Mode detektiert. Da die Gesamtkonzentration an DNA in der Mischung nicht höher liegt als in den untersuchten Reinsystemen, kann auch kein Konzentrationseffekt für das Verhalten herangezogen werden. Dies gilt sowohl bezüglich der

⁷⁴ Diese Temperatur ergibt sich aus den Schmelzprofilen der beiden Tetraplexe. Bei ca. 49°C liegt das 10merTCT-System vollständig dissoziiert vor, hingegen die G-Ebenen im Tetraplex des 10merAGAs noch intakt vorliegen sollten.

⁷⁵ Und damit in der Größenverteilung.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

absoluten DNA Konzentration, als auch bezüglich des Verhältnisses von DNA Konzentration zu Ionenstärke (Ausschluss von Polyelektrolyteffekten [Wal95][Bol98]).

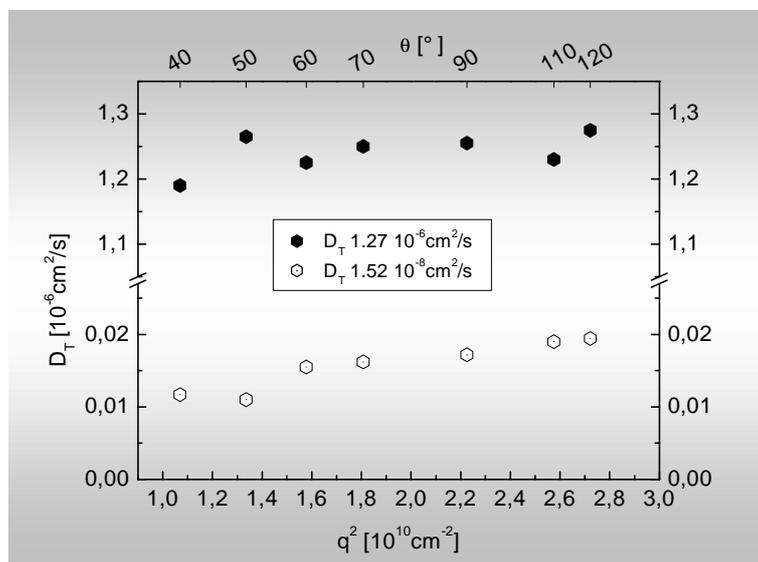


Abbildung 5.35 : Abhängigkeit des Translationsdiffusionskoeffizienten von q^2 (Quadrat des Streuvektors)

Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Messungen zeigen bis ca. 40°C ideales Stokes-Einstein Verhalten. Oberhalb dieser Temperatur kommt es zu signifikanten Abweichungen. Betrachtet man den schnellen Prozess (zugehöriges D_T ist aufgetragen in Abbildung 5.36), so ist dieses Verhalten nicht nur mit dem bisher diskutierten Aufschmelzen zu Einzelsträngen zu erklären. In Abbildung 5.36 ist zu erkennen, dass zunächst eine überproportionale Zunahme des Translationsdiffusionskoeffizienten erfolgt (45.7°C), jedoch bei noch höheren Temperaturen (52.3°C) der Wert, relativ zur Regressionsgeraden, einbricht.

Während die Zunahme des Diffusionskoeffizienten bei 45.7°C mit dem Aufschmelzen der Tetraplexe zu erklären ist, wirft dessen Abnahme bei 52.3°C Fragen auf. Die Analyse der ebenfalls gezeigten Frequenzverteilungsfunktionen (farbige Kurven Abbildung 5.36) gibt hierzu Aufschlüsse. Von 35.3°C bis 40.9°C wird die Verteilung des schnellen Prozesses breiter (vgl. farbige Kurven in Abbildung 5.36-rechts). Bis 45.7°C nimmt der Anteil an der Gesamtintensität sprunghaft zu. Bei einer Temperatur von 52.3°C findet eine Aufspaltung in zwei schnelle Prozesse statt (blaue Kurve Abbildung 5.36-rechts), wobei der Translationsdif-

fusionskoeffizient des langsameren Prozesses in der SE Auftragung verwendet wurde (linke Schulter der blauen Kurve und $D_T^{52.3^\circ\text{C}} = 2.2 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$).

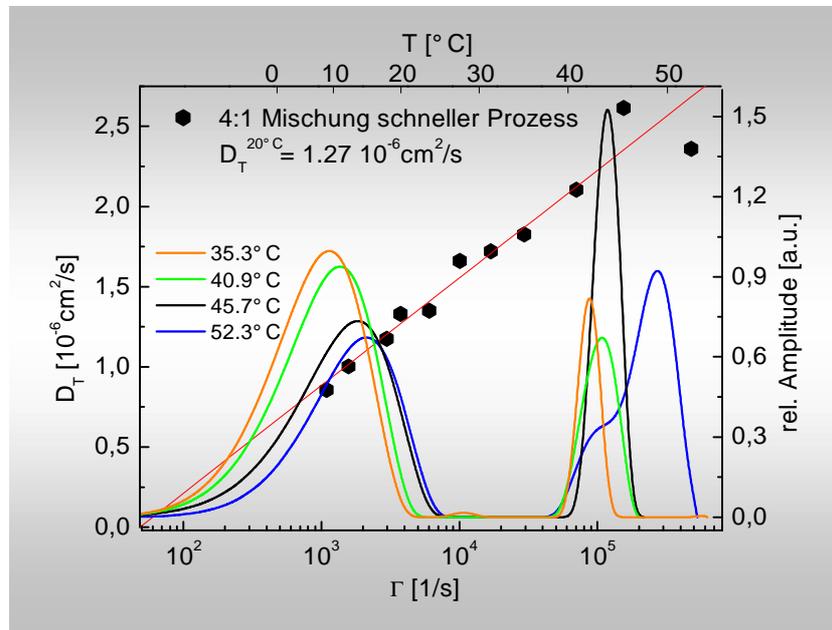


Abbildung 5.36 : Stokes-Einstein Plot der 4:1 Mischung. Aufgetragen ist D_T des schnellen Prozesses (rechter Teil der farbigen Kurven). Farbige Kurven: Temperaturabhängige Veränderungen in den Frequenzverteilungsfunktionen der CONTIN-Analyse.

Der langsame Prozess zeigt bis zu einer Temperatur von ca. 40°C ideales Stokes-Einstein Verhalten (vgl. Abbildung 5.38 und Anhang_Abb 5). Bei höheren Temperaturen kommt es zu Abweichungen, die mit einem Aufschmelzen der Struktur in kleinere Einheiten in Einklang stehen. Einhergehend kommt es zu einer starken Abnahme der dem langsamen Prozess zugeordneten Streuamplitude (Übergang von der gelben zur schwarzen und blauen Kurve in Abbildung 5.36-links).

Um dieses komplexe Verhalten zu verstehen, ist es zunächst notwendig, die grundsätzlich in Lösung möglichen Strukturtypen vorzustellen. Geht man davon aus, dass beim Tempern auf 62°C so gut wie alle Tetraplexe in Einzelstränge aufgeschmolzen werden, ist bei der Reaggregation die Bildung mehrerer Strukturgruppen möglich:

- Eine *große Anordnung* von Tetraplexen, die über selbstkomplementäre B-DNA Bereiche miteinander verbundenen sind. Bei diesen Tetraplexen sind auch gemischte Tetraplexe

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

(tetramere Einheit aus zwei 10merAGA und zwei 10merTCT Strängen) und antiparallele (syn-anti) Stranganordnungen wahrscheinlich.

- *End-to-end Dimere*⁷⁶ aus zwei Tetraplexeinheiten sind möglich, da deren Frequenzverteilungsfunktion und damit Translationsdiffusionskoeffizient noch in einen, mit den der einfachen tetrameren Tetraplexen des 10merTCTs und des 10merAGAs vergleichbaren Zeitbereich liegt.
- Normale *tetramere Tetraplexe* des 10merTCTs und des 10merAGAs. Zudem sind auf Grund unvollständiger Assoziation der vorher geschmolzenen 10merAGAs und 10merTCTs noch Einzelstränge denkbar.
- Diese *Einzelstränge* in der Lösung fallen von ihren hydrodynamischen Eigenschaften ebenfalls in (Zeit-)bereiche der beiden vorgenannten Strukturen, bzw. sind auf Grund der Streueigenschaften der größeren Assoziate vollständig von diesen maskiert.

Die Auffällige Verschiebung der den Prozessen zugeordneten Intensitäten und das Verhalten der Translationsdiffusionskoeffizienten im Temperaturbereich 40.9°C bis 45.3°C spricht für die Zuordnung der *großen Anordnung* zum langsamen Prozess, und der drei Strukturen *end-to-end Dimere*, *Tetramere* und *Einzelstränge* zu dem schnellen Prozess.

Die Zunahme der dem schnellen Prozess zugeordneten Intensität zwischen 40.9°C und 45.3°C geht mit einer Abnahme der Intensität im langsamen Prozess einher, so dass sich aus dem dortigen Verband einzelne Tetraplexeinheiten und/oder einzelne Stränge lösen. D.h. es wird das Schmelzen der an das Netz gebundenen tetrameren Einheiten des 10merTCTs, später auch des 10merAGAs beobachtet, bzw. es werden durch die auftretenden Scherkräfte auch komplette tetramere Einheiten, welche vorher nur unvollständig⁷⁷ an den Komplex gebunden waren, abgelöst. Diese Zuordnung ist in sich konsistent mit der UV-spektroskopisch ermittelten Schmelztemperatur des 10merTCTs ($T_m = 43.0^\circ\text{C}$) und des 10merAGAs ($T_m = 55.6^\circ\text{C}$).

⁷⁶ Auf Grund der großen Anzahl der möglichen Permutationen in der Verknüpfung der tetrameren Einheiten, nach dem vollständigen Aufschmelzen bei 62°C, ist das *end-to-end Dimer* als **Beispiel** solcher niedermolekularen Komplexe zu sehen (vgl. Abbildung 5.33 und Abbildung 5.40).

⁷⁷ Statt der vollständigen Überlappung von TCT mit AGA nur eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem T und einem A. Oder nur die Anbindung eines Tetraplexes über einen doppelhelikalen Bereich.

Gleichzeitig gibt es ab dieser Temperatur Abweichungen vom idealen SE-Verhalten des langsamen Prozesses (vgl. Abbildung 5.38 und Anhang_Abb 5). Da die Abweichung zu schnelleren Translationsdiffusionskoeffizienten relativ zur Regressionsgeraden liegen, sind diese Ablösungserscheinungen und damit einhergehend eine Verkleinerung des Netzwerkes direkt aus Abbildung 5.38 zu begründen.

Werden die Veränderungen der Streuintensitäten und das temperaturabhängige Verhalten der Translationsdiffusionskoeffizienten für den schnellen Prozess analog analysiert, entsteht ebenfalls ein in sich konsistentes Bild. So wird über den gesamten Temperaturbereich nicht nur, wie vor dem Tempern auf 62°C, eine Mischung aus tetrameren Tetraplexen der Sequenzen 10merAGA und 10merTCT detektiert, sondern auch eine dimere Anordnung aus diesen beiden Tetraplexen, die *end-to-end* (vgl. ⁷⁶) über die komplementären Bereiche verknüpft sind. Erst mit dem vollständigen Schmelzen aller 10merTCT Tetraplexe⁷⁸ und die bei den hohen Temperaturen stärker getrennten Frequenzverteilungsfunktionen werden beide Spezies, Einzelstränge und *end-to-end* Dimere, detektiert. Eine Extrapolation der Transportgrößen gemessen bei 52.3°C auf 20°C bestätigt diese Deutung, da eine gute Übereinstimmung mit den ebenfalls für diese Strukturen durchgeführten Modellrechnungen (für T = 20°C) besteht.

Eine entsprechende Übersicht über die gemessenen und berechneten Transportgrößen ist in Tabelle 5.13 gezeigt. Die aufgeführte Struktur *Netz 10 Einheiten* ist hier als Abschätzung der Größenordnung der hydrodynamischen Eigenschaften solcher *großen Anordnungen* gedacht und zeigt ebenfalls eine gute Übereinstimmung von Experiment und Modell. Die genaue Anzahl an vernetzten Tetramereinheiten ist jedoch nicht festzustellen, zumal die Frequenzverteilungsfunktion des langsamen Prozesses für eine Vielzahl an Stöchiometrien spricht. Ebenfalls in Tabelle 5.13 werden zur Verdeutlichung der Größenunterschiede die über Gleichung (2.39) ermittelten hydrodynamischen Radien der Strukturen mit aufgenommen.

⁷⁸ Ebenso sind gemischte Tetraplexe aus beiden Sequenzen wahrscheinlich, die aber auf Grund der unvollständigen fünften G-Ebene einen Schmelzpunkt, der dem des 10merTCTs vergleichbar ist, besitzen sollten.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Sequenz/ Struktur	experimentelle Werte		Modell (d=285pm)
	$D_T^{20^\circ\text{C}} [10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}] - R_h[\text{nm}]$	$D_T^{52.3^\circ\text{C}} [10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}]$	$D_T^{20^\circ\text{C}} [10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}] - R_h[\text{nm}]$
-	1.27 - (1.69)	2.22 [1.05 M1 (2.04)] [1.03 M2 (2.08)] 5.42 [2.56 M1 (0.84)] [2.03 M2 (1.06)]	
T ₂ G ₄ TAGA Einzelstrang	-		2.2 - (0.97)
<i>End-to-End Dimer</i>	-		1.00 - (2.14)
Netz 10 Einheiten	0.015 - (142.80)		0.02 - (107.10)

Tabelle 5.13 : Vergleich der experimentellen Transportgrößen und der theoretischen Werte aus den hydrodynamischen Modellrechnungen. In []-Klammern die auf 20°C extrapolierten Werte der bei 52.3°C (M1) und 60.2°C (M2) detektierten schnellen Moden. In ()-Klammern der hydrodynamische Radius ($R_h^{20^\circ\text{C}}$) in nm.

Höhere Temperaturen werden in der anschließenden Messreihe realisiert. Dabei wird besonders das weitere Verhalten der schnellen Prozesse oberhalb von 52.3°C näher beleuchtet, da zu erwarten ist, dass die Tetraplexe des *end-to-end* Dimers schmelzen und demnach nur ein schneller Prozess, der ausschließlich den *Einzelsträngen* zuzuordnen ist, zu beobachten sein sollte⁷⁹.

In Abbildung 5.37 sind die temperaturabhängig ermittelten Frequenzverteilungsfunktionen der CONTIN-Analyse mit den zugehörigen Translationsdiffusionskoeffizienten des schnellen Prozesses aufgetragen. Bis 50°C zeigt sich ideales Stokes-Einstein Verhalten.

Bei 50°C ist eine deutliche Verbreiterung des schnellen Prozesses zu beobachten, was mit dem Aufschmelzen von Tetraplexen zu begründen ist. Wie oben diskutiert, liegt dabei sowohl eine Dissoziation von *End-to-End Dimeren* in einzelne tetramere Quadruplexe, als auch ein Schmelzen einzelner tetramerer Tetraplexe des 10merAGAs und des 10merTCTs, sowie daraus gemischten tetrameren Quadruplexen in die Einzelstränge vor. Gerade die Aufspaltung bei 60°C stützt diese Deutung, da die auf 20°C extrapolierten Transportgrößen *end-to-end*

Dimeren und *Einzelsträngen* zuzuordnen sind (vgl. Tabelle 5.13). Auch zeigt die Extrapolation der Messwerte dieser Messreihe eine bessere Übereinstimmung mit den Modellrechnungen als die Extrapolation der Messungen bei 52.3°C (M1). D.h. die freien tetrameren Tetraplexe des 10merTCTs und 10merAGAs sind vollständig geschmolzen (vgl. T_m aus UV-Messungen) und nur die temperaturstabileren *end-to-end Dimere* und die *Einzelstränge* werden detektiert.

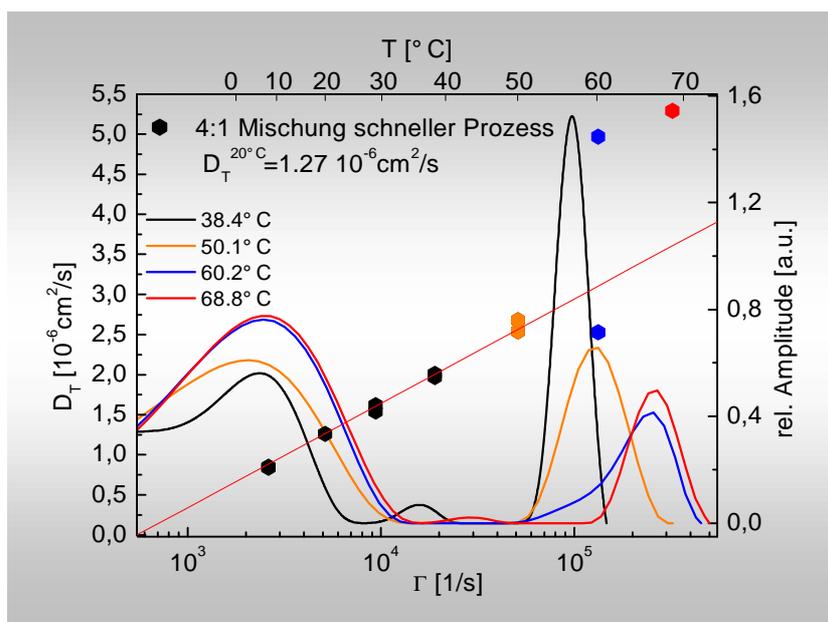


Abbildung 5.37 : Stokes-Einstein Auftragung mit zugehörigen Frequenzverteilungsfunktionen der 4:1 Mischung.

Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass die Modellrechnungen mit bei 20°C äquilibrierten DNA-Strukturen als Eingabedatei durchgeführt werden, eine Momentaufnahme darstellen und gerade die bei hohen Temperaturen auftretenden intramolekularen Schwingungen keine Berücksichtigung finden. Mit diesen strukturaufweitenden Schwingungen ist die relative Abnahme der translationsdiffusiven Größen des Einzelstranges zu begründen. So führt eine Extrapolation des Messwertes bei 68.8°C auf 20°C zu einem Translationsdiffusionskoeffizienten von $D_T^{20°C} = 1.86 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und einem hydrodynamischen Radius von $R_h^{20°C} = 1.15 \text{ nm}$. D.h. Die Extrapolation führt zu einer scheinbar größeren Struktur (vgl. Tabelle 5.13 – 10merAGA Einzelstrang).

⁷⁹ Im Gegensatz dazu lassen UV-Messungen (vgl. Kapitel 5.7.3) auf eine extreme Temperaturstabilität der Netzstruktur (langsamer Prozess) schließen.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei noch höheren Temperaturen (zwischen 60.2°C und 68.8°C) schmelzen auch die dimeren Strukturen vollständig in Einzelstränge auf.

Damit werden die Aussagen der ersten temperaturabhängigen Messreihe (M1, bis 52.3°C) bestätigt. D.h., dass im Falle des schnellen Prozesses ein Gleichgewicht zwischen *end-to-end Dimeren*, *tetrameren Tetraplexen* und *Einzelsträngen* vorliegt. Erst bei hohen Temperaturen divergieren die zugehörigen Frequenzverteilungsfunktionen ausreichend, um sicher aufgelöst zu werden. Gleichzeitig ermöglicht die temperaturabhängige Verschiebung der Gleichgewichtslage hin zu den Einzelsträngen die Detektion selbiger (vorherige Maskierung durch größere, stärker streuende Strukturen).

Betrachtet man den langsamen Prozess, so sind deutliche Unterschiede in den Translationsdiffusionskoeffizienten und im temperaturabhängigen Verhalten gegenüber der ersten Messreihe zu beobachten. In Abbildung 5.38 sind die Transportgrößen des langsamen Prozesses der beiden Messreihen gegenübergestellt.

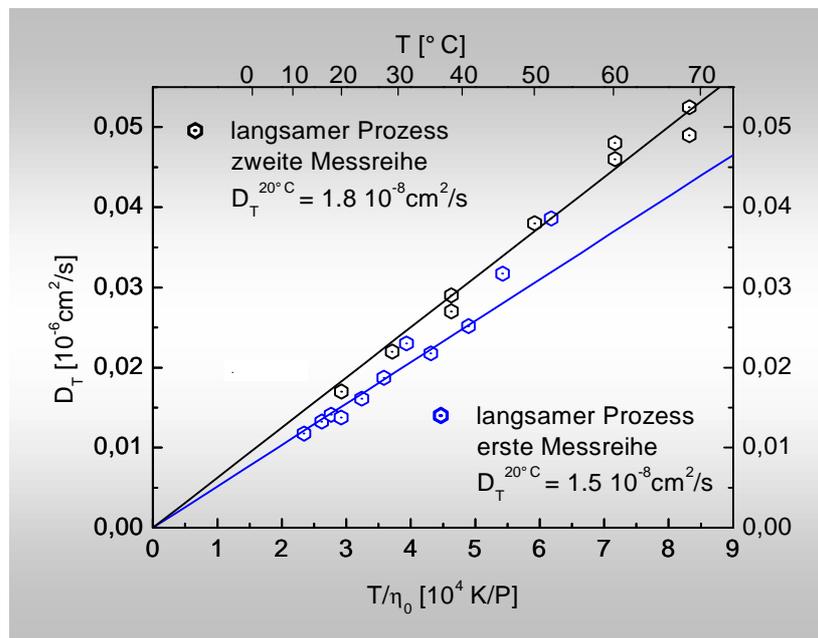


Abbildung 5.38 : Stokes-Einstein Auftragung der Translationsdiffusionskoeffizienten des langsamen Prozesses der beiden temperaturabhängigen Messreihen der 4:1 Mischung aus dem 10merTCT und dem 10merAGA. Blau: erste Messreihe (M1). Schwarz: zweite Messreihe (M2).

Während sich bei der ersten Messreihe (M1) Abweichungen ab ca. 40°C ergeben, die mit einer Ablösung einzelner Teile aus dem „Netz“ zu begründen sind (s.o.), sind derartige Effekte in der zweiten Messreihe (M2) nicht zu beobachten. Auffällig ist, dass der letzte Messwert von M1 ($T = 52.3^\circ\text{C}$) auf der Regressionsgeraden von M2 liegt. D.h. bei dieser Temperatur kann die temperaturstabile Endgröße der Struktur innerhalb von M1 erreicht gewesen sein. Die in M2 detektierte Struktur ist sehr temperaturstabil, da selbst oberhalb der Schmelztemperatur des stabilsten diskreten Tetraplexes (10merAGA mit $T_m = 55.6^\circ\text{C}$) keine Veränderungen zu beobachten sind (ideales SE-Verhalten). Damit zeigt diese Struktur vollkommen neue Eigenschaften, die nicht als Summe der Eigenschaften der Ausgangssysteme des 10merAGAs und 10merTCTs zu erklären sind.

Das Elektropherogramm der ebenfalls durchgeführten Kapillargelelektrophorese (Probenentnahme nach M2) ist in Abbildung 5.39 gezeigt. Der eingefügte Vergleich zu den Elektropherogrammen des 24mers ermöglicht eine Signalzuordnung. Das Elektropherogramm zeigt einen schwachen breiten Signalverlauf im Bereich von $t = 5\text{min}$ bis $t = 10\text{min}$. Mit einer Migrationszeit von 12min bis 15min werden mehrere ineinander übergehende Signale detektiert. Hier sind zwei Bereiche näher zuzuordnen. Ein Signal liegt bei $t = 12.8\text{min}$ mit einer Aufspaltung in zwei Signalspitzen und ein weiteres breites Signal wird mit einem Maximum bei $t = 13.6\text{min}$ angezeigt.

Unter Einbeziehung der Signallage und deren Zuordnungen bei den gezeigten Elektropherogrammen des 24mers und gleichzeitiger Berücksichtigung der Daten aus der dynamischen Streulichtspektroskopie lassen sich Signal-Strukturzuordnungen treffen. Hauptargument sind die beim 24mer getroffenen Zuordnungen der Signale bei $t = 11.2\text{min}$ zu einer intramolekularen Struktur ($D_T = 1.46 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$) und bei $t = 14.3\text{min}$ zu einem gestreckten tetrameren Tetraplex ($D_T = 0.8 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$) mit $\Delta(t) = 3.1\text{min}$ und $\Delta(D_T)^{80} = 0.66 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$.

⁸⁰ Die Differenz in den Translationsdiffusionskoeffizienten bezieht sich auf die Werte der intramolekularen Struktur und der intermolekularen Struktur des 24mers gem. Tabelle 5.7.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

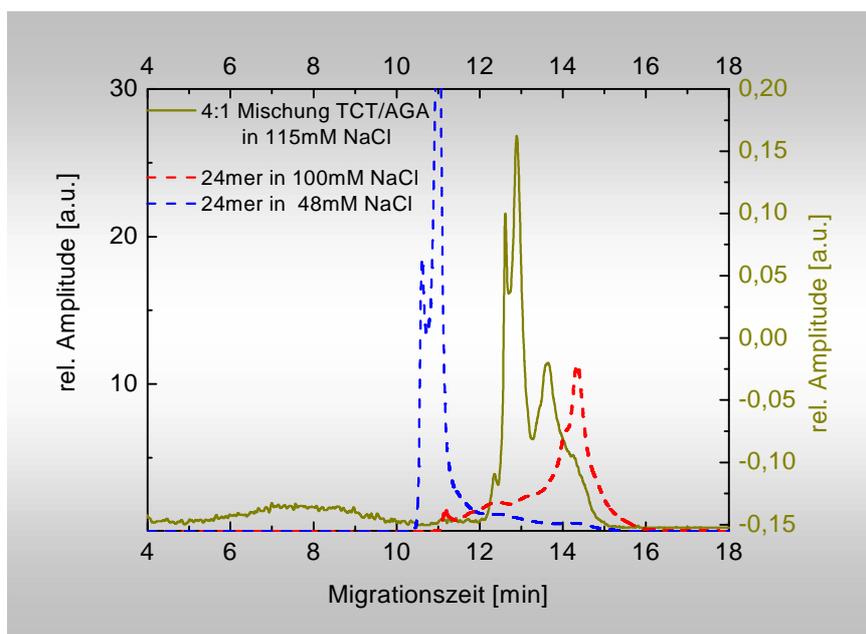


Abbildung 5.39 : Elektropherogramm der 4:1 Mischung TCT/AGA in 115mM NaCl (orange Line). Im Vergleich die Elektropherogramme des 24mers in 48mM und 100mM NaCl. Die Signallage des 24mers in 100mM NaCl ist auf die in 48mM NaCl normiert (vgl. Kapitel 5.5.1). Bei allen Messungen wurde der Laufpuffer 100mM NaCl eingesetzt.

