

# Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der  
Fakultät für Physik  
der  
Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Mark Schüttpezl  
aus Gütersloh

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2006



---

# **Fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Charakterisierung von Protein-Wechselwirkungen**

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer  
Priv.-Doz. Dr. Robert Ros

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Bedeutung der Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen .....	2
1.2	Protein-Protein-Wechselwirkungen.....	4
1.2.1	Das Tumorsuppressorprotein p53 .....	5
1.3	Protein-RNA-Wechselwirkungen .....	7
1.3.1	Der zirkadiane Slave-Oszillator in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
1.3.2	Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) .....	11
<b>2</b>	<b>Physikalische Grundlagen</b> .....	<b>13</b>
2.1	Absorption und Fluoreszenz von Molekülen .....	13
2.2	Fluoreszenz von Farbstoffen und Biomolekülen.....	17
2.2.1	Der Farbstoff MR121 .....	17
2.2.2	Fluoreszenz von Biomolekülen.....	18
2.3	Fluoreszenzquanteneffizienz und -lebensdauer .....	22
2.4	Fluoreszenzlöschung.....	24
2.5	Theorie der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	30
2.5.1	Autokorrelation.....	31
2.5.2	Diffusion.....	32
2.5.3	Konformationsdynamik .....	33
2.5.4	Autokorrelation.....	34
2.5.5	Grenzen der FCS.....	37
<b>3</b>	<b>Biologische Grundlagen</b> .....	<b>40</b>
3.1	Aufbau von DNA und RNA.....	40
3.2	Proteinbiosynthese in Zellen.....	41
3.3	Aminosäuren und Proteine .....	44
3.4	Eigenschaften zirkadianer Oszillatoren.....	48

<b>4</b>	<b>Methoden und experimenteller Aufbau .....</b>	<b>53</b>
4.1	Nachweis von Protein-Wechselwirkungen.....	53
4.1.1	Nachweis mittels ELISA und Gelelektrophorese .....	53
4.1.2	Analyse von Bindungsexperimenten .....	56
4.2	UV-FLIM .....	57
4.2.1	Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer .....	57
4.2.2	Experimenteller Aufbau .....	59
4.2.3	Datenauswertung .....	63
4.3	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	64
4.3.1	Experimenteller Aufbau .....	64
4.3.2	Durchführung.....	66
4.3.3	Datenauswertung .....	67
4.4	Modifikation von Oligonukleotiden mit organischen Farbstoffen .....	70
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>74</b>
5.1	Untersuchung der nativen UV-Fluoreszenzlebensdauer von Biomolekülen... 74	
5.1.1	Einfluss von Photobleaching .....	74
5.2	Fluoreszenzlebensdauer von Tryptophan in Abhängigkeit vom pH-Wert..... 76	
5.3	Untersuchungen zur Proteinfaltung des menschlichen Serumalbumins .....	84
5.3.1	Bestimmung der freien Entfaltungsenergie .....	89
5.4	Nachweis von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen auf Nitrocellulose..... 91	
5.4.1	Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer von Proteinen.....	93
5.4.2	Untersuchung spezifischer Bindungen auf Nitrocellulosemembranen .....	97
5.4.2.1	Wahl eines geeigneten Blockers .....	97
5.4.2.2	Überprüfung der Spezifität der Bindung .....	99
5.4.3	Nachweis von p53-Peptidpitop-BP53-12-Wechselwirkungen .....	100
5.5	Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen .....	105
5.5.1	Modellierung der mRNA-Sekundärstruktur mittels MFOLD.....	105
5.5.2	Modellierung des Proteins AtGRP7 .....	108
5.6	Methoden zum Nachweis von Protein-RNA-Wechselwirkungen .....	110
5.6.1	UV-FLIM .....	111
5.6.2	Gelelektrophorese .....	112