Überträgt man diese Trennleistung [Mit95][Hel01] auf das Elektropherogramm der 4:1 Mischung, so kann das Signal bei $t = 12.8\text{min}$ den *tetrameren Tetraplexen* des 10merTCTs zugeordnet werden und das Signal mit einer Migrationszeit von $t = 13.6\text{min}$ einem *end-to-end Dimeren* ($\Delta(t) = 0.8\text{min}$, $\Delta(D_T) = 0.22 \cdot 10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$). Zudem deutet die Aufspaltung des ersten Signals auf die beim 10merTCT möglichen syn-anti Isomere hin.

Das breite vorgelagerte Signal im Bereich von $t = 5\text{min}$ bis $t = 10\text{min}$, kann mit vorliegenden random coil Einzelsträngen erklärt werden, die auf Grund der unterschiedlichsten Konformationen und damit einhergehender unterschiedlicher Interkalation des YOYOs einen entsprechend weiten Laufzeitbereich abdecken.

Mit diesen Signal-Struktur Zuordnungen ergibt sich mit allen angewandten Methoden ein konsistentes Bild bezüglich der in der Lösung vorhandenen Anordnungen, zumindest was den in der DLS charakterisierten schnellen Prozess und dessen Ursache in der Ausbildung von drei Strukturgruppen⁸¹ angeht.

⁸¹ Einzelstränge, tetramere Tetraplexe des 10merAGAs und 10mer TCTs, sowie *end-to-end Dimere*.

Das in der CGE kein Signal detektiert wurde (Messzeit bis $t = 60\text{min}$ bei 200V/cm), welches dem langsamen Prozess und damit den großen, in der DLS detektierten, netzartigen Strukturen zugeordnet werden kann, muss weiter diskutiert werden. Drei naheliegende Möglichkeiten sind auszuführen.

- **Geschwindigkeit:** Die Strukturen sind zu langsam um im vermessenen Zeitrahmen⁸² die Trennstrecke zu überwinden.
- **Sensitivität:** Eine weitere Möglichkeit ist, wie auf Grund der extremen Temperaturstabilität⁸³ zu vermuten, dass die Farbstoffeinlagerung nicht oder kaum stattgefunden hat was in Verbindung mit der geringen Menge⁸⁴ die Detektion verhinderte.
- **Integrität:** Mit der Einlagerung des YOYOs in die verbrückenden doppelhelikalen Bereiche könnten diese so geschwächt werden, dass die auftretenden Scherkräfte zu einer weitest gehenden Zerlegung der Anordnung führen (Zerstörung der strukturellen Integrität). Die entstehenden niederen Assoziate gehen mit in das Signal bei $t = 13.6\text{min}$ ein, bzw. sind für die Schulter dieses Signals zu längeren Zeiten hin verantwortlich.

Eine weitergehende Analyse dieses Phänomens ist mit den vorliegenden Daten zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

5.6.4 Zusammenfassung

In den vorhergehenden Kapiteln wurden die Möglichkeiten für den Einsatz von funktionalisierter G-DNA für die Synthese supramolekularer Strukturen eingehend beleuchtet. Ansatzpunkt waren die Sequenzen 10merAGA und 10merTCT, die in ihrem G-DNA Core Bereich die in Kapitel 5.3 charakterisierte 8mer Sequenz $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2]$ tragen. An den 3'-Enden sind die zwei Thyminbasen gegen komplementäre DNA Sequenzen TTCT bzw. TAGA ausgetauscht

⁸² Längere Messzeiten und/oder höhere Spannungen waren im verwendeten Puffersystem nicht zu realisieren (Zusammenbruch des Stromflusses).

⁸³ Ein Phänomen, dass schon im Zusammenhang mit dem Elektropherogramm des 6mers diskutiert wurde (vgl. 5.3.2).

⁸⁴ Wichtet man nach Molekulargewicht bei Annahme eines Netzes aus zehn 10mer-Einheiten die Integrale der Frequenzverteilungsfunktionen der CONTIN-Analyse so ergibt sich ein Mengenverhältnis von Komplex zu schnellen Spezies von 1:40!

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

worden. Hier sollte eine einzelne Thyminbase als „Scharnier“ zur Kompensation sterischer Spannungen dienen, worauf die folgenden Basen AGA bzw. TCT die Ausbildung der doppelhelikalen, verbindenden Strukturen ermöglichen sollten.

Bei der Charakterisierung der einzelnen, tetramere Tetraplexe bildenden Sequenzen konnte im Fall des 10merAGAs die Ausbildung einer fünften G-Ebene UV-spektroskopisch detektiert werden. Außerdem war es durch den Vergleich der Daten aus der dynamischen Streulichtspektroskopie und den hydrodynamischen Modellrechnungen möglich für das 10merTCT, wie auch das 10merAGA, eine parallele Stranganordnung nachzuweisen.

Durch die Kombination der Methoden der dynamischen Streulichtspektroskopie, hydrodynamischen Modellrechnungen und der Kapillargelelektrophorese war es möglich, eine Charakterisierung der Mischung von funktionalisierter G-DNA in Lösung durchzuführen. Dabei sind in einer 4:1 Mischung nach vorhergehendem Tempern verschiedenmolekulare Assoziate detektiert worden, was auf die erfolgreiche Verknüpfung der funktionalisierten Endbereiche der G-DNA schließen ließ. Hier konnten zwei Bereiche aufgelöst werden (vgl. Abbildung 5.40), die Strukturen entsprechen, die sich in ihrem Organisationsgrad und temperaturabhängigen Dynamik stark unterscheiden.

Bei den langsamen Strukturen sind Assoziate aus den tetrameren Tetraplexen anzunehmen, die aus ca. zehn miteinander verknüpften Einheiten bestehen. Eine diesbezüglich quantitative Auflösung des Organisationsgrades ist hier nicht möglich. Bemerkenswert ist die extreme Temperaturstabilität dieser vernetzten Komplexe, die weit über die der einzelnen tetrameren Systeme hinausgeht und auf einen kooperativen Effekt⁸⁵ zwischen den Tetraplexeinheiten schließen lässt.

Bei den dem schnellen Prozess zugeordneten Strukturen wurde ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen Einzelsträngen, nicht assoziierten tetrameren Grundeinheiten der Sequenzen 10merTCT und 10merAGA und niedermolekularen Assoziaten aus diesen Grundeinheiten nachgewiesen. Hierbei waren in der Lichtstreuung definiertere Übergänge zwischen

50.1°C und 68.8°C zu beobachten. Innerhalb dieses Temperaturbereiches erfolgte eine vollständige Verlagerung weg von den drei am Gleichgewicht beteiligten Morphologien (Einzelnachweis in der CGE bei 30°C, vgl. Abbildung 5.39) über ein Gleichgewicht zwischen Einzelsträngen und Assoziaten (bei $T = 60.2^\circ\text{C}$) hin zu nur einer Spezies, dem Einzelstrang bei 68.8°C.

Die hohe Schmelztemperatur der niedermolekularen Assoziante stützt wiederum die schon bei den höhermolekularen Anordnungen postulierten kooperativen Effekte zwischen den Tetraplexeinheiten durch die Verbindung über die funktionalisierten Enden.

In Abbildung 5.40 ist die komplexe Dynamik der Mischung aus funktionalisierte G-DNA vereinfacht dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung ist schematisch die Veränderung der Gleichgewichtslage zwischen den tetrameren Systemen des 10merAGAs und 10merTCTs über die temperaturstabileren niedermolekularen Assoziante hin zu den Einzelsträngen dargestellt. Von dimeren Strukturen sind zwei Beispiele eingefügt, das *end-to-end* Dimer und ein dimere Anordnung aus zwei *syn-anti* Tetraplexen, die an je einem Ende verknüpft sind. Bei Temperaturen von 68.8°C sind nur Einzelstränge und die Netzstruktur stabil.

⁸⁵ Wie in Kapitel 5.7 anhand der Temperaturstabilität unterschiedlicher Tetraplexsysteme diskutiert wird, setzt sich dieser kooperative Effekt aus einem elektronischen Anteil und einem sterisch/mechanischem Anteil zusammen. In der Netzstruktur und den niedermolekularen Assoziaten sind weniger freie, bei hohen Temperaturen Scherkräfte ausübende, Anfangs- und Endstücke vorhanden.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

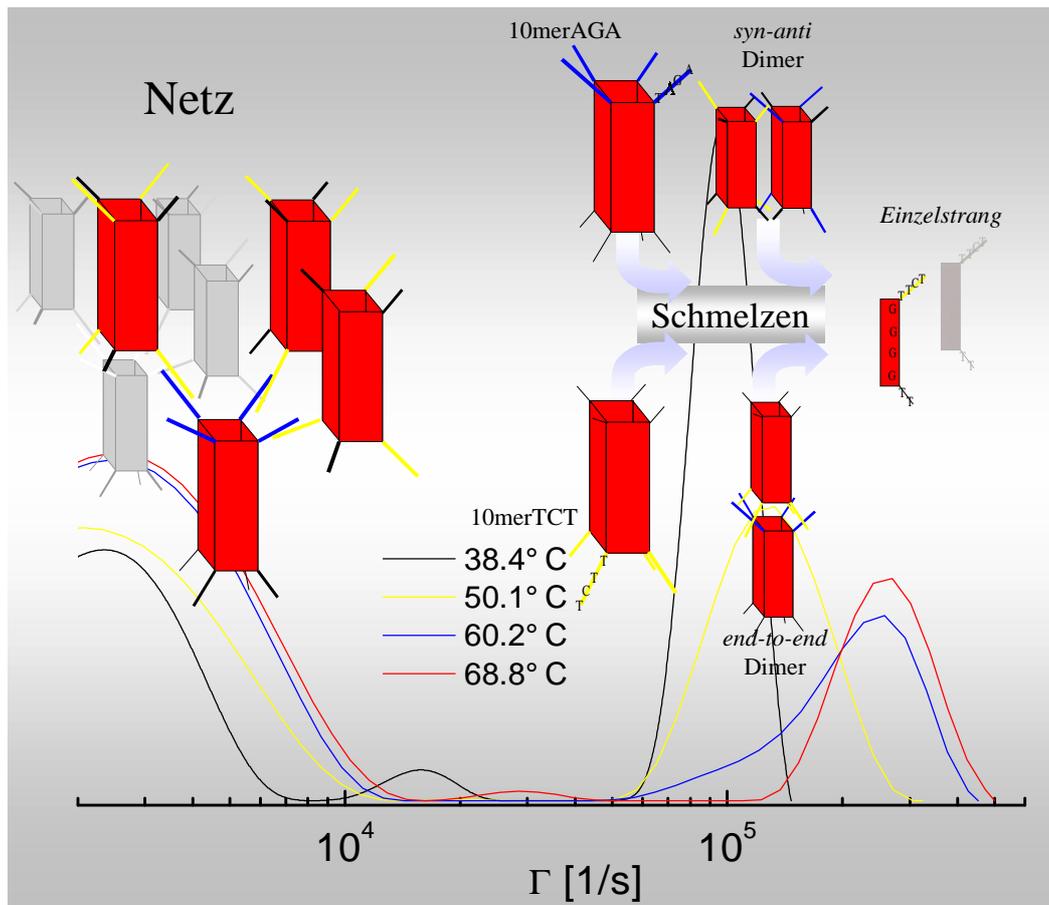


Abbildung 5.40 : Schematische Darstellung der temperaturabhängigen Prozesse der supramolekularen Nanostrukturen. Farbige Kurven: Frequenzverteilungsfunktionen der CONTIN-Analyse von Messreihe M2. Das „Netz“ ist temperaturstabil, die anderen, parallel vorliegenden Anordnungen zeigen ein komplexes temperaturabhängiges Gleichgewichtsverhalten.

5.7 UV-SPEKTROSKOPIE AN G-DNA

Mit der UV-Absorptionsspektroskopie kann die gegenionen- und strukturabhängige Stabilität von DNA in Lösung untersucht werden. Gleichzeitig sind über die Analyse der Schmelz- und Reaggregationskurven Aussagen zur Thermodynamik und Morphologie möglich (vgl. Kapitel 2.5).

Wie aus den temperaturabhängig aufgenommenen Absorptionswerten allgemeine Zusammenhänge zwischen Sequenz, Struktur, Stabilität und Lösungsbedingungen (Ionenart und Ionenkonzentration) ermittelt werden können, wird in Kapitel 5.7.1 und Kapitel 5.7.2. ausgeführt. Anschließend wird in Kapitel 5.7.4 (14mer) und Kapitel 5.7.5 (24mer) die Methodik auf die Charakterisierung polymorpher Sequenzen angewendet.

5.7.1 Einleitung

Die UV-Spektroskopie wird im Rahmen dieser Arbeit als ergänzende Methode zur vollständigen Beschreibung Guanin-reicher DNA, bzw. den daraus gebildeten Tetraplexen eingesetzt. Mit dieser Methode wird Neuland in Bezug auf die Charakterisierung von G-DNA betreten, bzw. es liegen bisher nur Untersuchungen zu rein intramolekularen Tetraplexen vor⁸⁶ [Mer98]. Neben Untersuchungen an einem doppelhelikalen Referenzsystem ist zunächst zu überprüfen, ob die Daten aus der UV-Spektroskopie mit den Daten aus den DLS-Messungen in Einklang stehen, d.h. ob es möglich ist, mit beiden Methoden⁸⁷ auch Aussagen über die gleiche Struktur zu erhalten. In Tabelle 5.14 ist eine Übersicht über die vermessenen Sequenzen gegeben.

⁸⁶ Die in [Mer98] beschriebenen Untersuchungen an einem tetrameren Tetraplex der polymorphen Sequenz $d[(TG_4)_4]$ können auf Grund der ungewöhnlichen Probenpräparation und experimentellen Parameter (Ionenkonzentration 1mM an NaCl) nur sehr bedingt in die folgenden Betrachtungen mit einbezogen werden.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Sequenz	Strukturtyp	exp. Schmelztemperaturen		exp. Daten	
		50/100mM KCl	50/100mM NaCl	DLS	CGE
(AT) ₈	<i>B-DNA</i>	O / O	37.6°C / O	O	O
G ₂ T ₂ G ₂ TGTG ₂ T ₂ G ₂	<i>intramolekular</i>	46.7°C / O	23.0°C / O	X	O
(T ₂ G ₄) ₄	<i>polymorph</i>	O / O	47.2°C / 48.8°C	X	X
T ₂ G ₄ T ₂ G ₄ T ₂		76.4°C / 78.0°C	47.1°C / 45.0°C	X	X
UG ₄ U	<i>tetramer- intermolekular</i>	- / O	≈90°C / O	X	X
T ₂ G ₄ T ₂		- / O	53.0°C / 55.0°C	X	X
T ₂ G ₄ TAGA		O / O	55.6°C / O	X	X
T ₂ G ₄ TTCT		O / O	43.0°C / O	X	X
T ₂ G ₄ T ₆		≈90°C / O	43.1°C / O	O	O
T ₂ G ₄ TAGA/TCT 1:1	<i>Netz aus B/G-DNA</i>	O / O	O / 45.9°C ⁸⁸	X	X

Tabelle 5.14 : Übersicht über die UV-spektroskopisch vermessenen Sequenzen. Bei den polymorphen und funktionalisierten Sequenzen sind die Schmelztemperaturen angegeben, sobald ein Schmelzverhalten detektiert wurde, unabhängig von der vorliegenden Struktur. X = Daten vorhanden (nicht alle Ionenstärken), O = nicht vorhanden, - = kein Schmelzen zu beobachten (bis T = 95°C).

Die selbstkomplementäre Sequenz d[(AT)₈] bildet eine doppelhelikale *B-DNA* Struktur aus. Mit ihr sind erste Schmelz- und Assoziationskurven aufgenommen worden, wobei die Änderung des Absorptionverhaltens bei 260nm und 297nm beobachtet wurde. Hierdurch besteht eine Vergleichsmöglichkeit von den Schmelzprofilen einer klassischen Watson-Crick Doppelhelix mit denen der G-DNA.

Um Konzentrationseffekte ausschließen zu können, werden erste Vergleiche zwischen den Daten aus DLS und UV-Spektroskopie anhand von rein *intramolekularen Tetraplexen* vorgenommen (vgl. Kapitel 5.2.2). Neben dem 15mer, zu dem umfangreiche DLS-Daten aus

⁸⁷ Da in der statischen depolarisierten Streulichtintensität und bei den kooperativen Strukturen der DNA in den Absorptionswerten der UV-Messungen die gleiche Information enthalten ist (vgl. Kapitel 2.3.6 und 2.5, sowie [Bol98]), muss sich bei Vorliegen identischer Strukturen auch ein vergleichbares Temperaturverhalten der beiden Messgrößen zeigen.

⁸⁸ Die Schmelztemperatur ist beim ersten Heizen bestimmt worden. Nach teilweiser Reaggregation kann im zweiten Heizzyklus kein Schmelzverhalten beobachtet werden.

[Bol98] zur Verfügung stehen, werden zu diesem Zweck die in dieser Arbeit ermittelten Daten der intramolekularen Struktur der polymorphen Sequenz des 24mers herangezogen (vgl. Kapitel 5.2 und [Wan94]).

Die gezielt ausgewählten, ausschließlich *tetramere Tetraplexe* bildenden Sequenzen bieten die Gelegenheit, Längeneffekte des 3'-Endes auf die Schmelztemperatur zu untersuchen und mit Literaturdaten aus CD-Messungen zu vergleichen [Kal93]. Zudem sind mit dem 6mer (d[UG₄U]) und dem 10merAGA (d[T₂G₄TAGA]) Sequenzen vorhanden, die zusätzliche tetramere U- oder G-Ebenen ausbilden können, was entsprechenden Einfluss auf die T_mWerte haben wird. Mit diesen Oligonukleotiden ist es außerdem möglich, für tetramere Systeme typische Schmelz- und Reaggregationskurven aufzunehmen.

Die G-DNA Sequenzen, die streulichtspektroskopisch über einen weiten Temperaturbereich charakterisiert wurden (PCS-Messungen vom 6mer, 8mer, 10merAGA und 10merTCT), werden in Ergänzung zu den intramolekularen Sequenzen für vergleichende Betrachtungen zwischen dem temperaturabhängigen Schmelzverhalten in der DLS und der UV-Spektroskopie eingesetzt.

Die *polymorphen Sequenzen* des 14mers und des 24mers und die Möglichkeiten der UV-Spektroskopie bezüglich der Unterscheidung zwischen den einzelnen Strukturtypen werden in Kapitel 5.7.4 und Kapitel 5.7.5 gesondert vorgestellt.

Die funktionalisierten G-DNA Sequenzen, die *Netzstrukturen* ausbilden sollen, dienen zu ersten Voruntersuchungen bezüglich der Generierung supramolekularer Nanostrukturen. Die Ergebnisse wurden schon in Kapitel 5.6 diskutiert und werden im Folgenden nicht vertieft.

5.7.2 Vergleich der Daten aus DLS und UV-Spektroskopie

Die intramolekularen Tetraplexe der Sequenzen d[(T₂G₄)₄] und d[G₂T₂G₂TGTG₂T₂G₂] zeigen ein besonders einfaches Schmelz-/Assoziationsverhalten in der UV-Spektroskopie [Mer98]. Da die in den UV-Messungen verwendeten DNA-Konzentrationen um ca. drei Dekaden niedriger liegen als in den zur eigentlichen Strukturbestimmung durchgeführten DLS- und NMR-Messungen, werden die Schmelzkurven aus den depolarisierten statischen Intensitäten der

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

DLS mit den Schmelzkurven aus der UV-Spektroskopie verglichen. Würden sich in den unterschiedlich konzentrierten DNA-Lösungen unterschiedliche Tetraplexstrukturen bilden, so müssten sich auf Grund der verschiedenen Anzahl an G-Ebene die Schmelzprofile unterscheiden.

Die Auftragungen zu den intramolekularen Tetraplexen des Aptamers und des 24mers sind in Abbildung 5.6 und Anhang_Abb 2 dargestellt. Der Vergleich der Schmelzprofile aus beiden Methoden ergibt eine direkte Übertragbarkeit für den Fall der intramolekularen Tetraplexe. Diese Übereinstimmungen zeigen, dass für intramolekulare Tetraplexe eine Bestimmung des Schmelzverhaltens und der Schmelztemperatur mittels der UV-Spektroskopie möglich ist und dass mit beiden Methoden das Schmelzen der gleichen Tetraplexstruktur beobachtet werden kann (vgl. Kapitel 5.2.2).

Da für die tetrameren Tetraplexe keine Daten über das Temperaturverhalten der statischen depolarisierten Intensitäten bei hohen Temperaturen zur Verfügung stehen, werden die Abweichungen im Stokes-Einstein Verhalten der polarisierten Messungen mit den Daten der UV-Messungen verglichen. Bei den vermessenen Tetraplexen sind keine Isomere mit anderer Stöchiometrie/Anzahl an G-Ebenen möglich. Außerdem sind bei den hohen Konzentrationen in der DLS in keinem Fall Anzeichen für eine Stapelbildung zwischen einzelnen Quadruplexen beobachtet worden. Damit ist bei den niedrigen DNA Konzentrationen der UV-Messungen sicher davon auszugehen, dass nur das Schmelzen tetramerer Tetraplexe zu beobachten ist [Eim92]. Nur das Gleichgewicht zwischen Quadruplex und Einzelstrang kann bei niedrigeren DNA Konzentrationen in Richtung Einzelstrang gegenüber den DLS-Messungen verschoben sein.

In Tabelle 5.15 sind die Schmelztemperaturen der UV-Messungen den Temperaturen gegenübergestellt, bei denen in den Stokes-Einstein Auftragungen Abweichungen zu verzeichnen waren. Es zeigen sich in allen Fällen sehr gute Übereinstimmungen der Daten aus den beiden Messmethoden. Bezieht man die Vergleiche der Schmelzprofile aus DDLS und Absorptionmessungen (15mer und 24mer) mit ein, kann davon ausgegangen werden, dass mit der UV-Spektroskopie im Falle von intramolekularen und tetrameren intermolekularen Tetraplexen

die Schmelztemperatur der in der Lichtstreuung detektierten Quadruplexe bestimmt werden kann.

Sequenz	Strukturtyp	T _m UV c(DNA) ≈ 3 μM - 70 μM		≈T _m PCS c(DNA) ≈ 0.6mM - 3mM
		50/100mM KCl	50/100mM NaCl	50/100mM NaCl
G ₂ T ₂ G ₂ TGTG ₂ T ₂ G ₂ (T ₂ G ₄) ₄	intramolekular	46.7°C / O O / O	23.0°C / O 47.2°C / #	O / 23°C* 49°C ⁺ / #
T ₂ G ₄ T ₂ T ₂ G ₄ TAGA T ₂ G ₄ TTCT	tetramer- intermolekular	- / O O / O O / O	53.0°C / 55.0°C 55.6°C / O 43.0°C / O	53°C ^X / O - / 52°C 44°C / -

Tabelle 5.15 : Vergleich der Schmelztemperaturen ermittelt durch UV-Spektroskopie und polarisierter Lichtstreuung. O = nicht vorhanden, # = andere Struktur, * DDLS-Daten aus [Bol98] in Abbildung 5.6, ⁺ DDLS-Daten in Abbildung 5.6-rechts, ^X Daten aus [Nie96].

Umgekehrt können temperaturabhängige Veränderungen in der Lichtstreuung sofort mit vorher in der schnell durchzuführenden UV-Spektroskopie bestimmten Phänomenen in Zusammenhang gebracht werden. Hierdurch ist es möglich, das komplexe Temperaturverhalten der funktionalisierten G-DNA weitergehend zu interpretieren (vgl. Kapitel 5.6). Zudem können die zeitaufwendigen depolarisierten Streulichtexperimente zur Bestimmung der Rotationsrelaxationszeit auf ein Mindestmaß an Messpunkten unterhalb der Schmelztemperatur begrenzt werden.

5.7.3 Einfluss der DNA-Sequenz und der Gegenionen auf die Stabilität

Der Einfluss der DNA-Sequenz auf die Schmelztemperatur und damit auf die Stabilität der Tetraplexe wird im Folgenden untersucht. Es werden die Ergebnisse der intramolekularen Quadruplexe des 15mers mit zwei G-Ebenen, des 24mers mit drei G-Ebenen und die tetrameren Tetraplexe mit vier G-Ebenen vorgestellt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die intramolekularen Strukturen werden in KCl und NaCl UV-spektroskopisch vermessen. Bei den Tetrameren wird auf Grund der hohen Schmelztemperatur des 12mers ($d[T_2G_4T_6]$ - $T_m > 90^\circ\text{C}$) und des Ausbleibens des Schmelzens beim 6mer ($d[UG_4U]$) und 8mer ($d[T_2G_4T_2]$) auf weitere Untersuchungen an anderen Sequenzen in KCl verzichtet. Die Schmelzkurven, bzw. die temperaturabhängig aufgenommenen Absorptionswerte, der NaCl- und KCl-Systeme des 6mers und des 8mers sind in Abbildung 5.10 gezeigt, das Schmelz- und Reaggregationsverhalten des 8mers in NaCl, welches exemplarisch für alle tetrameren Tetraplexe im Konzentrationsbereiche bis ca. $c(\text{DNA}) \approx 70\mu\text{M}$ ist, ist in Abbildung 5.41-rechts oben dargestellt. In Tabelle 5.16 ist eine vergleichende Übersicht über die hier diskutierten Sequenzen enthalten.

Sequenz	Strukturtyp	T_m UV	
		50mM KCl	50mM NaCl
$G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2$ (T_2G_4) ₄	intramolekular	46.7°C [7.4] O	23.0°C [8.7] Ø 47.2°C [3-22.9]
UG₄U $T_2G_4T_2$ T_2G_4 TAGA T_2G_4 TTCT $T_2G_4T_6$	tetramer- intermolekular	- [27] - [15] O O $\approx 90^\circ\text{C}$ [67]	$\approx 90^\circ\text{C}$ [68] 53.0°C [15.2] / 55.0°C [14.6] 55.6°C [13] 43.0°C [14] 43.1°C [27]
T_2G_4 T_4G_4 T_8G_4	tetramer- intermolekular	- - -	60.4 [1] 200mM NaCl 45.3 [1] 200mM NaCl 42.1 [1] 200mM NaCl

Tabelle 5.16 : Vergleich der Schmelztemperaturen von intra- und intermolekularen Tetraplexen ermittelt durch UV-Spektroskopie. O = Daten nicht vorhanden, - = kein Schmelzen zu beobachten. In [] die jeweilige DNA Konzentrationen in μM . *Kursiv* gedruckte Werte in 100mM NaCl. Daten der letzten Zeile aus [Kal93].

Innerhalb der intramolekularen Tetraplexe lässt sich hervorragend der Einfluss von Ionenart und Anzahl der G-Ebenen auf die Schmelztemperatur zeigen. Das 15mer wird in KCl und NaCl vermessen. Es ergibt sich eine Schmelztemperatur von 46.7°C in KCl vs. 23°C in NaCl, was in Einklang mit der besseren Stabilisierung von Tetraplexen durch Kaliumionen steht

(vgl. Abbildung 5.41-links unten). Im direkten Vergleich zwischen dem 15mer in NaCl ($T_m = 23^\circ\text{C}$) und dem 24mer in NaCl ($T_m = 47.2^\circ\text{C}$) zeigt sich die Auswirkung einer weiteren G-Ebene auf die Schmelztemperatur (vgl. Abbildung 5.41-rechts unten). Die Erhöhung des T_m Wertes um 24°C kann bei diesen intramolekularen Quadruplexen nicht nur mit der Ausbildung einer weiteren Guaninebene begründet werden. In den Tetraplexstrukturen des 15mers und des 24mers unterscheiden sich die Loopanordnungen und die Basensequenzen in den Loopbereichen. Damit kann die Auswirkung der inneren Spannung auf die Schmelztemperatur nicht näher quantifiziert werden.

Bei den tetrameren Tetraplexen zeigen sich in KCl nur bei der längsten Sequenz $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_6]$, dem 12mer, bei Temperaturen oberhalb von 75°C Änderungen in der Absorption, die auf ein Schmelzen schließen lassen und extrapoliert zu einem T_m Wert von $\approx 90^\circ\text{C}$ führen. Damit scheint die Länge der endständigen Basensequenz von Bedeutung für die Schmelztemperatur zu sein. Auf Grund der guten Stabilisierung der G-Ebenen in KCl ist eine quantitative Bewertung über einen Vergleich mit den anderen Sequenzen nicht möglich. Bei der homologen Sequenz des 8mers ist in KCl kein Schmelzen zu detektieren.

Bei den Systemen in NaCl lassen sich die Unterschiede in der Schmelztemperatur des 8mers und des 12mers direkt auf die Länge der 3'endständigen Thyminbasensequenz zurückführen. Die Abnahme von 53.0°C (8mer mit T_2) auf 43.1°C (12mer mit T_6) beruht auf den, sich destabilisierend auswirkenden 3'endständigen Thyminbasen. Dass die Sequenzen der Endbereiche⁸⁹ einen sehr komplexen Einfluss auf die Schmelztemperatur und damit Stabilität ausüben und eine Extrapolation nur innerhalb einer homologen Reihe (identische Basen im variablen Endbereich) sinnvoll ist [Kal93], ist unter Einbezug des 10merTCTs in die Betrachtungen verständlich. Die in Tabelle 5.16 aufgeführten Literaturwerte zu $d[\text{T}_X\text{G}_4]$ ($X=2,4,8$) zeigen den nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Länge der endständigen Thyminbasen und der Schmelztemperatur auf. Bei der gezeigten homologen Reihe unterscheiden sich die Schmelztemperaturen des T_4G_4 und des T_6G_4 um 3.2°C . Im Gegensatz dazu sind die Schmelztemperaturen der nicht homologen Reihe des 10merTCTs und des 12mers nahezu identisch (43.1°C 12mer vs. 43.0°C 10merTCT).

⁸⁹ Dabei unterscheiden sich nach [Kal93] die Effekte der 5' und 3' Endbereiche voneinander.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bezieht man das 10merAGA mit in die Diskussion über die Auswirkung der Länge und Sequenz der 3'endständigen Basen ein, bietet sich der Vergleich des 10merAGAs mit dem gleichlangen 10merTCT an. Der Schmelzpunkt steigt von 43.0°C (10merTCT) auf 55.6°C beim 10merAGA an ($\Delta T = 12.6^\circ\text{C}$). Dieses Verhalten ist mit der Ausbildung einer weiteren G-Ebene (3'Ende des 10merAGAs) zu begründen. Da ebenfalls zwei Thyminbasen („kleine“ Pyrimidinbasen - TCT) gegen zwei Adeninbasen („voluminöse“ Purinbasen - AGA) ausgetauscht wurden, kann die Stabilisierung durch die zusätzliche G-Ebene teilweise durch sterische Hinderung kompensiert werden. Für diese Auswirkung der voluminösen Purinbasen spricht außerdem, dass in [Mer98] an intramolekularen Tetraplexen ein Unterschied in der Schmelztemperatur von mindestens 17°C/G-Ebene beschrieben wird, was deutlich über dem hier ermittelten Wert von 12.6°C liegt.

Im letzten Schritt werden nun die Basen *und* die Sequenzlänge am 3'Ende variiert. Die Sequenz des 6mers stellt als RNA und auf Grund der geringen Länge einen Sonderfall dar. Die Schmelztemperatur des 6mers liegt mit $\approx 90^\circ\text{C}$ in NaCl weit oberhalb aller anderen Sequenzen. Der hohe T_m Wert wird z.T. durch die in Abbildung 5.11 gezeigte Ausbildung einer U-Ebene am 5'Anfang bewirkt [Che92]. Von den „nicht-G“ Basen ist nur eine (das Uracil am 3'Ende) nicht an stabilisierenden Ebenen beteiligt und als „freier“, destabilisierender 3'Überhang vorhanden. Da die ausgebildete U-Ebene nur über insgesamt vier Wasserstoffbrücken verfügt, ist ein geringerer Einfluss auf den T_m Wert zu vermuten als bei einer zusätzlichen G-Ebene (mit acht Wasserstoffbrücken innerhalb einer Ebene). Damit kann die extreme Erhöhung der Schmelztemperatur, z.B. gegenüber dem 10merAGA, das fünf G-Ebenen aufweist, zum großen Teil auf den sehr kurzen 3'Endbereich zurückgeführt werden.

Mit diesen Beobachtungen bezüglich des Einflusses der 3'Endbereiche auf die Schmelztemperatur und damit Stabilität von Quadruplexen lassen sich die ungewöhnliche Temperaturstabilität der (nieder- und höhermolekularen) Aggregate der 4:1 Mischung des 10merTCTs mit dem 10merAGA erklären. Sind die komplementären Endbereiche verknüpft, stehen diese nicht mehr als freie, destabilisierende 3'Enden zur Verfügung. Damit können die Schlussfol-

gerungen⁹⁰, die in Kapitel 5.6.3 bezüglich kooperativer Effekte diskutiert worden sind, UV-spektroskopisch verifiziert werden. Zumal sich in der hier UV-spektroskopisch vermessenen 1:1 Mischung ebenfalls nach einmaligem Aufheizen sehr temperaturstabile Aggregate bilden.

Mit Ausnahme des untersuchten Einflusses der Länge der endständigen Basensequenz ist eine Übersicht der bisher diskutierten Zusammenhänge in Abbildung 5.41 dargestellt.

Die hervorragenden Übereinstimmungen der Temperaturabhängigkeit der Daten aus der dynamischen Streulichtspektroskopie und den UV-Messungen sind am Beispiel des Aptamers (Vergleich der statischen Intensität des depolarisierten Streulichtes mit den Absorptionswerten) und des 8mers (Vergleich der Abweichungen im Stokes-Einstein Verhalten mit den Absorptionswerten) im oberen Teil der Abbildung 5.41 präsentiert.

An den rein intramolekularen Tetraplexen des 15mers und des 24mers sind die Abhängigkeiten des T_m Wertes von der Ionensorte (Aptamer in NaCl und KCl unten links) und der Anzahl der zu schmelzenden G-Ebenen (Aptamer vs. 24mer in NaCl unten rechts) gezeigt.

⁹⁰ Bezogen auf die Annahme der erfolgreichen Ausbildung verbrückender Bereiche zwischen den funktionalisierten G-DNA Sequenzen. Damit fehlen diese Sequenzabschnitte und üben keine Scherkräfte mehr aus. Dieses Verhalten ist der mechanische Anteil am die Assoziat stabilisierenden kooperativen Effekt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

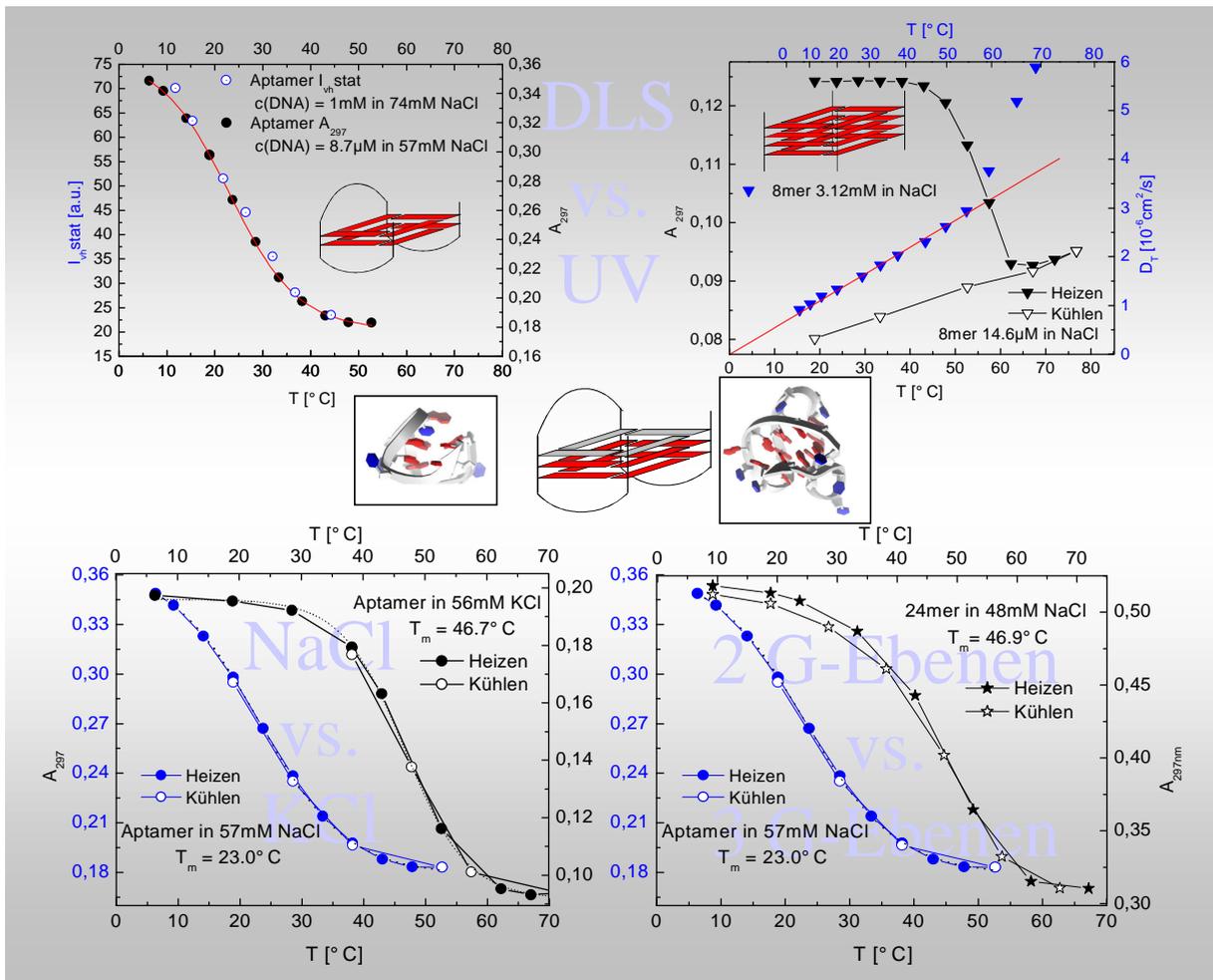


Abbildung 5.41 : Oben: Vergleich der Daten des Aptamers und des 8mers aus der dynamischen Lichtstreuung mit Daten zum Schmelzverhalten aus der UV-Spektroskopie. Unten: T_m Werte und Schmelzverhalten von intramolekularen Tetraplexstrukturen in Abhängigkeit von der Ionenart (links) bzw. Anzahl der G-Ebenen (rechts).

Vergleicht man die gezeigten Reaggregationskurven der intramolekularen Spezies (Abbildung 5.41-unten) mit der des intermolekularen tetrameren Tetraplexes (Abbildung 5.41-rechts oben), so fallen deutliche Unterschiede im Assoziationsverhalten auf. Damit lassen sich allein anhand des Reaggregationsverhaltens *intramolekulare* und *tetramere intermolekulare* Tetraplexe eindeutig unterscheiden. Die sich daraus ergebenden Möglichkeiten zur Abschätzung der vorliegenden Tetraplexstruktur *polymorpher* Sequenzen werden, wie auch die nach Kapitel 2.5 aus den Schmelzkurven zugänglichen thermodynamischen Daten, in den beiden nächsten Kapitel diskutiert.

Da bei der Bildung von Tetraplexen in Lösung eine Beziehung zwischen der Struktur, der Dynamik (Gleichgewichtslage zwischen verschiedenen Morphologien) und der DNA Konzentration vermutet [Wil94], bzw. bewiesen [Eim92] wurde, müssen die polymorphen Sequenzen gesondert behandelt werden. Die DNA Konzentrationen bei den beiden Methoden DLS und UV-Spektroskopie unterscheiden sich um bis zu drei Dekaden. Aus diesem Grund ist es notwendig, UV-Messungen ausgehend von annähernd den gleichen DNA Konzentrationen wie in der DLS durchzuführen. Die mit diesen hohen DNA Konzentrationen aufgenommenen Schmelz- und Reaggregationsprofile sollten exakt zu den in der DLS detektierten Spezies gehören. Auf Basis dieser Ergebnisse sind dann Konzentrationsreihen in der UV-Spektroskopie möglich, wobei Veränderungen im Schmelz-/Assoziationsverhalten und der Amplitude auf konzentrationsabhängige Strukturänderungen der polymorphen Sequenzen schließen lassen. In den Versuchsreihen wird dabei neben der DNA Konzentration auch die Ionenart und die Ionenkonzentration variiert.

Gleichzeitig unterscheiden sich die möglichen Strukturtypen der polymorphen Sequenzen durch die Anzahl der jeweiligen G-Ebenen. Beim 14mer liegen bei einer dimer-Hairpin Struktur vier G-Ebenen vor, bei der gestreckten tetrameren Anordnung acht. Das 24mer besitzt demnach drei bis vier G-Ebenen in der intramolekularen Struktur (vgl. Kapitel 5.2), acht als dimer-Hairpin und 16 Ebenen im tetrameren Tetraplex. Auf Grund der Unterschiede in der Anzahl der stabilisierenden G-Ebenen ist ein großer Sprung in der Schmelztemperatur zwischen den unterschiedlichen Isomeren zu erwarten (vgl. [Che92] mit $\Delta T \geq 17^\circ\text{C}$ pro zusätzlicher G-Ebene). Dieses Verhalten sollte die Charakterisierung von Gleichgewichten in Lösung ermöglichen, da selektiv das Schmelzen einer Spezies beobachtbar ist.

5.7.4 UV-Spektroskopie an der polymorphen Sequenz ($\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2$) (14mer)

Das DNA-Oligonukleotid mit der Sequenz $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2]$ (14mer) kann auf Grund der zwei Guanin-reichen Basenabschnitte neben einer gestreckten tetrameren Anordnung als dimer-Hairpin vorliegen. Beide Morphologien sind in Kapitel 5.5.2 in Abhängigkeit von der Ionenart und Ionenkonzentration nachgewiesen worden. Die dort diskutierten UV-Daten werden im Folgenden ausführlich vorgestellt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Erster sicherer Bezugspunkt für den Vergleich der DLS- und UV-Daten ist das 14mer in 48mM NaCl und 55mM KCl. In beiden Ansätzen sind in Kapitel 5.5.2 ausschließlich dimer-Hairpinstrukturen nachgewiesen worden. In Tabelle 5.17 sind die Messreihen der UV-Spektroskopie aufgelistet.

Sequenz	c(DNA) - T _m UV	
	55mM KCl	48mM NaCl
T ₂ G ₄ T ₂ G ₄ T ₂	[7.8] – 77.8°C	[9.1] – 43.5°C [#]
	[21.6] – 77.6°C	
	[52.6] – 75.1°C	[35.7] – 46.9°C
	[152] – 75.6°C	
	[383] – 76.0°C	[351] – 47.2°C

Tabelle 5.17 : Vergleich der Schmelztemperaturen des 14mers in Abhängigkeit von der Ionenart. In [] die jeweiligen DNA Konzentrationen in μM . # = andere Struktur.

In Abbildung 5.42-links ist exemplarisch eine Schmelz- und Reaggregationskurve mit $c(\text{DNA}) = 7.8\mu\text{M}$ in 55mM KCl gezeigt. Die Konzentration ist vergleichbar mit den Ansätzen des 8mers und den DNA-Lösungen der intramolekularen Tetraplexe in Abbildung 5.41. Zunächst fällt der signifikante Unterschied im Reaggregationsverhalten (langsame, unvollständige Reaggregation) gegenüber dem 8mer (tetramerer Tetraplex – keine Reaggregation) und dem 15mer, bzw. 24mer (intramolekulare Quadruplexe – instantane Reaggregation) auf. Weiterhin liegt der über alle Konzentrationen ermittelte Mittelwert des Schmelzpunktes mit $T_m = 76.4^\circ\text{C}$ (vgl. Tabelle 5.17) weit unterhalb der für tetramere Tetraplexe in KCl gemessenen ($\geq 90^\circ\text{C}$ bei vier G-Ebenen).

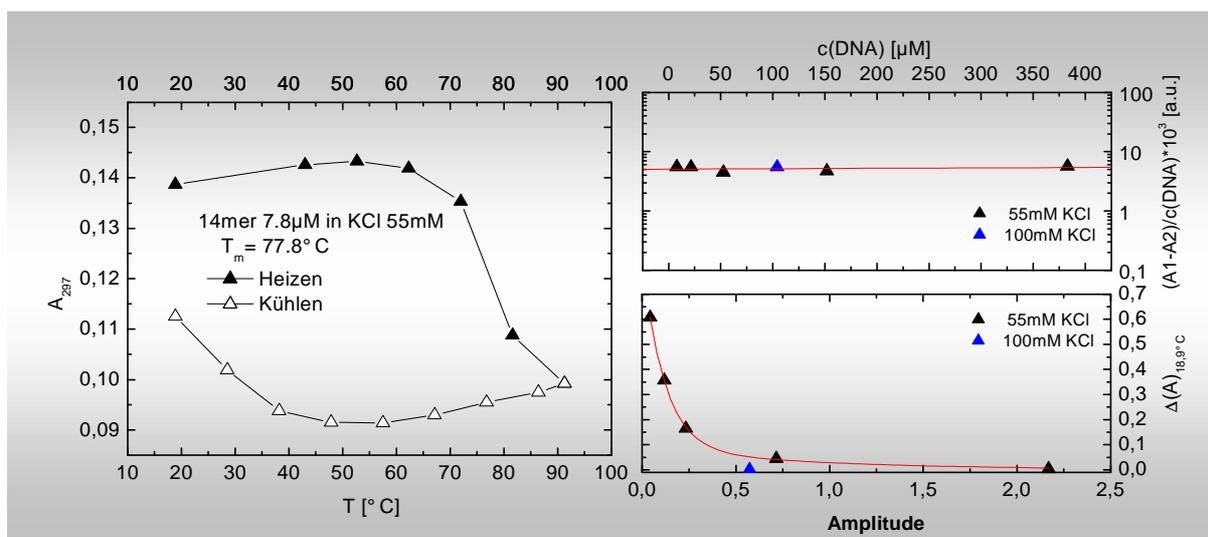


Abbildung 5.42 : Schmelzverhalten des 14mers in 55mM und 100mM KCl in Abhängigkeit von der DNA Konzentration. Links: Schmelz- und Reaggregationskurve mit $c(\text{DNA}) = 7.8\mu\text{M}$. Rechts-oben: Differenz der Plateauwerte A_1 und A_2 normiert auf die DNA Konzentration. Rechts-unten: Differenz der Absorption bei $T = 18.9^\circ\text{C}$ vor dem Schmelzen und nach dem Abkühlen normiert auf die jeweilige Amplitude der sigmoidalen Schmelzkurven.

Berücksichtigt man, dass beim 14mer, unter Annahme eines tetrameren Tetraplexes, acht G-Ebenen die Struktur stabilisieren (bei den Sequenzen in Kapitel 5.7.3 nur vier bis fünf), kann sicher davon ausgegangen werden, dass ein gespannter Tetraplex mit höchstens⁹¹ vier G-Ebenen vorliegt.

Die Abbildung 5.42-rechts oben zeigt, dass die Auftragung der Differenz der Plateauwerte der sigmoidalen Kurvenanpassung an die Schmelzkurven, normiert auf die DNA Konzentration, bei allen Messreihen identisch ist. D.h. dass, normiert auf die Konzentration an gelösten Einzelsträngen, immer die gleiche Anzahl an G-Ebenen schmilzt. Da in der DLS (mM-Konzentrationsbereich) eine dimer-Hairpinstruktur nachgewiesen worden ist, kann mit den UV-Messungen, in Verbindung mit den in Tabelle 5.17 über alle Konzentrationen konstanten T_m Werten, diese Strukturaussage bis in den μM -Konzentrationsbereich sicher erweitert werden.

⁹¹ Wie schon in Kapitel 5.5.2 bemerkt wurde, ist bei Loopkonformationen der Einbezug einer Guaninbase mit in den Loopbereich denkbar. Ein solches Verhalten wird z.B. beim 24mer (intramolekularer Tetraplex) beobachtet [Wan94] und führt zur Ausbildung von nur drei G-Ebenen.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zudem ist in Abbildung 5.42-rechts unten eine Konzentrationsabhängigkeit im Reaggregationsverhalten zu erkennen, wobei diese bei niedrigen Konzentrationen stark verlangsamt ist. Phänomenologisch liegt also mindestens ein bimolekularer Mechanismus vor, der sich, wie in Abbildung 5.43 gezeigt, deutlich von dem bimolekularen Aggregationsmechanismus (selbst)komplementärer DNA unterscheidet. Obwohl die DNA Konzentration der selbstkomplementären Sequenz um den Faktor 10 geringer ist als bei dem 14mer, reagregiert die aufgeschmolzene Struktur instantan [Bla96][Leh94].

Um den Einfluss der Ionenstärke auf die Reaggregation und die Schmelztemperatur zu untersuchen, werden zwei UV-Messungen mit $c(\text{DNA}) = 104\mu\text{M}$ und $115\mu\text{M}$ ⁹² in 100mM KCl durchgeführt. Die ermittelte Schmelztemperatur liegt mit 78.9°C um 1.5°C über dem Mittelwert der Messreihen in 55mM KCl und entspricht dem Effekt der beim 8mer in 50mM NaCl bzw. 100mM NaCl beobachtet worden ist (53.0°C vs. 55.0°C). Die mit dem System in 55mM KCl identische Differenz der Plateauwerte (A1-A2) zeigt, dass sich in beiden Ionenstärken die gleiche Anzahl an G-Ebenen und damit identische Strukturen ausgebildet haben. Das Reaggregationsverhalten in 100mM KCl unterscheidet sich jedoch deutlich von dem in 55mM KCl.