5.7	Nachweis der Bindung von AtGRP7 an RNA-Oligonukleotide .....	116
5.7.1	Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_d$ .....	119
5.7.2	Untersuchung der Bindung einer doppelsträngigen RNA .....	120
5.8	Nachweis der Bindung von AtGRP7 an DNA-Oligonukleotide .....	123
5.9	Eingrenzung der AtGRP7-bindenden Sequenz .....	127
5.10	Untersuchung der RNA auf Konformationsänderungen .....	130
5.10.1	Vergleich zwischen Hairpin und unstrukturierter Bindesequenz .....	133
5.10.2	Überprüfung der Hairpin-Struktur .....	135
5.10.3	Untersuchung der Bindung von AtGRP7 .....	137
5.11	Untersuchung der Konformationsdynamik von Oligonukleotiden .....	140
5.12	Flexibilität des Rückgrats von DNA und RNA .....	150
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>155</b>
6.1	Protein-Protein-Wechselwirkungen .....	155
6.2	Protein-RNA/DNA-Wechselwirkungen .....	157
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>162</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>164</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>176</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>177</b>

# 1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden neue Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Protein-Wechselwirkungen vorgestellt und an biologischen Modellsystemen überprüft. Dazu wird ein sensitives, ausschließlich auf der nativen Fluoreszenz von Proteinen basierendes, Nachweisverfahren entwickelt. Protein-Wechselwirkungen werden dabei nur durch eine Änderung der intrinsischen Fluoreszenzlebensdauer nachgewiesen. Dieses Verfahren wird anschließend eingesetzt, um die Bindung eines p53-Modellantikörpers an ein kurzes p53-Peptid epitop nachzuweisen und zu quantifizieren. p53-Autoantikörper sind unabhängige und hochspezifische Tumormarker mit einem hohen Potenzial zur Diagnose und Früherkennung von Krebserkrankungen, wodurch sie in der modernen Krebsforschung vermehrt an Bedeutung gewonnen haben [1].

In einem zweiten Teil beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Nachweis und der Aufklärung von Protein-RNA-Wechselwirkungen am Beispiel des Proteins AtGRP7 und seiner kodierenden RNA in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, die einen so genannten zirkadianen Slave-Oszillator darstellen. Mittels schneller Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) wird zum einen die spezifische Bindung des Proteins an seine RNA untersucht und auf wenige Nukleotide eingegrenzt, zum anderen werden auch die Konformationen bzw. Konformationsänderungen auf Grund der Protein-RNA-Wechselwirkung an Hand synthetischer Hairpin-Strukturen und nativer Oligonukleotide analysiert, um auf den molekularbiologischen Bindungsmechanismus zu schließen. Für diese Messungen werden unterschiedliche Farbstoff-markierte kurze DNA- und RNA-Oligonukleotide eingesetzt, die Teile der bekannten Bindesequenz des Proteins an seine RNA sind.

Im folgenden Teil der Einleitung werden beide Verfahren zum Nachweis von Protein-Wechselwirkungen vorgestellt. Es wird insbesondere auf den biologischen Hintergrund eingegangen, der die durchzuführenden Experimente motiviert. Dazu wird zunächst ein Überblick über Wechselwirkungen von Proteinen mit anderen Biomolekülen gegeben und auf ihre Bedeutung für die Molekularbiologie wie auch für die Proteomics bis hin zur Systembiologie eingegangen. Anschließend erfolgt die Darstellung des untersuchten biologischen Modellsystems sowie eine kurze Darstellung der verwendeten Technik.

## 1.1 Bedeutung der Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen

Ein überraschendes Ergebnis der Sequenzierung des menschlichen Genoms stellte die geringe Anzahl an Genen dar, die insgesamt auf 20000 bis 25000 geschätzt wird [2]. Nur ein sehr kleiner Anteil (1,1% bis 1,4%) der gesamten Genomsequenz kodiert somit Proteine [3, 4]. Verglichen mit anderen Modellorganismen wie der Fruchtfliege mit ~13000 Genen oder dem Fadenwurm mit ~18000 Genen erscheint die Anzahl menschlicher Gene gering, insbesondere unter Berücksichtigung der hohen Komplexität des menschlichen Organismus.