Wie in Abbildung 5.43-rechts zu erkennen ist, liegen die Schmelzkurven des 14mers in 55mM KCl (schwarze Kurve) und in 100mM KCl (blaue Kurve) dicht zusammen, die höhere Ionenstärke führt jedoch zu einem steileren Abfall der Absorptionswerte im Bereich der Schmelztemperatur. Die Reaggregation verläuft deutlich schneller, obwohl die DNA Konzentration mit $c(\text{DNA}) = 104\mu\text{M}$ noch $\approx 30\%$ niedriger ist als in dem langsam aggregierenden 55mM KCl Ansatz.

Da die Anzahl der G-Ebenen in beiden Ionenstärken gleich ist (vgl. Amplitudenauswertung in Abbildung 5.42-rechts oben) kann nur die bessere Stabilisierung eines geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustandes in 100mM KCl als Erklärung für dieses Verhalten in Frage kommen. Derartige Effekte wurden in [Hog97] an intramolekularen Tetraplexen beschrieben.

⁹² Beide Messungen ergeben, normiert auf die DNA Konzentration, identische Werte, daher wird auf die Auftragung der Messung mit $c(\text{DNA}) = 115\mu\text{M}$ verzichtet.

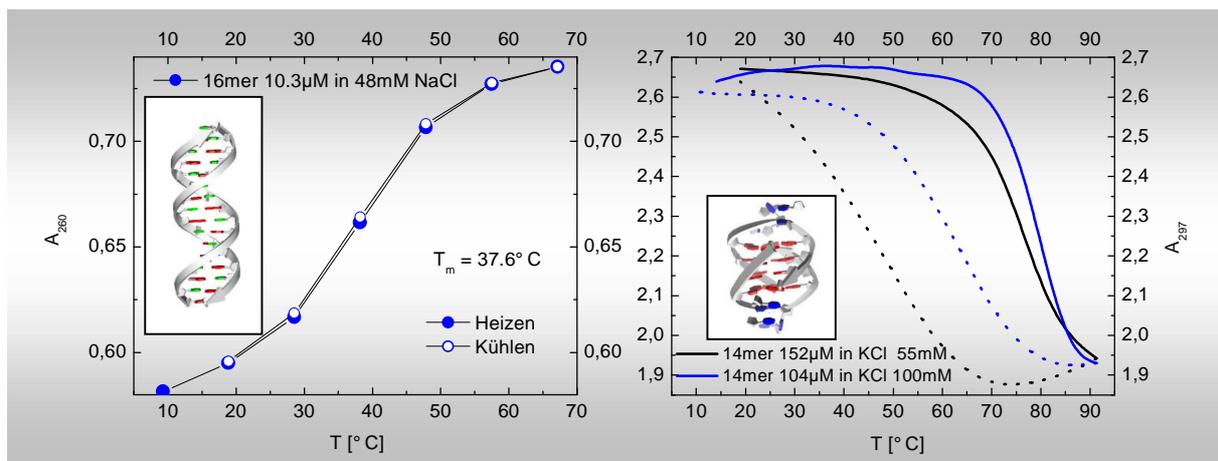


Abbildung 5.43 : Links: Schmelz- und Reaggregationskurven einer 16 Basen langen selbstkomplementären DNA Sequenz $d[(AT)_8]$. Rechts: Schmelz- (durchgezogene) und Reaggregationskurven (gestrichelte Linien) des 14mers in 55mM KCl (schwarz) und in 100mM KCl (blau).

Bezieht man die Ergebnisse der NaCl Systeme mit ein, ergeben sich im Vergleich zu den KCl Systemen signifikante Unterschiede im temperaturabhängigen Verhalten. In Abbildung 5.44-links ist eine Schmelz-/Reaggregationskurve in NaCl den Messungen in KCl exemplarisch gegenübergestellt. Rechts sind die Ergebnisse der Amplitudenauswertung gezeigt.

Im Schmelz- und Reaggregationsverhalten zeigt sich zwischen den unterschiedlichen Kationensorten neben den Unterschieden in der Schmelztemperatur (47.2°C in NaCl vs. 76.0°C in KCl) und in dem Ausmaß der Reaggregation (vollständig in KCl, nur teilweise in NaCl), auch eine deutlich größere Amplitude in NaCl gegenüber beiden Ionenstärken an KCl (vgl. Abbildung 5.44-rechts, rote Messpunkte mit $c(\text{DNA}) = 35.7\mu\text{M}$ und $351\mu\text{M}$).

Die Schmelztemperatur für die Messungen mit $c(\text{DNA}) = 35.7\mu\text{M}$ und $351\mu\text{M}$ liegt in einem für tetramere Tetraplexe mit vier G-Ebenen typischen Bereich (53°C beim 8mer in 48mM NaCl). Geht man von einem gespannten Tetraplex mit zwei T_2 -Loopbereichen aus, so spricht die gemessene Schmelztemperatur von 47.2°C für das Vorliegen einer dimer-Hairpinstruktur. Bei einer spannungsfreien gestreckten tetrameren Anordnung mit insgesamt acht G-Ebenen wäre ein deutlich höherer T_m -Wert zu erwarten.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

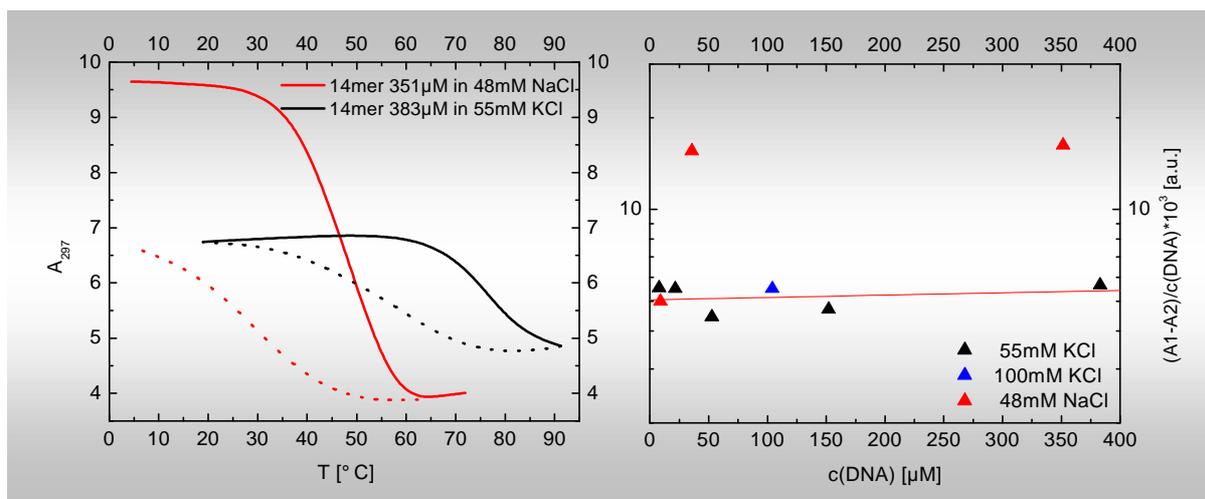


Abbildung 5.44 : Links: Vergleich der Schmelz- und Reaggregationskurven des 14mers in 48mM NaCl vs. 55mM KCl. Die A_{297} Werte des Systems in KCl werden auf die DNA Konzentration des NaCl Systems normiert. Rechts: Vergleich der Amplituden (A1-A2) in Abhängigkeit von der Ionenart und Ionenkonzentration.

Wie beim 14mer in KCl diskutiert, entspricht das vorliegende hysteresenähnliche Verhalten der Absorptionswerte im Verlauf eines Heiz/Kühlzykluses weder dem eines intramolekularen, noch tetrameren intermolekularen Quadruplexes (vgl. Abbildung 5.41). Diese Beobachtung ist mit dem in der DLS detektierten dimer-Hairpin konsistent. Da die Amplituden (Abbildung 5.44-rechts) im Konzentrationsbereich von $c(\text{DNA}) = 351 \mu\text{M}$ bis $35.7 \mu\text{M}$ gleich sind, kann das Vorliegen der dimeren Tetraplexstruktur bis in den der DLS nicht zugänglichen μM Konzentrationsbereich vorausgesetzt werden. Die bemerkenswerten Abweichungen in der Schmelztemperatur und der Amplitude der Messreihe mit $c(\text{DNA}) = 9.1 \mu\text{M}$ in 48mM NaCl werden im Vergleich mit den Messungen in KCl unten diskutiert.

Die gegenüber dem KCl System stark vergrößerte Amplitude des NaCl Systems (vgl. Abbildung 5.44, $c(\text{DNA}) = 35.7 \mu\text{M}$ und $351 \mu\text{M}$) lässt sich nicht nur mit einem Effekt der Ionenart erklären. Da auch beim intramolekularen Tetraplex des 15mers Messungen in NaCl und KCl durchgeführt worden sind und die Amplitude nur um max. 30% zwischen den NaCl und KCl Systemen variieren, müssen hier Unterschiede in der relativen Orientierung der Guanine zueinander oder sogar eine Änderung in der Anzahl der G-Ebenen diskutiert werden. Änderungen in der relativen Orientierung der Guanine innerhalb des Tetraplexes sollten sich nicht signifikant in den hydrodynamischen Eigenschaften niederschlagen. Hingegen sind in Kapitel 5.5.2 Abweichungen zwischen den DLS-Messreihen des 14mers in NaCl (48mM)

bzw. KCl (55mM und 119mM) gerade in der Rotationsrelaxationszeit detektiert worden (hierfür ausschlaggebend sind Variationen in der optischen Anisotropie – Anzahl der G-Ebenen). Daher wird im Folgenden die Möglichkeit einer Variation in der Anzahl der G-Ebenen des dimer Hairpins in Abhängigkeit der Ionenart weiter diskutiert.

Um Unregelmäßigkeiten in der Schmelztemperatur festzustellen, welche direkt mit der Anzahl der G-Ebenen in Zusammenhang gebracht werden können, wird von dem T_m Wert des 14mers in NaCl ausgegangen (47.2°C - gemittelt für die beiden höchsten DNA Konzentrationen). Die relative Änderung des Wertes im 55mM KCl System ($T_m = 76.0^\circ\text{C}$) des 14mers beträgt 28.8°C. Beim 8mer wird in NaCl eine Schmelztemperatur von 53°C detektiert, in KCl sind bis zu einer Messtemperatur von $\approx 95^\circ\text{C}$ jedoch keinerlei Anzeichen eines Schmelzprozesses zu verzeichnen (vgl. Abbildung 5.10-links). In beiden Systemen des 8mers sind vier stabilisierende G-Ebenen vorhanden, was bei einer Variation der zugesetzten Ionensorte von NaCl zu KCl zu einer Verschiebung des T_m Wertes um mindestens 40°C führt. Dagegen fällt die Schmelzpunkterhöhung beim 14mer mit $\Delta T_m = 28.8^\circ\text{C}$ zu gering aus, wenn in beiden dimer –Hairpin Strukturen des 14mers vier G-Ebenen vorhanden sein sollten.

Unter Einbezug der Amplitudenauswertung, die einen um Faktor drei größeren Wert für das NaCl System liefert, und der gerade beschriebenen sehr geringen relativen Änderung des T_m -Wertes beim Vergleich des NaCl Systems mit dem KCl System, ist davon auszugehen, dass in NaCl ein dimer-Hairpin mit vier G-Ebenen vorliegt, in KCl dagegen sich an der Tetraplexstabilisierung nur drei G-Ebenen beteiligen.

Die Abweichungen der Messreihe des 14mers in NaCl mit $c(\text{DNA}) = 9.1\mu\text{M}$ unterstützen diese Interpretation. Die Amplitude liegt in dem Bereich der Messungen in KCl. Gleichzeitig ist der T_m -Wert mit 43.5°C deutlich niedriger als bei den beiden höheren DNA Konzentrationen. Hier kann eine konzentrationsabhängige Umlagerung zu einer Struktur mit nur drei G-Ebenen (vergleichbar der Anordnung in den KCl Systemen) vorliegen. Dass die Schmelzpunkterniedrigung mit $\approx 3.5^\circ\text{C}$ sehr gering ausfällt, ist mit einer anderen relativen Stranganordnung/Loopgeometrie⁹³ zu begründen.

⁹³ Für den Fall, dass nur drei G-Ebenen ausgebildet werden, kann eine Guaninbasen noch in den Loopbereich mit einbezogen werden. Das resultierende System ist dann weniger gespannt und damit temperaturstabiler.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Folgenden werden die ebenfalls ermittelten thermodynamischen Daten des 14mers in die Betrachtungen eingebracht und mit anderen Systemen vergleichend diskutiert.

Zur Bestimmung von ΔH° und ΔS° für die Bildung der Tetraplexstrukturen werden die Werte von K nach Gleichung (2.51) berechnet, logarithmiert und als Funktion von $1/T$ aufgetragen (Gleichung (2.45)). In Tabelle 5.18 ist eine Übersicht über die ermittelten Größen gegeben und mit den zugänglichen Literaturdaten verglichen.

Es werden für das 14mer in KCl -293kJ/mol in 55mM KCl und -304kJ/mol in 100mM KCl für ΔH° berechnet, in 48mM NaCl hingegen -267kJ/mol . Für $c(\text{DNA}) = 9.1\mu\text{M}$ in 48mM NaCl ergeben sich jedoch z.B. -161kJ/mol für ΔH° .

Zunächst lassen sich durch den Vergleich der thermodynamischen Größen der tetrameren Tetraplexsysteme des 8mers ($\Delta H^\circ = -323\text{kJ/mol}$, $\Delta S^\circ = -768\text{J/Kmol}$) und des 10merAGAs ($\Delta H^\circ = -557\text{kJ/mol}$, $\Delta S^\circ = -1473\text{J/Kmol}$) mit denen des 14mers eine tetramere Struktur für das 14mer ausschließen. Selbst wenn nur ein Bruchteil der Differenz der Werte zwischen dem 8mer (vier G-Ebenen) und dem 10merAGA (fünf G-Ebenen) auf die erhöhte Anzahl an G-Ebenen zurückgeführt wird, müssen für den Fall, dass das 14mer als tetramerer Quadruplex vorliegt (mit acht G-Ebenen), die Werte deutlich höher als die gemessenen liegen.

Versucht man einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der G-Ebenen des 14mers und den ermittelten thermodynamischen Größen zu ziehen, so eignen sich die Werte des 24mers (drei G-Ebenen) in NaCl, die Literaturwerte der Sequenz $d[\text{T}_3\text{A}_2\text{G}_3(\text{TGTG}_3)_3]$ (26mer, drei G-Ebenen) und das 15mer (zwei G-Ebenen, direkter Vergleich des Einflusses der Ionensorte auf ΔH° und ΔS°) dazu.

Die Werte des 26mers in KCl lassen sich hervorragend mit denen des 14mers in KCl in Einklang bringen, wenn man beim 14mer von der Ausbildung dreier G-Ebenen ausgeht (-293kJ/mol - 14mer vs. -276kJ/mol - 26mer; beide in 100mM KCl). Damit einher geht der geringe Unterschied zu den Werten in NaCl (bei hohen DNA Konzentrationen), wird hier doch auf Grund der Amplitudenauswertung und der geringen Unterschiede in der Schmelztemperatur die Ausbildung von vier G-Ebenen diskutiert.

Sequenz		ΔH° [kJ/mol]	ΔS° [J/Kmol]	$\Delta G^\circ_{37^\circ\text{C}}$ [kJ/mol]
G ₂ T ₂ G ₂ TGTG ₂ T ₂ G ₂	KCl	-191 / O	-596 / O	-5.8 / O
	NaCl	-118 / O	-397 / O	5.6 / O
(T ₂ G ₄) ₄	KCl	O / O	O / O	O / O
	NaCl	-162 / #	-507 / #	-4.9 / #
T ₂ G ₄ T ₂ G ₄ T ₂	KCl	-293 / -304	-775 / -815	-52 / -51.6
	NaCl	-267 / #	-777 / #	-25.9 / #
	NaCl [#]	-161 / O	-429 / O	-27.5 / O
T ₂ G ₄ T ₂	NaCl	O / -323	O / -768	O / -85.1
T ₂ G ₄ TAGA	NaCl	-557 / O	-1473 / O	-100.4 / O
T ₃ A ₂ G ₃ (TGTG ₃) ₃ aus [Mer98]	KCl	O / -276	O / -823	O / ± 0
	NaCl	O / -157	O / -506	O / -16.7

Tabelle 5.18 : Übersicht über die UV-spektroskopisch bestimmten thermodynamischen Größen. Reihenfolge der Werte in 50mM / 100mM in KCl/NaCl-Systemen. O = nicht vorhanden, # = andere Struktur.

Die Differenz der ΔH° Werte des 14mers in KCl (-293kJ/mol in 55mM) fällt gegenüber dem NaCl System (-267kJ/mol in 48mM) zu gering aus, sollte in beiden Tetraplexen die gleiche Anzahl an G-Ebenen vorliegen. Dies zeigt der Vergleich der NaCl und KCl Werte des Aptamers. Bei zwei stabilisierenden G-Ebenen beträgt der Unterschied in ΔH° von NaCl zu KCl 61% (-117kJ/mol vs. -191kJ/mol), beim 26mer mit drei G-Ebenen 57% (-157kJ/mol vs. 276kJ/mol) beim 14mer jedoch nur 9.7% (-267kJ/mol vs. -293kJ/mol). Ein weiterer Beweis für die Ausbildung unterschiedlicher dimer-Hairpinstrukturen und damit Tetraplexebenen in KCl und NaCl Systemen ist somit gegeben.

In diesem Zusammenhang hochinteressant ist das Verhalten des 14mers in NaCl bei niedrigen DNA Konzentrationen. Schon die Amplitudenauswertung in Abbildung 5.44-rechts zeigte, dass sich hier anscheinend eine Struktur bildet, die morphologisch eher der KCl Struktur (drei G-Ebenen) zuzuordnen ist. Neben der schon diskutierten Schmelzpunktniedrigung, die ebenfalls für eine verringerte Anzahl an G-Ebenen spricht, zeigt die Auswertung der thermodynamischen Werte eine exzellente Übereinstimmung mit Daten von gespannten Systemen,

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

die drei G-Ebenen aufweisen. In Tabelle 5.18 sind die ΔH° Werte dieser Referenzsysteme besonders hervorgehoben.

Zusammenfassend ist zu den UV-spektroskopischen Untersuchungen des 14mers festzuhalten, dass die ermittelten Schmelztemperaturen und das Schmelzverhalten, sowie die Analyse der thermodynamischen Daten und deren Vergleich mit anderen Systemen, die in der dynamischen Streulichtspektroskopie gemachten Beobachtungen hervorragend bestätigen. So ist davon auszugehen, dass in KCl, unabhängig von der Ionenkonzentration (55mM und 100mM) und DNA Konzentration (7.8 μ M bis 383 μ M) eine dimer-Hairpinstruktur mit drei G-Ebenen vorliegt. Die signifikant unterschiedlichen hydrodynamischen Größen (in KCl 55mM vs. KCl 119mM), die in Kapitel 5.5.2 besonders in der Rotation detektiert worden sind⁹⁴, lassen sich demnach nur auf eine, von der Ionenstärke abhängigen, anderen Anordnung der Thyminbasen zurückführen. In der UV-Spektroskopie wird nur ein anderes, schnelleres Reaggregationsverhalten in 100mM KCl beobachtet. Die in [Bol98][Nie96] und [Wal95] umfangreich beschriebenen Polyelektrolyteffekte an Polyanionen können hier für die unterschiedliche Ausrichtung der Thyminbasen im Loopbereich, am 5'Anfang und 3'Ende bei den verschiedenen Ionenstärken verantwortlich sein. Mit einer bei einer hohen KCl Konzentration kompakteren Anordnung der Loops und Endbereiche kann die deutlich schnellere Rotationsrelaxationszeit in \approx 100mM KCl erklärt werden.

Im Vergleich zu den KCl Daten liegt bei der dimer-Hairpinstruktur des 14mers in NaCl eine Anordnung vor, bei der vier G-Ebenen zur Stabilisierung beitragen. Erst bei sehr niedrigen DNA Konzentrationen (\leq 9.1 μ M) wird eine deutliche Veränderung im temperaturabhängigen Verhalten festgestellt. Die Amplitudenauswertung, der Schmelzpunkt von nur 43.5°C (gegenüber 47.2°C bei $c(\text{DNA}) = 35.7\mu\text{M}$ und 351 μM) und die ermittelten thermodynamischen Daten zeigen, dass hier eine dimer-Hairpinstruktur vorliegt, die morphologisch eher mit der Struktur in KCl, also mit nur drei G-Ebenen, übereinstimmt. Ob sich in diesem DNA Konzentrationsbereich und der vorliegenden geringen Ionenstärke das Verhältnis von DNA zu Ionenkonzentration auswirkt, ist mit den vorliegenden Daten nicht abschließend zu klären.

⁹⁴ Mit $\tau_R^{20^\circ\text{C}}$ 5.1ns in 119mM KCl und $\tau_R^{20^\circ\text{C}} = 5.6\text{ns}$ in 55mM KCl.

Die ebenfalls durchgeführten UV-Messungen mit dem 14mer in 100mM NaCl, mit welchen die Gleichgewichtslage zwischen der tetrameren Tetraplexstruktur und dem dimer-Hairpin quantitativ ermittelt werden kann, werden in 5.7.5 zusammen mit den Ergebnissen der analogen Messreihe des 24mers vorgestellt.

5.7.5 UV-Spektroskopie an der polymorphen Sequenz (T₂G₄)₄ (24mer)

Das DNA-Oligonukleotid mit der Sequenz d[(T₂G₄)₄] (24mer) kann auf Grund der vier Guanin-reichen Basenabschnitte neben einer gestreckten tetrameren Anordnung als dimer-Hairpin und als rein intramolekularer Tetraplex vorliegen. Die intramolekulare Anordnung und die gestreckte tetramere Morphologie wurden in Kapitel 5.5.1 in NaCl in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration nachgewiesen. Wie dort anhand von Lichtstreuendaten, hydrodynamischen Modellrechnungen und Daten aus der UV-Spektroskopie dargelegt wurde, existieren der rein intramolekulare Tetraplex von annähernd globulärer Form in 48mM NaCl und die langgestreckte tetramere Struktur in 100mM NaCl.

Wie bei allen (bio)chemischen Reaktionen handelt es sich auch bei der Bildung dieser Strukturen um Gleichgewichtsreaktionen zwischen den einzelnen Spezies. Auf Grund der Versuchsführung in der DLS (vgl. Kapitel 5.5.1) und den Ergebnissen aus der CGE (vgl. Abbildung 5.17) kann in 48mM NaCl von einer Gleichgewichtslage eindeutig auf Seiten der intramolekularen Struktur ausgegangen werden. Hingegen ist in 100mM NaCl nicht auszuschließen, dass beide Morphologien nebeneinander vorliegen. Die in Abbildung 5.17 und Anhang_Abb 8 gezeigten Ergebnisse der CGE unterstützen diese Vermutung.

Die in Kapitel 5.2 und Kapitel 5.5.1 diskutierten UV-Daten werden im Folgenden ausführlich vorgestellt und die Möglichkeiten der UV-Spektroskopie zur Bestimmung der Lage von Gleichgewichten zwischen Quadruplexen unterschiedlicher Stöchiometrie am Beispiel des 24mers und des 14mers aufgezeigt.

Bei den hohen DNA Konzentrationen in den DLS-Messungen wurde in 48mM NaCl ausschließlich die intramolekulare Struktur detektiert. Eine Umlagerung hin zu tetrameren Tetraplexen bei deutlich niedrigeren DNA Konzentrationen ist unwahrscheinlich und nicht in

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

der Literatur beschrieben. Zudem sind Bildung und Reaggregation bei intramolekularen Tetraplexen unabhängig von der DNA Konzentration [Mer98]. Damit kann bei den Systemen in 48mM NaCl auf Messreihen ausgehend von hohen DNA Konzentrationen verzichtet werden. Wie in Tabelle 5.19 ersichtlich, werden in einem Bereich von 3 μ M bis 22.9 μ M vier Messungen durchgeführt. Mit diesen Messreihen kann zuverlässig die auf die DNA Konzentration normierte Amplitude des Schmelzprozesses des intramolekularen Tetraplexes ermittelt werden. Um die Daten aus der Lichtstreuung und der CGE direkt mit den UV-Messungen vergleichen zu können, bzw. die Gleichgewichtslage in dem 100mM NaCl Ansatz zu ermitteln, muss die dort verwendete DNA Konzentration⁹⁵ (0.65mM) vermessen werden.

In 48mM NaCl zeigt sich bei allen Konzentrationen ein konsistentes Verhalten bezüglich der Schmelztemperatur (vgl. Tabelle 5.19), dem Reaggregationsverhalten (vgl. Abbildung 5.5 und Anhang_Abb 6) und der Amplitude (vgl. Abbildung 5.45-rechts, blaue Symbole).

Sequenz	c(DNA) - T _m UV - Amplitude	
	48mM NaCl	100mM NaCl
(T ₂ G ₄) ₄	[3] – 47.8°C– 14.7	[650] – 48.8°C– 0.5
	[6] – 48.7°C– 16.7	
	[12.8] – 46.9°C– 18.2	
	[22.9] – 46.5°C– 16.4	

Tabelle 5.19 : Vergleich der Schmelztemperaturen und der Amplitude des 24mers in Abhängigkeit von der DNA Konzentration und der Ionenstärke. In [] die jeweilige DNA Konzentrationen in μ M.

In 100mM NaCl kommt es zu deutlichen Abweichungen in der Amplitude (Abbildung 5.45-links). Während die ermittelte Schmelztemperatur im Mittel bei 47.2°C in 48mM und 48.8°C in 100mM NaCl beträgt, also innerhalb des schon beim 8mer (53.0°C vs. 55.0°C) und 14mer (76.4°C vs. 78.9°C) beobachteten Schwankungsbereiches, weicht die Amplitude in 100mM NaCl (0.5) deutlich von der in 48mM NaCl (16.5) ab.

⁹⁵ Die Analyse des Schmelzprozesses wurde bei einer Wellenlänge von 305nm durchgeführt [Mer98].

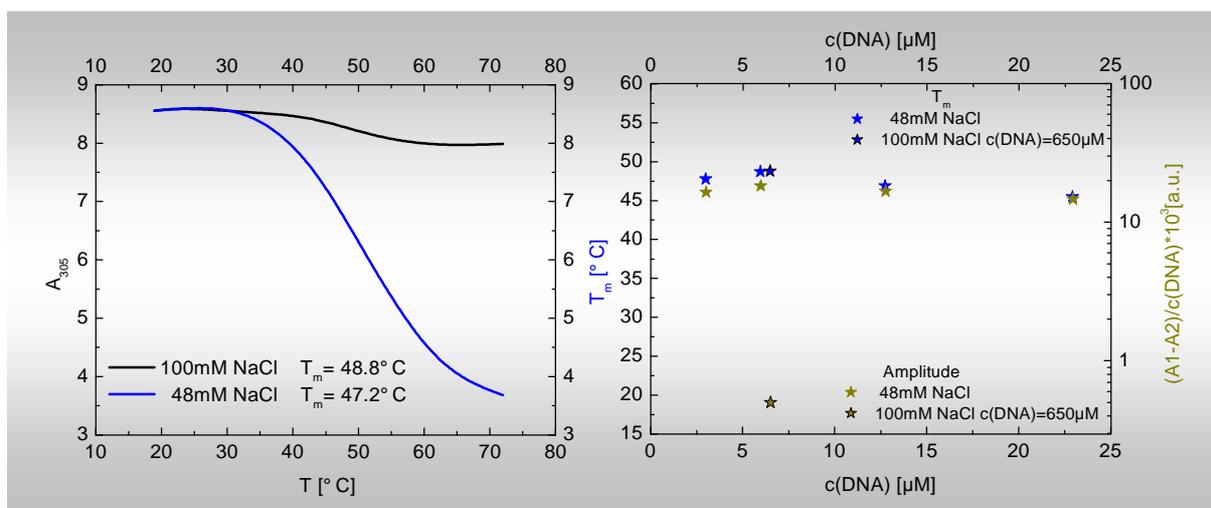


Abbildung 5.45 : Links: Vergleich der Schmelzkurven des 24mers in 48mM NaCl ($c(\text{DNA}) = 3\mu\text{M}-22.9\mu\text{M}$) vs. 100mM NaCl ($c(\text{DNA}) = 650\mu\text{M}$, die Amplitude wird zur Visualisierung um Faktor vier verstärkt). Rechts(blau): Auftragung der Schmelztemperatur gegen die DNA Konzentration. Rechts(orange): Vergleich der Amplituden ($A1-A2$) in Abhängigkeit von der DNA Konzentration und Ionenstärke.

Da die Schmelztemperatur zwischen den beiden vermessenen Ionenstärken nur wenig differiert, kann davon ausgegangen werden, dass in beiden Fällen Tetraplexstrukturen mit der gleichen Anzahl an G-Ebenen geschmolzen werden. Da in 48mM NaCl ausschließlich intramolekulare Quadruplexe vorliegen, kann die ermittelte Amplitude mit einer intramolekularen Tetraplexkonzentration von 100% gleichgesetzt werden. In 100mM NaCl wurde in Kapitel 5.5.1 als Hauptspezies ein gestreckter tetramerer Tetraplex detektiert. Bezogen auf die Einzelstrangkonzentration liegen demnach $\approx 3\%$ der in 100mM NaCl gelösten Einzelstränge als intramolekulare Tetraplexe vor. Unter Einbezug der Stöchiometrie der beiden im Gleichgewicht befindlichen Tetraplexe ergibt sich ein Verhältnis von eins zu acht.

Eine analoge Betrachtung wird zu den Messreihen des 14mers in NaCl durchgeführt. Da zu diesem Zeitpunkt die Originallösungen der DLS-Messungen nicht mehr zur Verfügung stehen, wird ein Vergleichsansatz zu der Lösung mit $c(\text{DNA}) = 9.1\mu\text{M}$ in 48mM NaCl vermessen. Da bei der geringen DNA Konzentration das dimer-Hairpin gegenüber der tetrameren Anordnung bevorzugt ist, kann mit dieser Messung der Grenzfall des Gleichgewichtes zwischen beiden Spezies in 100mM NaCl untersucht werden. Bei höheren DNA Konzentrationen wird eine Verschiebung in Richtung Tetramer vorliegen [Wil94][Eim92].

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ein Vergleich der Amplituden in 48mM und in 100mM NaCl ist in Abbildung 5.46 gezeigt. Tabelle 5.20 enthält eine Gegenüberstellung der ermittelten Daten bezüglich Schmelztemperatur und Amplitude. Der Vergleich der Schmelztemperaturen der Messungen mit ähnlichen DNA Konzentrationen zeigt in Analogie zu den bisherigen Beobachtungen⁹⁶ zur Auswirkung der Ionenstärke einen Anstieg von 1.9°C gegenüber der Messung in 48mM NaCl.

Sequenz	c(DNA) - T _m UV - Amplitude	
	48mM NaCl	100mM NaCl
(T ₂ G ₄ T) ₂	[9.1] – 43.5°C [#] – 5.0	[10.2] – 45.4°C – 1.0
	[35.7] – 46.9°C – 16.3	
	[351] – 47.2°C – 15.5	

Tabelle 5.20 : Vergleich der Schmelztemperaturen und der Amplitude des 14mers in Abhängigkeit von der DNA Konzentration und der Ionenstärke. In [] die jeweilige DNA Konzentrationen in µM. # = andere Struktur

Damit wird gleichzeitig die in Kapitel 5.7.4 diskutierte Sonderstellung⁹⁷ des 14mers bei c(DNA) = 9.1µM bestätigt. Im anderen Fall ist eine Schmelztemperatur von über 48.5°C in 100mM NaCl zu erwarten.

In 100mM NaCl kommt es zu deutlichen Abweichungen in der Amplitude, wie in Tabelle 5.20-rechts und Abbildung 5.46-links ersichtlich ist. In Analogie der Vorgehensweise beim 24mer wird die Amplitude des 14mers mit c(DNA) = 9.1µM in 48mM auf das ausschließliche Vorliegen von dimer-Hairpin Tetraplexen zurückgeführt. Damit liegen in 100mM NaCl und einer DNA Konzentration von 10.2µM 20% der Einzelstränge als Dimer und 80% als Tetramer vor. Unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der Quadruplexe ergibt sich ein Verhältnis von eins (Dimer) zu zwei (Tetramer).

⁹⁶ Vgl. 8mer in NaCl (53.0°C vs. 55.0°C), 14mer in KCl (76.4°C vs. 78.9°C) und 24mer in NaCl (47.2°C vs. 48.8°C)

⁹⁷ Auf Grund der signifikant niedrigeren Schmelztemperatur in Verbindung mit einer deutlich geringeren Amplitude wurde eine andere Struktur (Anzahl der G-Ebenen) postuliert.

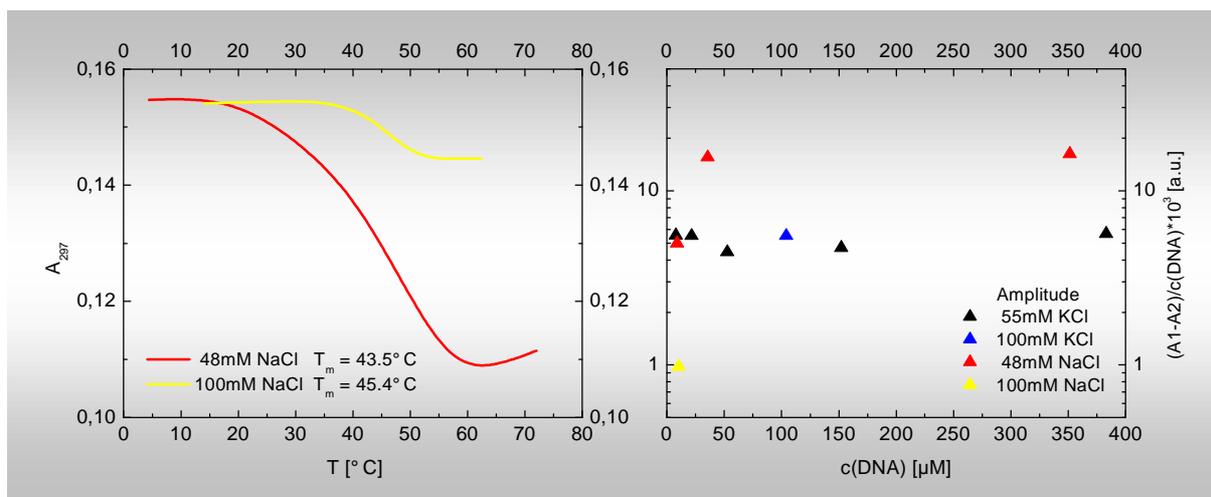


Abbildung 5.46 : Links: Vergleich der Schmelzkurve des 14mers in 48mM NaCl ($c(\text{DNA}) = 9.1\mu\text{M}$) vs. 100mM NaCl ($c(\text{DNA}) = 10.2\mu\text{M}$). Rechts: Auftragung der Amplituden (A_1 - A_2) in Abhängigkeit von der DNA Konzentration und Ionenstärke.

Mit den vorgestellten Ergebnissen zu den UV-spektroskopischen Untersuchungen an der polymorphen Sequenz $d[(T_2G_4)_4]$ (24mer) konnte durch Analyse des Schmelz- und Reaggregationsverhaltens der Strukturtyp des intramolekularen Quadruplexes in 48mM NaCl verifiziert werden. Die ebenfalls ermittelten thermodynamischen Daten zeigten im Vergleich zu Literaturwerten das Vorliegen von drei G-Ebenen auf, was ebenfalls in Einklang mit den Ergebnissen aus der DLS steht. In den durchgeführten Modellrechnung, deren Ergebnisse ausgezeichnet mit denen der DLS übereinstimmen, wurde eine Struktur aus einer NMR Analyse in einer $\approx 50\text{mM}$ KCl Lösung als Startdatei verwendet, in der ebenfalls nur drei G-Ebenen vorliegen.

Durch die Auswertung der Amplitude, dem Absorptionsverhältnis vor und nach dem Schmelzen der stabilisierenden G-Ebenen, ist im Fall des 24mers erstmalig eine quantitative Analyse des Gleichgewichtes zwischen zwei, in 100mM NaCl parallel vorliegenden Quadruplexen möglich. Da die in der DLS und CGE detektierte Hauptspezies (tetramerer Tetraplex) mit insgesamt acht G-Ebenen deutlich höher schmelzen als der intramolekulare Tetraplex mit drei Ebenen, kann die in 100mM NaCl gemessene sigmoidale Abhängigkeit der Absorption von der Schmelztemperatur her hier dem intramolekularen Anteil am Gleichgewicht zugeordnet werden. Das detektierte Verhältnis von eins (intramolekular) zu acht (tetramer, intermolekular) begründet nicht nur die vollständige Maskierung der intramolekularen Spezies in der

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Lichtstreuung, sondern ist auch konsistent mit dem Elektropherogramm des 24mers in 100mM NaCl (vgl. Abbildung 5.17).

In Analogie wurde das 14mer in 100mM NaCl UV-spektroskopisch untersucht und die Ergebnisse mit denen der 48mM NaCl Messreihen verglichen. Auf Grund des komplexen, konzentrationsabhängigen Amplituden- und Schmelztemperaturverhaltens, das auf eine Strukturänderung bei niedrigen DNA-Konzentrationen zurückzuführen ist, ist im Rahmen dieser Arbeit die niedrigste DNA Konzentration in beiden Ionenstärken vermessen worden. Zum einen konnten mit der ermittelten Schmelztemperatur von nur 45.4°C in 100mM NaCl (mit $c(\text{DNA}) = 10.2\mu\text{M}$) die Abweichungen der Messreihe in 48mM NaCl ($T_m=43.5^\circ\text{C}$ mit $c(\text{DNA}) = 9.1\mu\text{M}$, $T_m = 47.2^\circ\text{C}$ mit $c(\text{DNA}) = 35.7\mu\text{M}$ und $351\mu\text{M}$) als signifikant verifiziert werden. Zum anderen war eine Abschätzung möglich, wie weit sich das Gleichgewicht vom tetrameren (Hauptspezies in 100mM NaCl) zum dimer-Hairpin Quadruplex verschieben kann. Bezüglich der Tetraplexe wurde ein Verhältnis von eins (dimer-Hairpin) zu zwei (tetramerer Tetraplex) ermittelt.

5.7.6 Zusammenfassung UV-Spektroskopie an G-DNA

In den letzten Kapiteln wurden die UV-spektroskopischen Untersuchungen an G-DNA vorgestellt und die Ergebnisse diskutiert.

Da die Messungen in erster Linie als Ergänzung zu der dynamischen Streulichtspektroskopie geplant waren, musste zunächst verifiziert werden, dass mit beiden Methoden (DLS und UV-Spektroskopie) prinzipiell die gleichen Spezies beobachtet werden können. Der Vergleich der Temperaturabhängigkeit der statischen Intensität des depolarisierten Streulichtes in der DLS und temperaturabhängigen Abweichungen im Stokes-Einstein Verhalten zeigte eine hervorragende Übereinstimmung mit dem Temperaturverhalten der Absorption in der UV-Spektroskopie. Nachdem diese grundsätzliche Möglichkeit der Schmelzpunktbestimmung mittels UV-Spektroskopie an einfachen rein intramolekularen (15mer und 24mer) und einigen rein tetrameren Tetraplexen überprüft war, wurde versucht, weitreichendere Informationen über die Struktur und Dynamik von Quadruplexen in Lösung zu erhalten.

Der Einfluss der DNA Sequenz, der Anzahl der ausgebildeten G-Ebenen und der Länge der Oligonukleotide insgesamt auf die Schmelztemperatur und das Reaggregationsverhalten wurde anschließend behandelt. Hier zeigte sich die Möglichkeit, allein auf Grund des Reaggregationsverhaltens auf die Morphologie der in Lösung vorhandenen Tetraplexe zu schließen und eindeutig zwischen intramolekularen Quadruplexen und tetrameren intermolekularen Anordnungen zu unterscheiden. Während die intramolekularen Strukturen instantan reaggregierten, war das Aufschmelzen der Tetramere im betrachteten μM Konzentrationsbereich irreversibel. Zudem zeigte sich auch der Einfluss der zugesetzten Ionensorte und deren Konzentration auf die Schmelztemperatur. Während bei einem gespannten System wie dem intramolekularen Tetraplex des 15mers (mit zwei G-Ebenen) in NaCl 23.0°C und in KCl 46.7°C ermittelt wurden, zeigte sich bei tetrameren Tetraplexen mit vier aufeinanderfolgenden G-Ebenen, dass in KCl bis 95°C praktisch kein Schmelzen erreicht werden kann. Die einzige Ausnahme, das 12mer mit der Sequenz $d[\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_6]$ und einem T_m Wert von $\approx 90^\circ\text{C}$ in KCl und 43.0°C in NaCl, zeigte den Einfluss der Endbereiche auf die Schmelztemperatur auf. Der Vergleich der vermessenen Sequenzen in NaCl bestätigte, dass ohne oder mit sehr kurzen Endbereichen, die Schmelztemperatur stark ansteigt und damit der destabilisierende Effekt der endständigen Basen für die Schmelztemperatur von großer Bedeutung ist.

Mit diesem Einfluss auf das Schmelzverhalten konnte auch die extreme Temperaturstabilität der funktionalisierten G-DNA in Kapitel 5.6 „supramolekulare Strukturen“ erklärt werden. Bei der dort diskutierten Verknüpfung der mit komplementären Sequenzen modifizierten G-DNA, stehen nach der Ausbildung dieser Brückenbereiche zwischen den Tetraplexen diese Abschnitte nicht mehr zur Verfügung, um, thermisch bedingt, das Aufbrechen der Quadruplexstruktur zu initialisieren.

Die Diskussion der polymorphen Sequenzen des 14mers und des 24mers wurde in Verbindung mit der Vorstellung der thermodynamischen Daten der wichtigsten vermessenen Sequenzen durchgeführt.

Die Struktur des 14mers war über die Kombination von dynamischer Lichtstreuung und hydrodynamischen Modellrechnungen zuvor bestimmt worden. Es wurden in 55mM KCl, in 119mM KCl und in 48mM NaCl dimer-Hairpin Strukturen detektiert, die, je nach Ionenart

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

und Ionenstärke, andere hydrodynamische Eigenschaften aufweisen. In 114mM NaCl hingegen lag eine tetramere Tetraplexstruktur vor.

Um beim 14mer sicher davon ausgehen zu können, die gleiche Struktur in der DLS und UV-Spektroskopie zu betrachten, wurden Messreihen, ausgehend von fast mM Ansätzen hinunter in den μM Bereich durchgeführt (381 μM bis 9.1 μM). In der UV-Spektroskopie zeigten sich in den KCl Systemen in der Schmelztemperatur nur geringe Differenzen zwischen den Ionenstärken (76.4°C vs. 78.9°C), die nicht mit einer anderen Anzahl an G-Ebenen zu begründen ist. Auch die Amplitude war in beiden Ionenkonzentrationen und allen DNA-Konzentrationen identisch. Das in KCl überhaupt ein Schmelzen zu beobachten war, kann nach den Voruntersuchungen an tetrameren Tetraplexen nur mit einer gespannten Struktur zusammenhängen, wobei bei nur zwei Guanin-reichen Bereichen nur eine dimer-Hairpinanordnung in Frage kommen kann. Dass die Amplitude in beiden Ionenstärken und im gesamten vermessen DNA Konzentrationsbereich gleich war, zeigte wiederum, dass immer Strukturen vorlagen, die die gleiche Anzahl an G-Ebenen besitzen und diese identisch sind mit den Strukturen, die in der DLS detektiert wurden. Die Unterschiede in der Rotationsrelaxationszeit in der DLS zwischen 55mM KCl und 119mM KCl lassen sich demnach nur auf veränderte Orientierungen und Anordnungen der Thyminbasen in Abhängigkeit von der Ionenstärke zurückführen. Gleichzeitig werden die Ergebnisse der DLS, dass immer eine dimer-Hairpinanordnung vorliegt, für beide Ionenstärken bestätigt.

In NaCl zeigte sich ein komplexeres Verhalten in Abhängigkeit von der Ionenstärke und der DNA Konzentration, sowie deutliche Unterschiede gegenüber dem Verhalten in KCl. Amplitude und Schmelztemperatur in 48mM NaCl waren zunächst konstant, veränderten sich aber bei der niedrigsten DNA Konzentration signifikant. Die Schmelztemperatur fiel von 47.2°C auf 43.5°C, die Amplitude von ≈ 16 auf ≈ 5 . Dass sich der T_m -Wert und die Amplitude gleichzeitig veränderten, ist nur mit der Ausbildung einer anderen Struktur zu erklären.

Ein Vergleich der thermodynamischen Größen des 14mers mit $c(\text{DNA}) = 9.1\mu\text{M}$ in 48mM NaCl zeigte eine hervorragende Übereinstimmung mit Daten von Tetraplexen die drei G-Ebenen in NaCl ausbilden (vgl. hervorgehobene Werte in Tabelle 5.18). Hingegen besteht bei den beiden höher konzentrierten Ansätzen ($c(\text{DNA}) = 35.7\mu\text{M}$ und $351\mu\text{M}$) eine Überein-

stimmung mit den thermodynamischen Daten des dimer-Hairpins in KCl. Der Vergleich mit der Auswirkung der Ionenart auf die thermodynamischen Größen beim 15mer (in NaCl und KCl mit zwei G-Ebenen) zeigte jedoch, dass diese Übereinstimmung beim 14mer nur mit einer höheren Anzahl an G-Ebenen im NaCl System zu erklären ist. Auch die um Faktor drei höhere Amplitude der höher konzentrierten DNA Lösungen, bzw. das Übereinstimmen der Amplituden zwischen den KCl Messungen in allen Ionenstärken und DNA Konzentrationen mit der Amplitude des Ansatzes mit nur $9.1\mu\text{M}$ in 48mM NaCl beweist, dass in KCl immer, in NaCl nur bei niedrigen Einzelstrangkonzentrationen eine dimer-Hairpin Anordnung mit drei G-Ebenen vorliegt. In NaCl (48mM) bei hohen DNA Konzentrationen werden jedoch immer Tetraplexe mit vier G-Ebenen gebildet.

Mit diesen Ergebnissen bezüglich der Morphologie der dimer-Hairpin Quadruplexe des 14mers stehen die Daten aus der Lichtstreuung exzellent in Einklang. Dort wurde in der gerade auf Längenänderungen sehr sensitiv reagierenden depolarisierten Lichtstreuung für das dimer-Hairpin in NaCl die schnellste Rotationsrelaxationszeit und damit die kompakteste Struktur detektiert; in KCl, mit den hier diskutierten drei G-Ebenen innerhalb des dimer-Hairpins, entsprechend langsamere hydrodynamische Größen.

Beim 24mer gab es eine sehr gute Übereinstimmung der thermodynamischen Größen mit Literaturwerten zu homologen Sequenzen, die drei G-Ebenen ausbilden. Hierdurch und durch den vormals durchgeführten Vergleich mit dem temperaturabhängigen Verhalten in der DLS konnte mit den Messungen in 48mM NaCl die Amplitude bestimmt werden, die ausschließlich auf das Schmelzen des intramolekularen Tetraplexes zurückzuführen ist. Durch Bestimmung der Amplitude des Ansatzes in 100mM NaCl, in welchem in der DLS als Struktur eine tetramere Anordnung detektiert wurde, war erstmalig eine quantitative Bestimmung der Gleichgewichtslage zwischen tetramerer und intramolekularer Anordnung einer polymorphen Sequenz unter physiologischen Bedingungen möglich. Hierfür wurde die Originallösung, die auch in der DLS eingesetzt wurde, vermessen und das Schmelzverhalten bei einer Wellenlänge von 305nm ausgewertet. Es ergab sich ein Verhältnis von eins zu acht vom intramolekularen Tetraplex zur tetrameren intermolekularen Struktur. Mit diesen Messungen konnte das tatsächliche Verhältnis der unterschiedlichen Quadruplexe der polymorphen Sequenz des 24mers für die DNA Konzentration von 0.65mM bestimmt werden.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für das 14mer, das ebenfalls in 100mM NaCl einen tetrameren Tetraplex ausbildet, sind analoge Betrachtungen angestellt worden, wobei eine Gleichgewichtsanalyse für die niedrigste DNA Konzentration durchgeführt wurde. Dabei bestätigte die Messreihe in 100mM NaCl einerseits die niedrige Schmelztemperatur des 14mers bei einer niedrigen DNA-Konzentration, andererseits war es möglich, eine Abschätzung des bestmöglichen Verhältnisses zugunsten des dimer-Hairpins in 100mM NaCl zu treffen. Unter den vorliegenden Bedingungen ($c(\text{DNA}) \approx 10\mu\text{M}$ in 100mM NaCl) kommen auf ein dimer-Hairpin zwei tetramere Tetraplexe. Sichere Daten zu den Verhältnissen, wie sie in den DLS Messreihen vorlagen, sind jedoch, wie schon beim 24mer, nur möglich, wenn exakt die gleichen Ansätze bezüglich der DNA Konzentration vermessen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblicke

In der vorliegenden Arbeit wurde zielgerichtet eine Kombination von experimentellen und theoretischen Methoden eingesetzt um präzise Aussagen zum KATIONENSPEZIFISCHEN EINFLUSS AUF INTRA- UND INTERMOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN, zu Struktur und Dynamik (polymorpher) G-DNA Sequenzen, bzw. der daraus gebildeten Tetraplexe, treffen zu können. So ist es gelungen, unter physiologischen Lösungsbedingungen in Abhängigkeit von der Ionenart und Ionenstärke verschiedene Morphologien ein und derselben G-DNA Sequenz nachzuweisen.

Bei den Untersuchungsmethoden wurde eine Kombination von dynamischer Streulichtspektroskopie mit hydrodynamischen Modellrechnungen eingesetzt. Ergänzend sind im Rahmen dieser Arbeit erstmalig systematische Untersuchungen mittels UV-Absorptionsspektroskopie an G-DNA durchgeführt und eine Vielzahl von Sequenzen mittels der Kapillargelelektrophorese untersucht worden. Dabei ist bei allen experimentellen Methoden präzise auf das Einhalten *identischer* Lösungsbedingungen geachtet worden, was erst die Vergleichbarkeit und konstruktive Verknüpfung der Ergebnisse ermöglichte.

In der **DYNAMISCHEN STREULICHTSPEKTROSKOPIE** war es durch konstruktive Maßnahmen am Versuchsaufbau möglich, den Fehlerbereich der Messungen auf unter $\pm 4\%$ zu minimieren. Gerade in der depolarisierten Lichtstreuung ist es gelungen, einen Versuchsaufbau zu etablieren, der den auflösbaren Zeitbereich bezüglich der Rotationsrelaxationszeit bis zu 400ns erweitert.

Auch bei den durchgeführten **MODELLRECHNUNGEN** war ein großer Sprung bezüglich der Vorhersagegenauigkeit der hydrodynamischen Größen von DNA-Molekülen in Lösung möglich. Dies gelang durch neue präzise experimentelle Ergebnisse einerseits und modifizierte Programmteile andererseits. Vor allem jedoch war durch die Verwendung einer Schrittweite von 5pm bis 10pm bei der Generierung der Hydrathüllen eine bessere Berücksichtigung der

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE

Oberflächentopologie gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausmaße der zu berücksichtigenden Wasserhülle von $360\text{pm} \pm 80\text{pm}$ [Nie96] auf $285\text{pm} \pm 9\text{pm}$ zu reduzieren sind. Jetzt liegen die Fehler der berechneten hydrodynamischen Größen im Fehlerbereich der Lichtstremessungen selbst.

Mit der erstmalig an G-DNA durchgeführten **KAPILLARGELELEKTROPHORESE** gelang es, Rückschlüsse auf die Bildungen von Konformeren zu erhalten, bzw. bei polymorphen Sequenzen Minoritäten nachzuweisen, die in der Lichtstreuung durch stärker streuende Strukturen maskiert waren. Einmalig ist bisher der Vergleich der CGE mit der Detektion über interkalierende Fluoreszenzfarbstoff und der CE mit LINF-Detektion bei ansonsten absolut identischen Versuchsbedingungen (explizit der DNA-Konzentration). Hier war es möglich, unabhängig von farbstoffinduzierten Effekten Elektropherogramme des 24mers aufzunehmen, die einerseits die Aussagekraft der CGE Ergebnisse bestätigten, und andererseits die enorme Bedeutung der Einhaltung von identischen Lösungs- und Präparationsbedingungen (Auswirkung des Farbstoffes auf Migrationsverhalten und Feinaufspaltung) aufzeigten.

In der **UV-SPEKTROSKOPIE** war es möglich, neben umfangreichen und präzisen Schmelzpunktbestimmungen auch das Schmelz- und Reaggregationsverhalten der unterschiedlichen Spezies einer genauen Analyse zu unterziehen. Allein aus dem Reaggregationsverhalten konnte auf den Strukturtyp (intramolekular vs. dimer-Hairpin vs. tetramer) geschlossen werden. Außerdem sind hoch interessante Konzentrationseffekte aufgetreten, die nicht nur den Polymorphismus bezüglich der Strangstöchiometrie betreffen, sondern auch auf einen konzentrationsabhängigen Polymorphismus bezüglich der Anzahl der G-Ebenen hindeuteten. Die Analyse der thermodynamischen Daten lieferte hier ein exzellent konsistentes Bild bezüglich *aller* Strukturaussagen, die mit Hilfe der *anderen Methoden* getroffen wurden.

Zunächst sind die Modellrechnungen anhand von duplexbildenden Sequenzen und einfachen intra- und intermolekularen tetraplexbildenden G-DNA Sequenzen verifiziert und gegenüber [Nie96] verfeinert worden. Für alle untersuchten Strukturen zeigte sich ein konsistentes Bild bezüglich der zu berücksichtigenden Wasserhülle. Bei den Duplexbildnern ist eine Wasser-

hülle mit $d = 305\text{pm} \pm 8\text{pm}$, bei Tetraplexen jedweder Morphologie $285\text{pm} \pm 9\text{pm}$ in den hydrodynamischen Modellrechnungen zu berücksichtigen, um präzise Aussagen über die hydrodynamischen Größen zu erhalten. Inwieweit die verwendeten B-DNA-Sequenzen damit ein Sonderfall bezüglich der Wasserhülle darstellen, kann dabei nicht geklärt werden. Auffällig ist jedoch, dass die berechneten hydrodynamischen Größen der Z-DNA bei 285pm noch besser mit den gemessenen hydrodynamischen Größen übereinstimmen, als bei 305pm . Gerade Z-DNA hat eine Oberflächentopologie, die sich auffällig von der B-DNA-Struktur unterscheidet. Dadurch wird die Vermutung, dass eine Wasserhülle von 285pm eine für Biopolymere (RNA/DNA exkl. B-DNA) in Lösung charakteristische Größe darstellt, untermauert. Hier bietet sich an, die verwendeten Programme zu erweitern, um nicht nur DNA/RNA-Strukturen berechnen zu können, sondern auch Proteine, Protein-DNA-Komplexe oder ganz allgemein durch Wechselwirkungen zwischen gelösten Makromolekülen entstandene Assoziate. Über einen analog der hier beschrittenen Verifizierung durch Vergleich von DLS-Ergebnissen und Modellrechnungen an einfachen Modellsystemen für andere Substanzen (z.B. an Proteinen) ist folglich die präzise Bestimmung von Interaktionen zwischen verschiedensten Molekülen möglich. Für die freien Bindungspartner und für den Komplex aus beiden können theoretische Werte mit den Experimentellen verglichen werden. So ist mit der in dieser Arbeit erreichten Präzision sowohl der experimentellen als auch der theoretischen Ergebnisse z.B. eine direkte Wirksamkeitsprüfung von Medikamenten unter physiologischen Bedingungen zu realisieren (Erfolgreiche Interaktion von Wirkstoff und Zielmolekül).

Die intramolekularen Tetraplexe des 15mers und des 24mers sowie die tetramere Tetraplexe bildenden Sequenzen des 6mers und des 8mers dienen zur Verifizierung der Ergebnisse der UV-Spektroskopie und der Kapillargelelektrophorese. Die Gegenüberstellung der in der UV-Spektroskopie ermittelten Schmelzkurven mit denen aus der DLS (Temperaturabhängigkeit der statischen Intensitäten in der depolarisierten Lichtstreuung) lieferte trotz der unterschiedlichen Konzentrationen (DLS mM vs. UV μM) ein in sich konsistentes Bild im Falle der intramolekularen Tetraplexe. Weitergehende Vergleiche zwischen beiden Untersuchungsmethoden führten bei tetrameren Tetraplexen ebenfalls zu sehr guten Übereinstimmungen bezüglich des Schmelzverhaltens. Mit den Elektropherogrammen der einzelnen Sequenzen in der CGE konnten erhebliche Unterschiede in der Signalform und der detektierten DNA-

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE

Menge in Abhängigkeit von der Struktur dokumentiert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit zeichnete sich ein großer Einfluss der Struktur auf die Farbstoffinterkalation ab. So ist der verwendete Fluoreszenzfarbstoff YOYO anscheinend kaum in der Lage, mit den tetrameren Helixbereichen zu interagieren. Angriffspunkte sind vielmehr die gefalteten Bereiche bzw. Helixabschnitte, in denen keine Guaninbasen vorkommen. Inwiefern sich hier eine Möglichkeit der (Struktur-)Analytik, vergleichbar der Titration von superspiralisierten Plasmiden mit Ethidiumbromid ergeben kann, ist weiter zu hinterfragen.

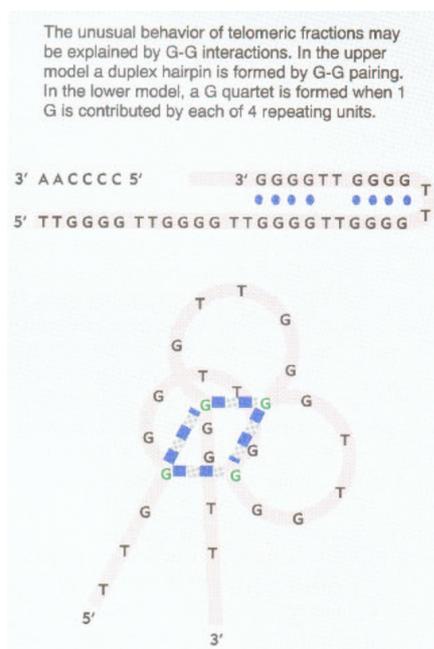
Kaum abstreitbar ist jedoch die enorme Biorelevanz dieser Beobachtung. Die für native Funktionen der DNA zuständigen telomeren Bereiche sind in entscheidenden Phasen der Zellteilung und DNA-Replikation hervorragend gegen interkalierende Schadsubstanzen inert. Diese Eigenschaft der Guanin-reichen DNA und der daraus gebildeten Tetraplexe wird ein Grund für die Existenz dieser hochkonservierter Sequenzabschnitte sein.

In einem Hauptteil der Arbeit wurden potentiell polymorphe Sequenzen in einer Vielzahl von Lösung(sbeding)ungen innerhalb physiologischer Grenzen untersucht. Hier war es mittels der sich ergänzenden Untersuchungsmethoden möglich, unterschiedliche Tetraplexe in Abhängigkeit der Ionenart und Ionenstärke nachzuweisen.

Das 14mer liegt in KCl Lösungen (55mM und 119mM) immer, in NaCl Lösungen nur bei niedrigen Ionenstärken (48mM) als dimer-Hairpin vor. In 100mM NaCl besteht ein Gleichgewicht zwischen dem dimer-Hairpin und einem tetrameren Tetraplex. Die Lage dieses Gleichgewichtes wurde mittels UV-Spektroskopie exemplarisch für eine DNA Konzentration von ca. 10 μ M mit 1 zu 2 bestimmt. D.h., auf ein dimer-Hairpin kommen zwei Tetramere. Die höheren Konzentrationen (mM-Ansätze) in der DLS zeigten nur die tetramere Spezies, die Dimere wurde vollständig maskiert, was bei diesen hohen DNA-Konzentrationen für ein Gleichgewicht auf Seiten des Tetramers spricht. Besonders interessant zeigte sich eine weitergehende Analyse der gesammelten UV-Daten. Durch einen Vergleich der thermodynamischen Größen der Hairpinstrukturen in KCl und NaCl sowie deren Konzentrationsabhängigkeit auf der einen Seite und den Daten aus der Lichtstreuung, die unterschiedliche hydrodynamische Größen für die Dimeren je nach Ionenart und Ionenstärke zeigten, andererseits konnte auf einen Polymorphismus bezüglich der Anzahl der G-Ebenen geschlossen werden.

So liegt in KCl immer ein dimer-Hairpin mit drei G-Ebenen vor, wobei sich die relative Orientierung der thyminhaltigen Loop- und Endbereiche auf Grund von Polyelektrolyteffekten in Abhängigkeit von der Ionenstärke unterscheiden. In 48mM NaCl hingegen liegt bei DNA-Konzentrationen größer $\approx 10\mu\text{M}$ ein dimer-Hairpin mit vier G-Ebenen vor, darunter eine Struktur die ebenfalls nur drei G-Ebenen besitzt. Dass für ein solches Verhalten und die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit in der Strukturbildung sehr komplexe Aggregationsmechanismen verantwortlich sein müssen, die weit über literaturbekannte Vorgänge an doppelhelikaler DNA hinausgehen, zeigen auch die aufgenommen Reaggregationskurven. Die Abhängigkeit der Reaggregation von der DNA Konzentration, der Ionenart und Ionenstärke konnte ausführlich gezeigt werden. Gerade die Reaggregationskurven erlauben eine schnelle Abschätzung über die vorliegende Struktur und wurden in dieser Arbeit erstmalig sowohl für intramolekulare, als auch für dimere und tetramere intermolekulare Tetraplexe systematisch untersucht.

Beim 24mer wurde in 48mM NaCl eine rein intramolekulare Struktur in der DLS, der CGE und der UV-Spektroskopie detektiert. In 100mM NaCl wurde in der DLS ausschließlich die tetramere Spezies nachgewiesen, hingegen lagen in der CGE Anzeichen für ein Gleichgewicht



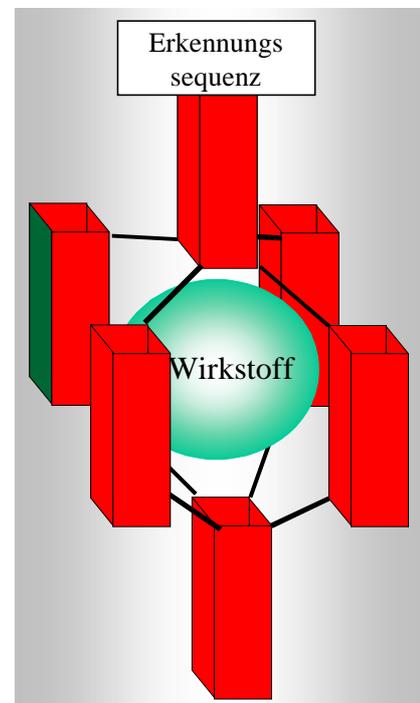
zwischen intra- und intermolekularen Quadruplexstrukturen vor. Mittels der UV-Spektroskopie war es möglich, präzise den intramolekularen Anteil in der mit der DLS vermessenen Lösung zu bestimmen. In der CGE zeigte sich zudem noch ein Signal, was einer dimer-Hairpin Struktur zugeordnet werden könnte. Da aber die Integrale der Signale des Elektropherogramms nur qualitativ zu bewerten sind und Anzeichen für ein Dimer in der DLS fehlten, besteht hier weiterer Forschungsbedarf. Prinzipiell zeigt gerade dieser hier nachgewiesene Polymorphismus des 24mers die Beantwortung eines ungeklärten, bisher nur postulierten Teilschrittes der

Replikation der telomeren Regionen der eukaryotischen DNA auf. Die in der Abbildung links [Lew94], [Lew98] noch als „möglicherweise“ beschriebene Rückfaltung eines Guanin-

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE

reichen Einzelstranges zur Bereitstellung eines für die Anschlussynthese notwendigen freien 3'OH-Endes kann mit den Ergebnissen in dieser Arbeit als mechanistisch-möglich bewiesen angesehen werden. Damit kann ausgehend von beobachteten partiell tetrameren Strukturen von der Zelle durch Anlegen eines Konzentrationsgradienten die Rückfaltung initiiert werden. Dass die hier gemachten Beobachtungen exakt in Ionenstärken vonstatten gingen, wie sie von Zellen für eine Vielzahl von Signaltransduktionsvorgängen verwendet werden, zeigt nicht nur eindrucksvoll die Unabdingbarkeit von Untersuchungen in physiologischen Bereichen auf, sondern auch, dass hier ein Schlüsselschritt der DNA-Replikation innerhalb biologisch sinnvoller Parameter erklärbar geworden ist.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit das G-DNA CORE B-DNA JUNCTION Konzept für die Realisierung supramolekularer Nanostrukturen entwickelt. Für die Überprüfung der Umsetzbarkeit sind kurze, ausschließlich tetramere Tetraplexe bildende G-DNA Sequenzen ausgewählt worden. Die 3'Ende dieser Oligonukleotiden wurden mit B-DNA bildenden Sequenzen funktionalisiert. Nach der Charakterisierung der Einzelsysteme des 10merAGAs und 10merTCTs wurden Mischungen in verschiedenen Verhältnissen angesetzt. Nach der Durchführung mehrerer Tempervorgänge konnte die Entstehung höher geordneter Strukturen mit verschiedenen Organisationsgraden und jeweils eigener Dynamik nachgewiesen werden, wobei eine eindrucksvolle Konsistenz in den Ergebnissen der eingesetzten Methoden (DLS, CGE und Modellrechnungen) bestand. Das komplexe temperaturabhängige Verhalten Guanin-reicher DNA und die mittels UV-Spektroskopie gesammelten Daten bezüglich Stabilität und Reaggregationsverhalten können so in Zukunft als Grundlage dienen, mehrphasig schaltbare supramolekulare Nanostrukturen von maßgeschneiderter Morphologie und überragender strukturellen Integrität zu entwerfen und in Medizin und Technik einzusetzen. Gerade für diese beiden Bereiche sind die durchgeführten Untersuchungen unter physiologischen



Rahmenbedingungen in Lösung von großer Bedeutung. So ist es denkbar Wirkstoffe, die in den Käfigstrukturen eingeschlossen sind, mit Kenntnis der Umgebungsparameter am Einsatzort erst dort gezielt freizusetzen. Neben einer Schaltsensitivität bezüglich der Umgebungstemperatur (Krebszellen weisen häufig einen erhöhten Stoffwechsel und damit Temperatur auf) sind auch ioneninduzierte Freisetzungsprozesse möglich. Gleichzeitig kann an einem Ende eines Tetraplexes eine Erkennungssequenz in Form von Loopbereichen einer dimer-Hairpinstruktur realisiert werden. Diese Erkennungssequenz kann nur mit einem bestimmten Ziel (z.B. eine von der körpereigenen Abwehr nicht erkannte Krebszellenoberfläche) binden. Mit der Bindung verändert sich die Spannung im Loopbereich, was die Temperaturstabilität des die Erkennungssequenz tragenden Tetraplexes verringert und zur Freisetzung des aggressiven Wirkstoffes nur am gewünschten Ort führt. Durch eine solche Planung sind Freisetzungsprozesse in anderen stoffwechselaktiven und damit „warmen“ Orten, wie z.B. der Leber ausgeschlossen (minimalinvasive Freisetzung). Gleichzeitig ist auf Grund der dargestellten Ergebnisse bezüglich elektrostatischer Oberflächentopologie einerseits und weitgehender Resistenz gegen die Interkalation von YOYO andererseits offensichtlich, dass die tetrameren Bereiche solcher Netzwerke gegen die Wechselwirkung mit den eingeschlossenen Wirkstoffen inert sind, was die negative Wechselwirkung von aggressiven Wirkstoffen und umgebenden Nanocluster minimiert.

An allen vorgestellten G-DNA-Strukturtypen wurden mittels der UV-Spektroskopie thermodynamische Analysen durchgeführt und mit Literaturdaten verglichen. Neben einer exzellenten Übereinstimmung mit den Literaturwerten zu intramolekularen Tetraplexen aus [Mer98] zeigte sich ein hoch konsistentes Bild bei der Kombination der Informationen aus der UV-Spektroskopie, der DLS und der CGE. Auf der Basis thermodynamischer Daten und dem Hinzuziehen der Daten aus der DLS und CGE war es möglich, Rückschlüsse auf den Strukturtyp der untersuchten Tetraplexe zu ziehen. Dabei zeigte sich im Falle des 14mers auch die Aussicht, eine Art „Feinstrukturanalyse“ bezüglich verschiedener Konformere durchzuführen. Da neben einer Kationenabhängigkeit auch eine DNA-Konzentrationsabhängigkeit der Übergänge zwischen verschiedenen Konformeren (Strukturtype Dimer-Hairpin mit drei bzw. vier G-Ebenen) nachgewiesen wurde, bieten sich weitere systematische Untersuchungen in allen (DNA-)Konzentrationsbereichen an.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICKE

Um Sicherheit bezüglich der absoluten Konformation zu erlangen ist es notwendig, weitere Methoden der Strukturaufklärung hinzuzuziehen. Hier bieten sich die CD-Spektroskopie und NMR-Untersuchungen an. Dabei ist neben der zugänglichen Strukturinformation an sich von entscheidender Bedeutung, dass es mit beiden Methoden möglich ist, die bisher verwendeten Präparationsschritte und Lösungsbedingungen beizubehalten und damit die erhaltenen Ergebnisse direkt zu den bisherigen Erkenntnissen in Bezug setzen zu können.

7 Epilog

Die belebte Natur stellt sich dem Wissenschaftler immer wieder als komplexes Wirkgefüge dar, das von nahezu unfassbar vielen Parametern dynamisch modifiziert wird. Dabei tritt der Forscher dieser Vielfalt mit zunehmend differenzierteren Untersuchungsmethoden und Erklärungsmodellen geradezu trotzig entgegen. Hier wird leider immer wieder außer Acht gelassen, dass die Untersuchungsobjekte nur deswegen im Mittelpunkt des Interesses der Forschung stehen, weil sie in der Lage sind, präzise gesteuert vielfältige Funktionen zu übernehmen und dafür im Laufe der Evolution über Jahrtausende optimiert wurden. Dies kann und muss zu einer kaum vorstellbaren selektiven Sensitivität bezüglich der Umgebungsbedingungen geführt haben. Unfassbar kleine Veränderungen in den Umgebungsbedingungen können zu vollkommen neuen Morphologien und damit Funktionen führen. Damit gilt, dass auch im Mikrokosmos der Biomoleküle die Messung und Messmethode das Ergebnis bis zur totalen Unkenntlichkeit verfälschen kann.

Wer sich in der Forschung auf die Variation von zwei bis drei oder auch 30 verschiedenen Umgebungsparameter beschränkt und gleichzeitig diese Bedingungen noch beliebig weit weg von physiologischen Gegebenheit wählt, muss mit seinen Deutungen bezüglich der biologischen Funktion des betrachteten Systems scheitern. Die in der Literatur angestrebten Vergleiche zwischen unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und damit häufig einhergehend auch unterschiedlichen Lösungsbedingungen zeigen dagegen, dass das geistige Niveau und Vorstellungsvermögen vieler sich eher reziprok zur technischen Weiterentwicklung der Neuzeit verhält. Mit unseren Möglichkeiten zu versuchen, die komplexen Wirkzusammenhänge der belebten Natur auf molekularer Ebene erschöpfend zu untersuchen, binär zu codieren oder in ihrer Gänze verstehen zu wollen, kann von der sachimmanenten Logik her *zum jetzigen Zeitpunkt* nur Wunschdenken sein. Bleibt diesbezüglich nur die Hoffnung, dass

„viele kleine Schritte auch einen langen Weg machen“ (Lao Tse).

8 Literaturverzeichnis

[AMD] : Advanced Micro Devices, Inc, One AMD Place, P.O. Box 3453, Sunnyvale, CA 94088, 1 800 538-8450.

[Atk96] : P.W. ATKINS, Physikalische Chemie, 2. Auflage, VCH Weinheim 1996.

[Bla96] : G.M. BLACKBURN, M.J. GAIT. Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford 1996.

[Blo77] : J.G. TORRE, V.A. BLOOMFIELD. 1977. Hydrodynamic Properties of Macromolecular Complexes. II. Rotation, *Biopolymers* **16**: 1765-1778.

[Bod98] : A.G. BODNAR, M. OUELLETTE, M. FROLKIS, S.E. HOLT, C.-P. CHIU, G.B. MORIN, C.B. HARLEY, J.W. SHAY, S. LICHTENSTEINER, W.E. WRIGHT. 1998. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells, *Science* **279**: 349-352.

[Bol96] : V.M. MARATHIAS, K.Y. WANG, S. KUMAR, T.Q. PHAM, S. SWAMINATHAN, P.H. BOLTON. 1996. Determination of the Number and Location of the Manganese Binding Sites of DNA Quadruplexes in Solution by EPR and NMR in Presence and Absence of Thrombin, *J. Mol. Biol.* **60**: 378-394.

[Bol98] : M. BOLTEN. 1998. Intra- und intermolekulare Assoziation telomerer DNA in Lösung. Ein Vergleich von dynamischen Lichtstreuergebnissen mit hydrodynamischen Modellrechnungen. (Diplomarbeit), Universität Bielefeld 1998.

[Bol99] : M. NIERMANN , M. BOLTEN , W. EIMER. 1999. Optimization of the Hydrodynamic Bead Model for the Analysis of DNA Conformations in Solution, *J. Phys. Chem. B* **103**: (45): 10065-10074.

- [Bro00] : R. Plessow, A. Brockhinke, W. Eimer, K. Kohse-Höinghaus. 2000. Intrinsic Time- and Wavelength-Resolved Fluorescence of Oligonucleotides: A Systematic Investigation Using a Novel Picosecond Laser Approach. *J. Phys. Chem. B.* **104**: 3695-3704.
- [Che92] : C. CHEONG, P.B. MOORE. 1992. Solution Structure of an Unusually Stable RNA Tetraplex Containing G- and U-Quartet Structures. *Biochemistry* **31**: 8406.
- [Dug80] : A. DUGAICZYK ET, D.L. ROBBERSON, A. ULLRICH. 1980. Single-Stranded Poly(deoxyguanylic acid) Associates into Double and Triple-Stranded Structures, *Biochemistry* **19**: 5869-5873.
- [Eim92] : W. EIMER, T. DORFMÜLLER. 1992. Self-Aggregation of Guanosine 5'-Monophosphate Studied by Dynamic Light Scattering Techniques. *J. Phys.Chem.* **96**: 6790-6800.
- [Eim93] : S. HABER-POHLMEIER, W. EIMER. 1993. Depolarized Dynamic Light Scattering in the Nanosecond Timer Range: Analyzing Rotational Motion of B- and Z-DNA in Solution. *J. Phys.Chem.* **97**: 3095- 3097.
- [Fei93] : R.F. MACAYA, P. SCHULTZE, F.W. SMITH, J.A. ROE, J. FEIGON. 1993. Thrombin-Binding DNA Aptamer Forms an Unimolecular Quadruplex Structure in Solution, *Biochemistry* **99**: 3745-3749.
- [Gar77] : J. GARCIA DE LA TORRE, V.A. BLOOMFIELD. 1977. Hydrodynamic Properties of Macromolecular Complexes. I. Translation, *Biopolymers* **16**: 1765-1778.
- [Gar81] : J. GARCIA DE LA TORRE, V.A. BLOOMFIELD.1981. Hydrodynamic Properties of Complex, Rigid, Biological Macromolecules: Theory and Application, *Quart. Rev. Biophys.* **14**: 81-139.
- [Gel62] : M. GELLERT, M.N. LIPSETT, D.R. DAVIES. 1962. Helix Formation by Guanylic Acid, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**: 2013-2018.
- [Gen79] : P.G. DE GENNES, *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1979.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [Gut91] : A. GUTTMANN, N. COOKE. 1991. Capillary Gel Affinity Electrophoresis of DNA Fragments, *Anal. Chem.* **63**: 2038-2042.
- [Ham97] : R.W. HAMMOND, H. OANA, J.J. SCHWINEFUS, J. BONADIO, R.J. LEVY, M.D. MORRIS. 1997. Capillary Electrophoresis of Supercoiled and Linear DNA in Diluted Hydroxyethyl Cellulose Solution, *Anal. Chem.* **69**: 1192-1196.
- [Heb93] : K. HEBENBROCK, K. SCHUEGERL, R. FREITAG. 1993. Analysis of Plasmid-DNA and Cell Protein of Recombinant *Escherichia coli* Using Capillary Gel Electrophoresis, *Electrophoresis* **14**: 753- 758.
- [Hel01] : C. HELLER. 2001. Principles of DNA Separation with Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis* **22**: 629-643.
- [Her98] : A. HERRMANN. 1998. Komplexe Dynamik stäbchenförmiger Makromoleküle in wässriger Lösung. (Dissertation), Universität Bielefeld 1998.
- [Hog97] : N. JING, R.F. RANDO, Y. POMMIER, M.E. HOGAN. 1997. Ion Selective Folding of Loop Domains in a Potent Anti-HIV Oligonucleotide, *Biochemistry* **36**: 12498-12505.
- [Hyp96] : Molecular Modeling System, Autodesk Inc. 1996.
- [Intel] : Intel Corporation, 2200 Mission College Blvd., P.O. Box 58119 Santa Clara, CA 95052-8119 USA.
- [Jan97] : C.A. JANEWAY JR., P. TRAVERS. Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997.
- [Jor81] : J.W. JORGENSEN, K.D. LUKACS. 1981. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. *Anal. Chem.* **53**: 1298-1302.
- [Kal93] : Q. GUO, M. LU, N.R. KALLENBACH. 1993. Effect of Thymine Tract Length on the Structure and Stability of Model Telomeric Sequences, *Biochemistry* **32**: 3596-3603.
- [Kar89] : B.L. KARGER, A.S. COHEN, A. GUTTMAN. 1989. High-Performance Capillary Electrophoresis in the Biological Science, *J. Chromatogr.* **492**: 585-614.

- [Kel96] : J.A. KELLY. 1996. Reconciliation of the X-ray and NMR Structures of the Thrombin-Binding Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *J. Mol. Biol.* **256**: 417-422.
- [Kop72] : D. E. KOPPEL. 1972. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants, *J. Chem. Phys.* **57**: 4814-4820.
- [Kro00] : Posterbeitrag. Bunsentagung 2000, Universität Dortmund.
- [Lee88] : B. LEE, F. M. RICHARDS, T. J. RICHMOND, M. HANDSCHUMACHER, ACCESS (Version2), A Fortran Program to Calculate the Accessible Surface Area and the Voroni Volume of a Protein from Atomic Coordinate Data, Yale University 1988.
- [Leh94] : A.L. LEHNINGER, Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- [Lew94] : B. LEWIN. Genes V. Oxford University Press, Oxford (1994).
- [Lew98] : B. LEWIN. Genetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1998).
- [Lui97] : K. PHILLIPS, Z. DAUTER, A.I.H. MURCHIE, D.M.J. LILLEY, B. LUISI. 1997. The Crystal Structure of a Parallel-Stranded Guanine Tetraplex at 0.95 Å Resolution, *J. Mol. Biol.* **273**: 171-182.
- [Mar96] : V.M. MARATHIAS, K.Y. WANG, S. KUMAR, T.Q. PHAM, S. SWAMINATHAN, P.H. BOLTON. 1996. Determination of the Number and Location of the Manganese Binding Sites of DNA Quadruplexes in Solution by EPR and NMR in Presence and Absence of Thrombin, *J. Mol. Biol.* **260**: 378-394.
- [Mar00] : V. M. MARATHIAS, P.H. BOLTON. 2000. Structures of the Potassium-Saturated, 2:1, and Intermediate, 1:1, Forms of a Quadruplex DNA, *Nucleic Acid Research* **28**: 1969-1977.
- [McG93] : D.A. MCGREGOR, E.S. YEUNG. 1993. Optimization of Capillary Electrophoretic Separation of DNA Fragments Based on Polymer Filled Capillaries, *J. Chromatogr. A.* **652**: 67-73.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [Mer98] : J.L. MERGNY, A.T. PHAN, L. LACROIX. 1998. Following G-Quartet Formation by UV-Spectroscopy. *FEBS LETT* **435**: (1) 74-78.
- [Mey97] : R.A. MEYERS. Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Vol. 6. VCH Weinheim, 1997.
- [Mil97] : S.W. BLUME, V. GUARCELLO, W. ZACHARIAS, D.M. MILLER. 1997. Divalent Transition Metal Cations Counteract Potassium-Induced Quadruplex Assamby of Oligo d(G) Sequences, *Nucleic Acids Research* **25**, no.3: 617-625.
- [Mit95] : L. MITNIK, L. SALOME, J.L. VIOVY, C. HELLER. 1995. Systematic Study of Field and Concentration Effects in Capillary Electrophoresis of DNA in Polymer Solution, *J. Chromatorgr. A.* **710**: 309-321.
- [Mos00] : M.-O. SCHIERENBERG, 2000. UV-Laser induzierte wellenlängenaufgelöste Detektion der nativen Fluoreszenz von biologischen Substanzgemischen in der Kapillarelektrophorese (Dissertation). Universität Bielefeld 2000.
- [Nie96] : M. NIERMANN. 1996. Die Größe und Gestalt von Makromolekülen in Lösung. (Dissertation), Universität Bielefeld 1996
- [Pat94] : Y. WANG, D.J. PATEL. 1994. Solution Structure of the Tetrahymena Telomeric Repeat d(T2G4)₄ G-Tetraplex, *Structure* **2**: 1141
- [Pec76] : B. J. BERNE, R. PECORA, Dynamic Light Scattering, John Wiley & Sons, New York, 1976, S. 29, S. 38, S. 56-59, S. 115-123.
- [Pec90] : W. EIMER, R. PECORA. 1990. Rotational and Translational Diffusion of Short Rodlike Molecules in Solution: Oligonucleotides, *J. Chem. Phys.* **94**: 2324-2329.
- [Ple98] : R. Plessow. 1998. Untersuchung von Proteinen und DNA-Oligonucleotiden mit zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz (Diplomarbeit). Universität Bielefeld 1998.

- [Poh95] : S. HABER-POHLMIEIER. 1995. Polarisierete und depolarisierete dynamische Lichtstreuung an Oligonukleotiden und Oligonukleotid-Wirkstoff-Komplexen: Molekulare Dimensionen von starren Stäbchen (Dissertation). Universität Bielefeld 1995.
- [Pro82] : S. W. PROVENCHER. 1982. Contin: A General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Intergal Equations, *Comp. Phys. Com.* **27**: 229-242.
- [Pul75] : D.E. PULLEYBLANK, A.R. MORGAN. 1975. The Sense of Naturally Occuring Superhelices in the Unwinding Angle of Intercalating Ethidium, *J. Mol. Biol.* **91**: 1-13.
- [Sch84] : D.C. SCHWARTZ, C.R. CANTOR. 1984. Separation of Yeast Chromosomal-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis, *Cell* **37**: 67-75.
- [Sch99] : T. SCHMIDT, K. FRIEHS, M. SCHLEEF, C. VOB, E. FLASCHEL. 1999. Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Electrophoresis, *Anal. Biochem.* **274**: 235-240.
- [See97] : N.C. SEEMAN. 1997. DNA Components for Molecular Architecture, *Acc. Chem. Res.* **30**: 357-363.
- [See98] : N.C. SEEMAN. 1998. DNA Nanotechnology: Novel DNA Constructions, *Annu. Rv.. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 225-248.
- [See00] : C.D. MAO, T.H. LABEAN, J.H. REIF, N.C. SEEMAN. 2000. Logical Computation Using Algorithmic Self-Assembly of DNA Triple-Crossover Molecules, *Nature* **407**: 493.
- [Sla95] : G.W. SLATER, P. MAYER, P.D. GROSSMANN. 1995. Diffusion, Joule Heating, and Broadening in Capillary Gel Electrophoresis of DNA, *Electrophoresis* **16**: 75-83.
- [Str99] : L. STRYER. Biochemie. 4. Aufl., 1. korr. Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1999.
- [SuS01] : SUSE GmbH, Schänzäckerstr. 10, D-90443 Nürnberg

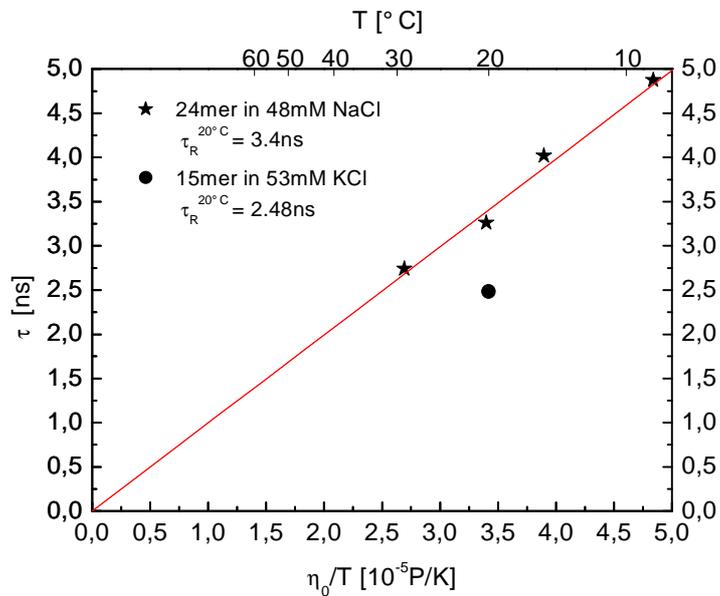
8 LITERATURVERZEICHNIS

- [Tai98] : S. MOHAMMADI, R. KLEMENT, A.K. SHCHYOLKINA, J. LIQUIER, T.M. JOVIN, E. TAILLANDIER. 1998. FTIR and UV Spectroscopy of Parallel-Stranded DNAs with Mixed AT/GC Sequences and Their AT/IC Analogues, *Biochemistry* **37**: 16529-16537.
- [Tas97] : D.M. Tasset, M.F. Kubik, W. Steiner. 1997. Oligonucleotide Inhibitors of Human Thrombin that Bind Distinct Epitopes, *J.Mol.Bio.* **272**: 688-698.
- [Voe95] : D. VOET, J.G. VOET. *Biochemistry*, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc. 1995.
- [Vos01] : C. VOß. 2001. Neue Verfahren zur Produktion von Plasmid DNA als Biopharmazeutikum. (Dissertation). Universität Bielefeld 2001.
- [Wal95] : R. WALKENHORST. 1995. Statische und dynamische Lichtstreuung an Polyelektrolytlösungen (Dissertation). Universität Bielefeld 1995.
- [Wan94] : PDB-Data Bank. Title: not available; Compound: DNA (5'-D(Ttggggttggggttggggttgggg)-3') (Tetrahymena Telomeric Sequence With Four Ttgggg Repeats) (NMR, 7 Structures); Authors: Y. Wang, D.J. Patel; Exp. Method: NMR; Deposition Date: 22-Aug-1994; Release Date: 01-Nov-1994; Polymer Chains: 186D; Residues: 24; Atoms: 509.
- [Wil94] : J.R. WILLIAMSON. 1994. G-Quartett Structures in Telomeric DNA, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 703-730.
- [Zwa65] : R. ZWANZIG. 1965. Time-Correlation Functions and Transport Coefficients in Statistical Mechanics, *Ann.Rev.Phys.Chem.* **16**: 67-102.

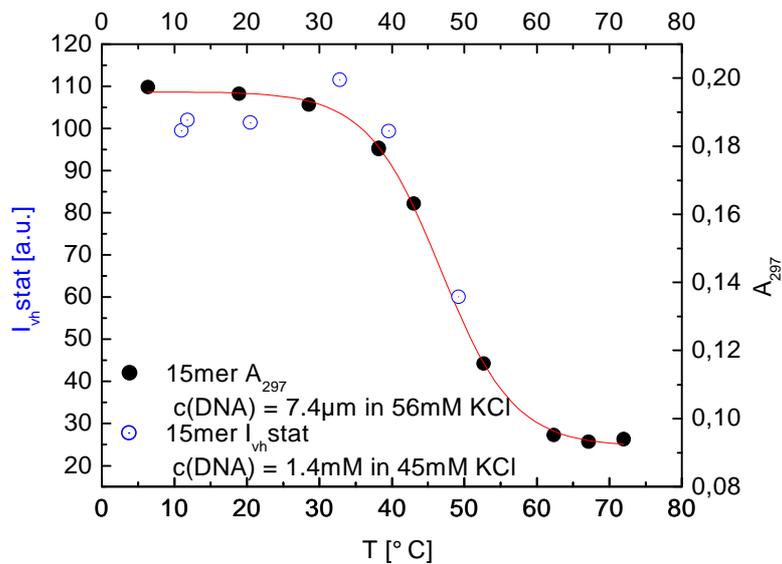
9 Anhang

9 ANHANG

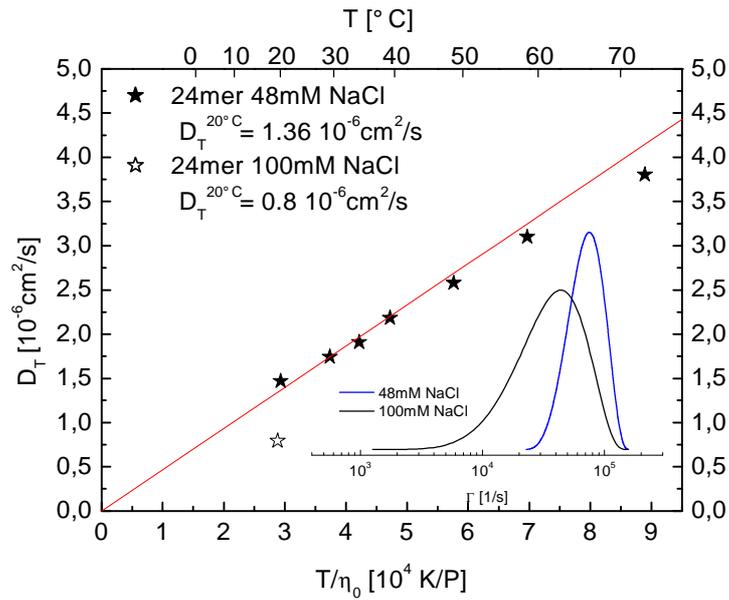
9.1 ABBILDUNGEN



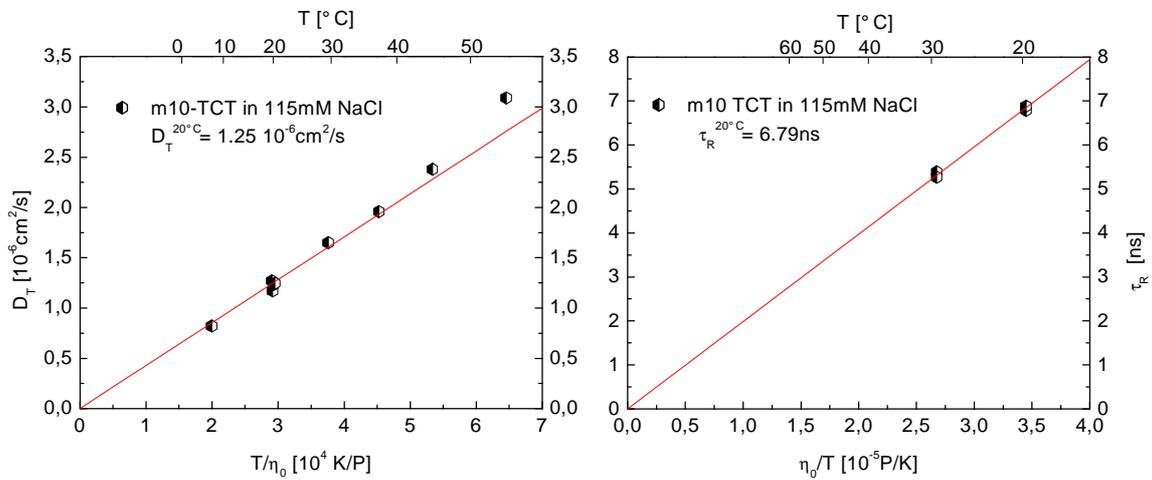
Anhang_Abb 1 : Stokes-Einstein-Debye Plot 15mer und 24mer.



Anhang_Abb 2 : Vergleich der temperaturabhängigen statischen Intensität des depolarisierten Streulichtes mit den temperaturabhängig ermittelten Absorptionswerten der UV-Spektroskopie am Beispiel des 15mers in $\approx 50\text{mM}$ KCl.

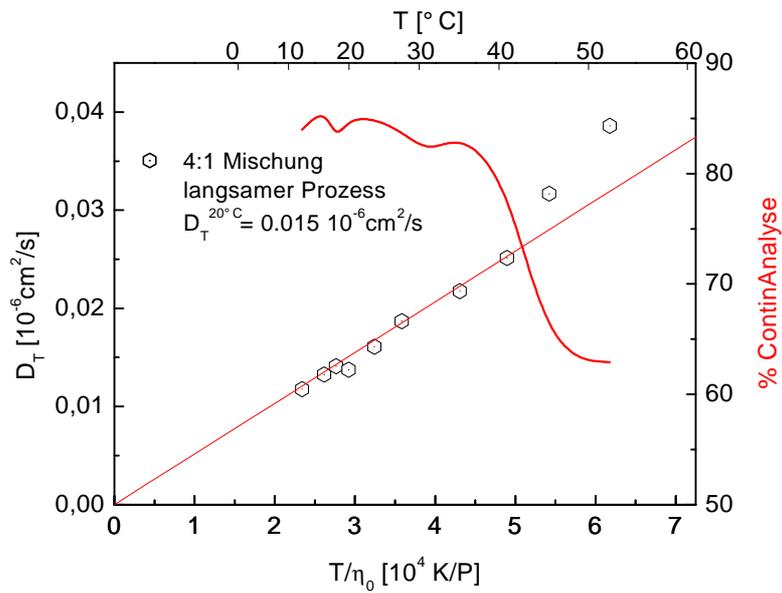


Anhang_Abb 3 : Stokes-Einstein Plot 24mer in NaCl. Die DNA-Konzentration beträgt immer 0.65mM.

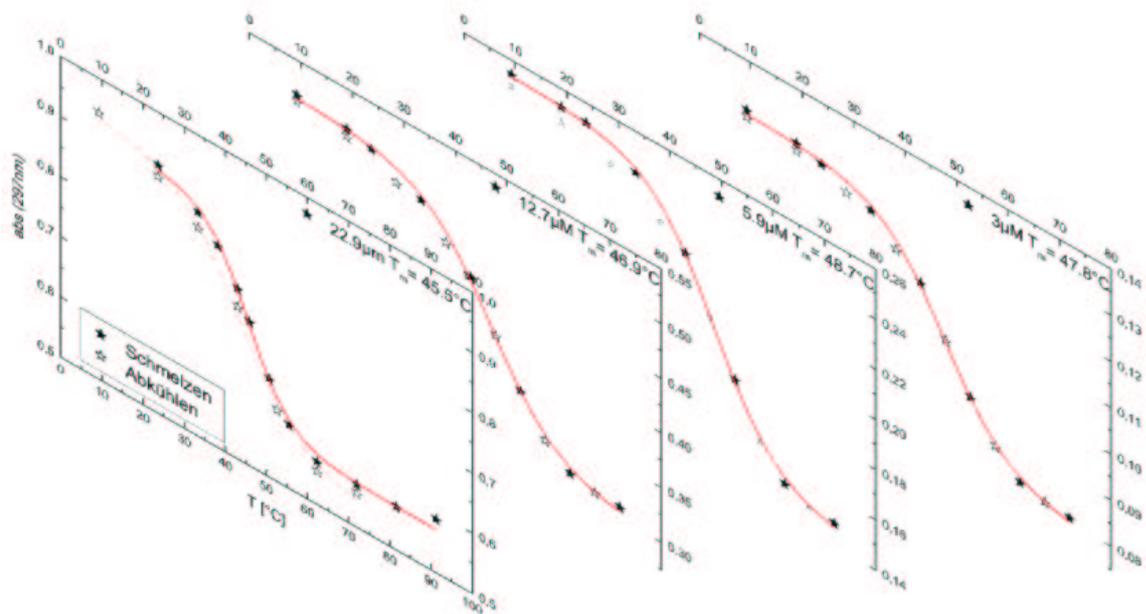


Anhang_Abb 4 : DLS-Daten der Sequenz 10merTCT.

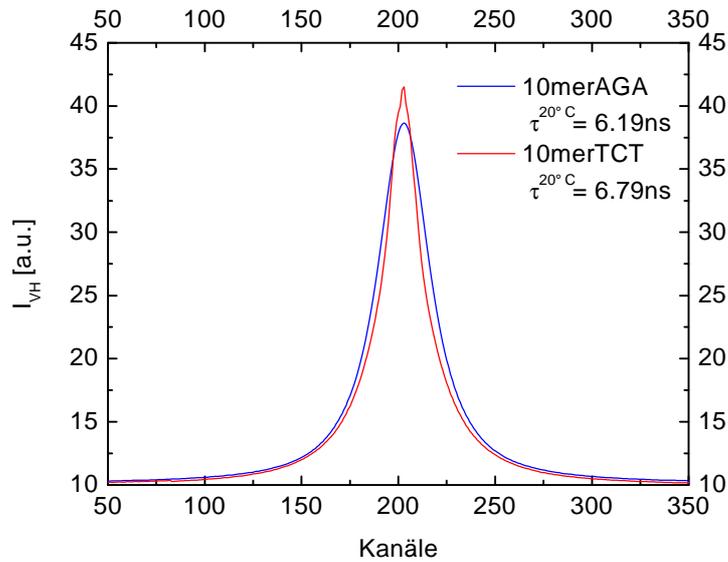
9 ANHANG



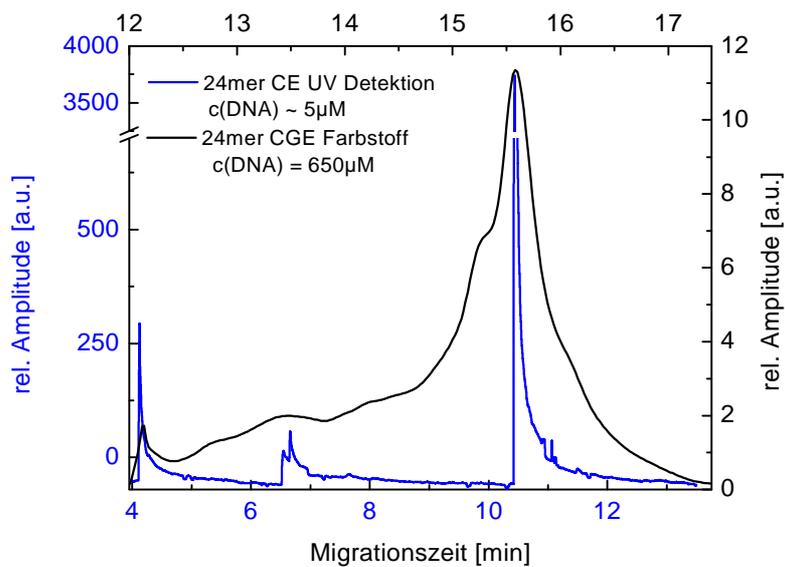
Anhang_Abb 5 : Stokes-Einstein Auftragung der 4:1 Mischung. $D_{T \text{ app.}}$ des langsamen Prozesses. In rot die Prozentanteile des langsamen Prozesses an der Gesamtstreuung.



Anhang_Abb 6 : Schmelz- und Reaggregationskurven des 24mers in 48mM NaCl.



Anhang_Abb 7 : Depolarisiertes Streulichtspektrum des 10merAGAs im Vergleich zum 10merTCT bei T = 20°C.



Anhang_Abb 8 : Vergleich der Elektropherogramme des 24mers aus der CGE mit LIF-Detektion und der CE mit LINF-Detektion.

DISKUSSION: Die in Kapitel 5 gezeigten Elektropherogramme von Guanin-reicher DNA weichen bezüglich Signalverlauf, Signalschärfe sowie Signalintensität und damit detektierten DNA Menge deutlich von Messungen an (Plasmid-) DNA ab (vgl. [Vos01]). Da mit der Kapillarelektrophorese Neuland in Bezug auf die Charakterisierung von G-DNA und daraus

9 ANHANG

gebildeten Quadruplexen betreten wird, ist es notwendig, die bis hierhin nicht quantifizierte Wechselwirkung von interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff mit tetrameren helikalen Strukturen zu beurteilen. Hierfür wird eine CE⁹⁸ Apparatur mit LINF-Detektion [Mos00] eingesetzt, wobei die gleichen Puffersysteme, Kapillartypen, effektiven Trennlängen, Injektionszeiten etc. wie schon in der BECKMANN-CGE verwendet werden. Die Probe (24mer in 100mM NaCl) wird *nicht* mit YOYO versetzt und um Faktor 110 gegenüber der Konzentration in der CGE-Messung verdünnt. Das erhaltene Elektropherogramm ist in Anhang_Abb 8 gezeigt.

Es zeigen sich drei Signale. Das Erste (mit $t = 4.1\text{min}$) und das Letzte (mit $t = 10.4\text{min}$) weisen nur ein Maximum auf und fallen mit einem Fuß zu längeren Zeiten ab. Das mittlere Signal mit $t = 6.7\text{min}$ zeigt eine Aufspaltung in zwei Maxima. Die Integrale der Signale lassen sich nur qualitativ auswerten. Wie in [Bro00] und [Ple98] beschrieben hängt die LINF-Intensität mit der vorhandenen Excimerbildung und damit mit der Tertiärstruktur des betrachteten Systems zusammen. Systematische Untersuchungen zu dieser Problematik sind zu Guanin-reicher DNA in der Literatur nicht beschrieben. Die Auswertung der Integrale ergibt ein Verhältnis von 1:1:14. Damit werden die Verhältnisse zwischen intramolekularer Spezies und tetramerer intermolekularer Spezies des 24mers, die über die UV-Spektroskopie ermittelt wurden (1:8), in der Größenordnung bestätigt. Das erstmals aufgelöste mittlere Signal, welches in dem Elektropherogramm der CGE im Ansatz zu erkennen ist, kann einer dimeren Hairpinstruktur zugeordnet werden. Die Feinaufspaltung ist ursächlich mit verschiedenen Loopkonformationen in Zusammenhang zu bringen und wurde auch schon beim Struktur-analogon des 14mers in der CGE beobachtet. Die Detektion dieser dimer-Hairpin Struktur des 24mers schließt die Lücke der möglichen Strukturen die bei Umlagerungen zwischen intramolekularen monomeren und tetrameren Tetraplexen dieser Sequenz gebildet werden könnten. Inwiefern die Untersuchungsbedingungen (μM -Konzentrationsbereich, Konzentrationsgradient in der Kapillare, auftretende Beschleunigung beim Anlegen der Hochspannung) zur Ausbildung dieser in der DLS nicht detektierten dimer-Hairpinstruktur beitragen und hier ein apparativ bedingter Teil eines dynamischen Prozesses beobachtet wird, kann nicht geklärt werden.

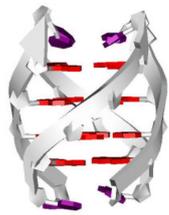
⁹⁸ Da als Laufpuffer wie in der CGE ein PAA-Gel verwendet wird, kann man auch hier von CGE Apparatur sprechen.

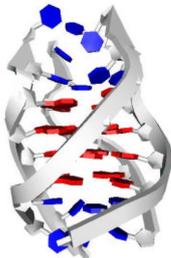
Da die auf die Migrationszeit einwirkenden apparativen Faktoren zwischen beiden Messungen absolut identisch sind, sich aber Laufzeiten und Trennleistung erheblich unterscheiden, können diese Unterschiede direkt auf die unterschiedlichen DNA Konzentrationen und vor allem auf die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes (Aufweitung der Struktur durch Interkalation, sowie Verringerung der Nettoladung des Polyanions durch Einlagerung des vierfach positiv geladenen YOYOs) in der CGE zurückgeführt werden.

Prinzipiell zeigt der Vergleich der beiden Elektropherogramme, dass Tetraplexe mit unterschiedlicher Stöchiometrie auch mit dem in der CGE eingesetzten Verfahren der Farbstoffdetektion aufgelöst werden können. In Anbetracht der hier offenbar werdenden Vorteile der LINF-Detektion, sollte bei zukünftigen Messungen auf dieses Verfahren zurückgegriffen werden.

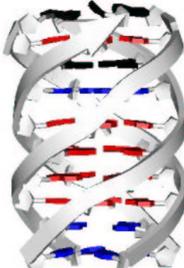
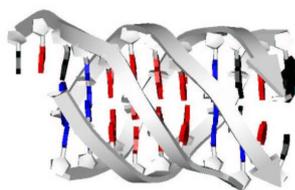
9 ANHANG

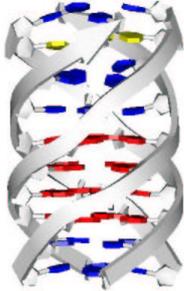
9.2 TABELLEN

6mer – r[UG₄U]				
Experimentelle Ergebnisse	DDLS τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]		UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]
55mM KCl	3.43 ± 0.14	1.46 ± 0.06		- / - / -
55mM NaCl	-	-		≥ 90 / - / -
Modellrechnungen	pdb-File: 1RAU			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	Durchführung: wie in Kapitel 2.4 beschrieben.
	250	3,78	1,52	
	260	3,45	1,53	
	270	2,99	1,66	
	280	3,47	1,49	
	285	3,50	1,48	
	290	3,50	1,48	
	295	3,52	1,48	
	300	3,56	1,48	
	305	3,64	1,47	
	310	3,72	1,46	
	320	3,85	1,44	
	330	3,89	1,43	
	340	3,95	1,42	
	350	4,00	1,42	
	360	4,05	1,41	
	370	4,10	1,41	
	380	4,12	1,40	

8mer – d[T ₂ G ₄ T ₂]				
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
43mM KCl 50mM NaCl 100mM NaCl	5.42 ± 0.22 - -	1.45 ± 0.06 - -	- / - / - 53 / -323 / -768 55 / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Kro00]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	Durchführung: wie in Kapitel 2.4 beschrieben.
	250	4,99	1,50	
	260	4,94	1,50	
	270	5,2	1,47	
	280	5,69	1,42	
	285	-	-	
	290	6,05	1,39	
	295	-	-	
	300	6,15	1,37	
	305	-	-	
	310	6,85	1,33	
	320	7,10	1,32	
	330	7,23	1,30	
	340	7,44	1,29	
	350	7,58	1,28	
	360	7,97	1,26	
370	7,83	1,27		
380	7,78	1,26		
390	8,32	1,24		
400	8,45	1,23		

9 ANHANG

10merAGA – d[T₂G₄TAGA]						
	10merAGA, ein Strang antiparallel Ergebnisse der Modellrechnung sind grau unterlegt.					
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]		UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]		
120mM NaCl	6.19± 0.25	1.26 ± 0.05		O / O / O		
50mM NaCl	-	-		O / O / O		
100mM NaCl	-	-		55.6 / -557 / -1473		
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Kro00]					
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]		$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]		Durchführung:
	250	5,13	6,17	1,33	1,27	Die in [Kro00] eingesetzte Startstruktur wird am 3'Ende um ein T verkürzt. Daran wird eine tetramere helixförmige G ₃ -Einheit angesetzt und das erste und letzte Guanin gegen eine Adeninbase getauscht. Die 3'endständigen Thymin- und Adeninbasen werden Geometrieoptimiert (Abruchkriterium RMS-Gradient < 5kcal/mol). Anschliessend wird wie in Kapitel 2.4 beschrieben verfahren.
	260	5,33	6,45	1,32	1,25	
	270	6,16	6,66	1,25	1,24	
	280	6,27	6,87	1,25	1,23	
	285	6,40	7,02	1,25	1,23	
	290	6,48	7,17	1,24	1,22	
	295	6,51	7,21	1,24	1,23	
	300	6,54	7,22	1,24	1,23	
	305	6,60	7,21	1,23	1,23	
	310	6,40	7,28	1,24	1,23	
	320	6,26	7,38	1,25	1,22	
	330	6,40	7,43	1,24	1,22	
	340	6,46	7,63	1,23	1,21	
	350	6,72	7,92	1,22	1,19	
	360	6,84	8,07	1,21	1,18	
	360	7,02	8,41	1,20	1,15	
	360	7,02	8,43	1,20	1,15	

10merTCT – d[T ₂ G ₄ TTCT]				
Experimentelle Ergebnisse	DDL τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
115mM NaCl	6.79 ± 0.27	1.25 ± 0.05	O / O / O	
50mM NaCl	-	-	O / O / O	
100mM NaCl	-	-	43.0 / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Kro00]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	Die in [Kro00] eingesetzte Startstruktur wird am 3' Ende um ein T verkürzt. Daran wird eine tetramere helixförmige G ₃ -Einheit angesetzt und das erste und letzte Guanin gegen eine Thyminbase getauscht. Das mittlere G gegen ein Cytosinrest. Die 3' endständigen Thymin- und Cytosinbasen werden Geometrieoptimiert (Abruchkriterium RMS-Gradient < 5kcal/mol). Anschliessend wird wie in Kapitel 2.4 beschrieben verfahren.
	250	5,91	1,27	
	260	6,06	1,26	
	270	6,26	1,25	
	280	6,34	1,25	
	285	6,46	1,24	
	290	6,57	1,23	
	295	6,65	1,23	
	300	6,65	1,23	
	305	6,48	1,32	
	310	6,90	1,21	
	315	6,90	1,21	
	320	6,92	1,21	
	330	6,89	1,22	
340	6,91	1,22		
350	6,92	1,22		
360	7,03	1,21		
370	7,26	1,20		

9 ANHANG

12mer– d[T₂G₄T₆]	tetramerer Tetraplex			
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
50mM KCl	-	-	≈90 / O / O	
50mM NaCl	-	-	43.1 / O / O	
Modellrechnungen	-			
16mer– d[(AT)₈]	Duplex			
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
50mM NaCl	-	-	37.6 / O / O	
Modellrechnungen	-			
24mer– d[(CG)₁₂]	Duplex			
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
97mM NaCl	30.71 ± 2.5	0.90 ± 0.04	O / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Hyp96]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	Z-DNA mit der Sequenz CG ₁₂ mittels HyperChem aufgebaut und symmetrisch in zwei Teile geschnitten. Die Basen an der Schnittfläche wurden festgehalten (vgl. Kapitel 2.4) und mit beiden Teilen wie in Kapitel 2.4 verfahren. Nach dem Durchlauf der Optimierungsschritte wurden beide Teil an der Schnittfläche wieder zusammengefügt, die umgebenden Wassermoleküle in diesem Bereich gelöscht.
	250	27,41	0,98	
	260	27,92	0,97	
	270	29,90	0,95	
	280	30,90	0,93	
	285	31,16	0,92	
	290	31,74	0,91	
	295	32,02	0,90	
	300	32,32	0,90	
	305	32,34	0,91	
	310	32,64	0,91	
	315	32,86	0,90	
	320	32,90	0,90	
	330	33,34	0,90	
	340	33,67	0,89	
	350	34,52	0,88	
	360	35,28	0,88	
	370	35,65	0,87	
	380	35,80	0,87	

8mer- d[(CG)₄]	Duplex			
Experimentelle Ergebnisse	DDL S τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
100mM NaCl [Pec90]	3.22 ± 0.13	1.53 ± 0.06	O / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Hyp96]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	B-DNA mit der Sequenz CG ₄ mittels HyperChem aufgebaut, dann wie in Kapitel 2.4 verfahren.
	250	2,96	1,61	
	260	2,99	1,6	
	270	3,10	1,58	
	280	3,06	1,62	
	290	3,11	1,59	
	300	3,24	1,57	
	310	3,31	1,56	
	320	3,5	1,52	
	330	3,53	1,52	
	340	3,56	1,51	
	350	3,59	1,51	
	360	3,74	1,47	
	370	3,78	1,46	
380	3,86	1,46		
390	3,91	1,45		
400	3,96	1,44		

9 ANHANG

12mer– d[(CG)₆]	Duplex			
Experimentelle Ergebnisse	DDL S τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
100mM NaCl [Pec90]	6.39 ± 0.26	1.34 ± 0.05	O / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Hyp96]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	B-DNA mit der Sequenz CG ₆ mittels HyperChem aufgebaut, dann wie in Kapitel 2.4 verfahren.
	250	5,41	1,36	
	260	5,59	1,35	
	270	5,72	1,33	
	280	5,87	1,32	
	290	6,02	1,31	
	295	6,10	1,30	
	300	6,12	1,30	
	305	6,65	1,27	
	310	6,76	1,28	
	315	6,74	1,28	
	320	6,58	1,29	
	330	6,63	1,28	
	340	6,36	1,29	
	350	6,39	1,29	
	360	6,47	1,29	
370	6,65	1,27		
380	6,72	1,26		

16mer– d[(AT)₃(CG)₂(AT)₃]	Duplex			
Experimentelle Ergebnisse	DDLS τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
100mM NaCl [Poh95]	11.70 ± 0.47	1.14 ± 0.05	O / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Hyp96]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]	B-DNA mit der Sequenz d[(AT) ₃ (CG) ₂ (AT) ₃] mittels HyperChem aufgebaut. Dann wird wie bei dem Z- DNA Duplex des 24mers verfahren.
	250	9,47	1,17	
	260	10,14	1,14	
	270	10,75	1,12	
	280	10,71	1,12	
	290	10,81	1,11	
	300	10,98	1,11	
	310	11,25	1,10	
	320	11,51	1,09	
	330	11,74	1,08	
	340	11,92	1,07	
	350	12,03	1,07	
	360	12,40	1,06	
	370	12,64	1,05	
380	12,75	1,05		
390	12,92	1,04		
400	13,25	1,03		

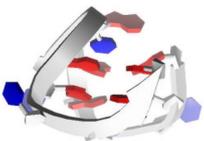
9 ANHANG

17mer– d[(CG)₃T₂GT₂(CG)₃]	Hairpin			
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
100mM NaCl [Poh95]	4.20 ± 0.17	1.46 ± 0.06	O / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Nie96]			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	Durchführung: wie in Kapitel 2.4 be- schrieben.
	250	3,41	1,59	
	260	3,59	1,56	
	270	3,92	1,54	
	280	3,89	1,56	
	285	3,92	1,56	
	290	3,77	1,60	
	295	4,06	1,53	
	300	4,32	1,49	
	305	4,35	1,48	
	310	4,38	1,48	
	315	4,44	1,47	
	320	4,53	1,46	
	330	4,61	1,45	
	340	4,78	1,43	
	350	4,83	1,43	
	360	4,93	1,42	
	370	5,00	1,41	
	380	5,15	1,40	

14mer – d[T₂G₄T₂G₄T₂]	Dimer-Hairpin						
Experimentelle Ergebnisse	DDLS τ^{20° [ns]			PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]			
48mM NaCl	4.74 ± 0.19			1.40 ± 0.06			
<i>114mM NaCl</i>	<i>11.80 ± 0.47</i>			<i>1.08 ± 0.04</i>			
55mM KCl	5.64 ± 0.23			1.35 ± 0.05			
119mM KCl	5.10 ± 0.20			1.40 ± 0.06			
Modell- rechnungen	pdb-File: aus 201D für parallel/antiparallele Loopordnung (dunkelgrau/hellgrau) aus 156D für cross Loopordnung (mittelgrau)						
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]			$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]		
	250	4,12	4,33	4,18	1,42	1,42	1,43
	260	4,28	4,5	4,13	1,40	1,40	1,42
	270	4,54	5,38	4,40	1,37	1,32	1,39
	280	4,79	5,02	4,71	1,35	1,38	1,37
	285	-	-	-	-	-	--
	290	5,06	5,05	4,80	1,32	1,40	1,36
	295	-	-	4,87	-	-	1,35
	300	4,82	5,86	4,89	1,35	1,28	1,35
	305	-	-	4,92	-	-	1,35
	310	5,21	5,92	4,96	1,31	1,28	1,34
	315	-	-	-	-	-	-
	320	5,30	5,97	4,99	1,31	1,27	1,34
	330	5,31	5,59	5,05	1,31	1,30	1,34
	340	5,41	5,61	5,23	1,30	1,30	1,32
	350	5,45	5,75	5,31	1,30	1,29	1,32
	360	5,61	5,94	5,51	1,28	1,27	1,30
	370	5,70	6,01	5,58	1,27	1,27	1,30
	380	5,74	5,99	5,64	1,27	1,27	1,29
	390	5,83	6,04		1,26	1,27	
	400	5,84	6,06		1,26	1,26	

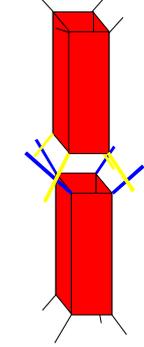
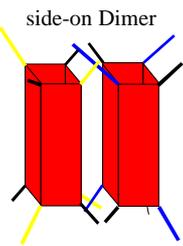
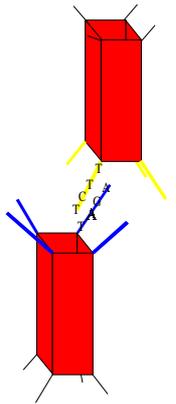
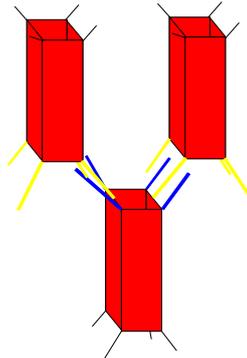
9 ANHANG

14mer – d[T₂G₄T₂G₄T₂]		Dimer-Hairpin	
		UV	
		T _m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
48mM NaCl		47.1 / -267 / -777	
114mM NaCl		O / O / O	
55mM KCl		76.4 / -293 / -787	
119mM KCl		78.0 / -304 / -815	
<p><i>Parallel:</i> die in der Struktur vorliegenden parallelen Loops werden auf zwei Thyminbasen gekürzt und im Vakuum geometrieoptimiert (Abbruch: RMS Gradient < 5kcal/mol). Der mittlere T4-Bereich wird symmetrisch geschnitten, und an den freien G-Enden der Stränge noch je zwei Thyminbasen in B-DNA Geometrie angesetzt. Diese Thyminbereiche werden auch im Vakuum wie oben Geometrieoptimiert. Strangorientierung ist anti-anti-syn-syn. Weiter wie in Kapitel 2.4.</p> <p><i>Antiparallel:</i> Mittlerer T4 Bereich wird symmetrisch geschnitten und mit freiem 5'G verknüpft. Erster T4 Bereich wird symmetrisch geöffnet, dritter T4 Bereich auf zwei Thyminen verkürzt und am 3'Ende zwei Thyminbasen in B-DNA Konformation angesetzt. Geometrieoptimierung wie oben. Weiter wie in Kapitel 2.4.</p> <p><i>Cross Loop:</i> Die beiden zentralen T4 Bereiche der Struktur werden um je zwei Thyminbasen gekürzt und der Loopbereich wie oben im Vakuum geometrieoptimiert. An den Enden der Sequenz wird je eine T2 Einheit in B-DNA Konformation angesetzt, wie oben geometrieoptimiert und dann wie in Kapitel 2.4 beschrieben verfahren.</p>			
14mer – d[T₂G₄T₂G₄T₂]	Als tetramerer Tetraplex		
Experimentelle Ergebnisse	DDL5 τ ^{20°} [ns]	PKS D _T ^{20°} [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T _m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]
114mM NaCl	11.8 ± 0.47	1.08 ± 0.04	O / O / O
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Nie96]		
Ergebnisse	d [nm]	τ ^{20°} [ns]	D _T ^{20°} [10 ⁻⁶ cm ² /s]
	250	10,53	1,12
	260	10,17	1,13
	270	11,12	1,09
	280	11,11	1,09
	290	11,64	1,07
	300	11,67	1,07
	310	11,82	1,07
	320	11,96	1,06
	330	12,11	1,06
	340	12,15	1,06
	350	12,18	1,05
	360	12,32	1,05
	370	12,36	1,05
	380	12,56	1,04
	390	12,51	1,04
	400	12,64	1,03
Durchführung: wie in Kapitel 2.4 beschrieben.			

15mer – d[G₂T₂G₂TGTG₂T₂G₂]				
Experimentelle Ergebnisse	DDL τ^{20° [ns]	PKS $D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
53mM KCl 48mM NaCl	2.48 ± 0.1 -	1.80 ± 0.07 -	46.7 / -191 / -596 23.0 / -117 / -397	
Modellrechnungen	pdb-File: aus 148d			
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]	$D_T^{20^\circ}$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	Durchführung: wie in Kapitel 2.4 beschrieben.
	250	2,07	1,82	
260	2,19	1,78		
270	2,39	1,72		
280	2,69	1,67		
290	2,87	1,62		
300	2,81	1,63		
310	2,84	1,62		
320	2,88	1,61		
330	2,92	1,61		
340	2,98	1,60		
350	3,05	1,59		
360	3,08	1,58		
370	3,16	1,57		
380	3,17	1,57		
390	3,21	1,56		
400	3,28	1,54		

9 ANHANG

24mer – d[(T₂G₄)₄]	Als intramolekularer Tetraplex (grau unterlegt) und tetramerer intermolekularer Tetraplex.					
Experimentelle Ergebnisse	DDLS τ^{20° [ns]		PKS $D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]		UV T_m [°C] / ΔH° [kJ/mol] / ΔS° [J/Kmol]	
48mM NaCl	3.40 ± 0.14		1.46 ± 0.06		47.2 / -162 / -507	
100mM NaCl	32.80 ± 1.31		0.80 ± 0.03		48.8 [#] / O / O	
Modellrechnungen	pdb-File: aus [Nie96][Hyp96]					
Ergebnisse	d [nm]	τ^{20° [ns]		$D_T^{20^\circ}$ [10^{-6} cm ² /s]		Das 14mer als tetramerer Tetraplex wird um die Endständigen Thyminbasen gekürzt und mit diesem 10mer wie in Kapitel 2.4 beschrieben verfahren. Die nach den verschiedenen Optimierungsschritten erhaltene Struktur wird mit der Endstruktur des 14mers zusammengesetzt, die Wassermoleküle im Überlappungsbereich manuell entfernt.
	250	3,02	28,67	1,51	0,87	
	260	3,06	29,32	1,51	0,87	
	270	3,20	30,02	1,48	0,86	
	280	-	31,17	-	0,84	
	285	-	-	-	-	
	290	3,49	31,99	1,44	0,85	
	295	3,60	-	-	-	
	300	-	32,09	1,42	0,83	
	305	3,69	-	-	-	
	310	-	32,16	1,42	0,83	
	315	3,75	-	-	-	
	320	-	32,47	1,41	0,83	
	330	3,79	32,37	1,40	0,83	
	340	3,86	32,46	1,39	0,83	
	350	3,96	32,85	1,38	0,82	
	360	4,07	33,02	1,36	0,82	
	370	4,12	33,18	1,35	0,82	
	380	4,20	33,47	1,34	0,82	
	390	4,21		1,36		
	400	4,30		1,35		

end-to-end Dimere	Als Beispiele für niedermolekulare Assoziat.
Modellrechnungen	pdb-File: aus 10merTCT und 10merAGA
<p>Ergebnisse</p> <p>es wurden nur Berechnungen für eine Wasserhülle von 285pm durchgeführt.</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>end-to-end Dimer</p>  <p>$D_T^{20^\circ\text{C}} = 0.9 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ $\tau^{20^\circ\text{C}} = 22\text{ns}$</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>side-on Dimer</p>  <p>$D_T^{20^\circ\text{C}} = 1.0 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ $\tau^{20^\circ\text{C}} = 14\text{ns}$</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>end-to-end Dimer</p>  <p>$D_T^{20^\circ\text{C}} = 0.5 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ $\tau^{20^\circ\text{C}} = 398\text{ns}$</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>end-to-end Trimer</p>  <p>$D_T^{20^\circ\text{C}} = 0.8 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ $\tau^{20^\circ\text{C}} = 23\text{ns}$</p> </div> </div> <p>1-4 Teile der komplementären Endbereiche werden im 45° Winkel von der Hauptachse des Moleküls abgespreizt und mit den jeweils komplementären Basen des Partnermoleküls verbunden. Dabei wird der Abstand der Basen auf die Standardentfernung in B-DNA gesetzt. Der Winkel wird durch manuelle Modifikation der Bindungswinkel des Zucker-Phosphat Rückrades des einzelnen Thymins erreicht. Da die Einzelsysteme des 10merAGAs und 10merTCTs solvatisiert werden, kann nach der Vereinigung der Teile kein weiterer Optimierungsschritt durchgeführt werden. Es werden nur noch die überlappenden Wassermoleküle manuell entfernt.</p>

9 ANHANG

9.3 ABKÜRZUNGEN

A	Absorption
ASA	Accessible Surface Area
bp	basepairs
CE	Capillar Elektrophoresis
CGE	Capillar Gel Electrophoresis
CSA	Contact Surface Area
DLS	Dynamic Light Scattering
DDLS	Depolarised Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FPI	Fabry Perot Interferometrie
FSB	Freier Spektraler Bereich
ILT	Inverse Laplace-Transformation
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz
LINF	Laser induzierte natürliche Fluoreszenz

pdb	Brookhavn Protein data Bank
PKS	Photonenkorrelationsspektroskopie
RNA	Ribonucleic Acid
SE	Stokes-Einstein
SED	Stokes-Einstein-Debye
TE	Tris und EDTA
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett
VdW	Van der Waals
YOYO [®]	<p>1,1'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio) -3,1-propanediyl]]bis[4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene) methyl]]-,tetraiodide</p>

9.4 LEBENSLAUF

Mischa-Peter Bolten

geboren am 19.07.1970 in Orsoy/Rheinberg

Schulbildung: 8/1976 – 6/1980 Grundschule Eick-Ost/Moers

8/1980 – 5/1990 Gymnasium Rheinkamp/Moers

Studium: 10/1990 Beginn des Chemiestudiums an der Universität Bielefeld

1-2/1997 Diplomprüfungen

3/1997 – 1/1998 Anfertigung der Diplomarbeit im Bereich der physikalischen Chemie im Arbeitskreis von Priv. Doz. Dr. Wolfgang Eimer.

Thema: „Intra- und intermolekulare Assoziation telomerer DNA in Lösung. Ein Vergleich von dynamischen Lichtstreuergebnissen und hydrodynamischen Modellrechnungen.“

Dissertation: 2/1998 – 9/2001 Dissertation im Bereich der physikalischen Chemie im Arbeitskreis von Priv. Doz. Dr. Wolfgang Eimer.

Thema: „Struktur und Dynamik telomerer DNA in Lösung. Kationenspezifischer Einfluss auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen.“

9.5 VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich, Mischa Peter Bolten, geb. 19.07.1970, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegeben Mittel verfasst zu haben.