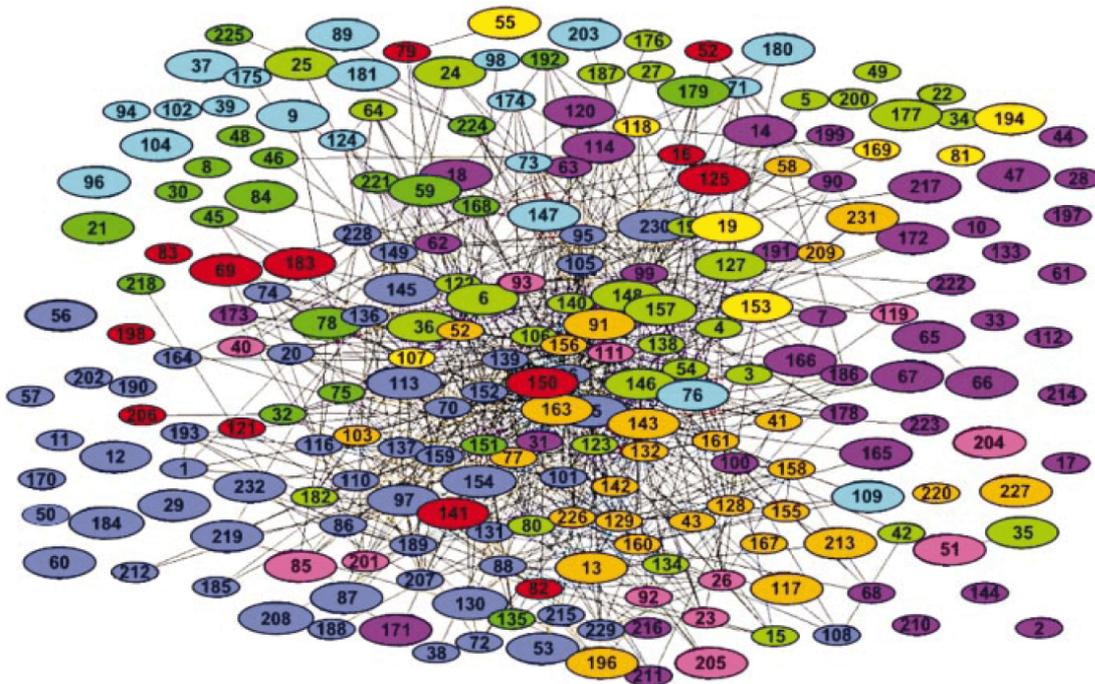


Abbildung 1.1: Das Netzwerk der Protein-Komplexe in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Komplexe, die mindestens ein Protein gemeinsam haben, sind durch Linien miteinander verbunden [5].

Proteine sind aber auf Grund ihrer Vielseitigkeit dennoch die bedeutendste Gruppe von Biomolekülen in einem Organismus. Sie sind an nahezu allen biochemischen Prozessen beteiligt und erfüllen eine Vielzahl von Funktionen wie z.B. die Immunabwehr durch Antigen-Antikörper-Bindungen, den Transport lebenswichtiger Substanzen im Blutkreislauf, die enzymatische Katalyse und auch Muskelbewegung

oder mechanische Stützfunktionen. Bei der Ausübung ihrer Funktion kommt es meistens zu komplexen Wechselwirkungen von Proteinen mit anderen Proteinen [6, 7], mit Peptiden [8], wie auch mit DNA [9-11] oder RNA [12, 13]. Die am häufigsten vorkommenden Protein-Protein-Wechselwirkungen finden dabei auf fast jeder Ebene der Zelle statt. Fehlerhafte Protein-Protein-Wechselwirkungen hingegen können neurologische Fehlfunktionen, wie beispielsweise die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, verursachen und werden daher intensiv erforscht.

Für die Analyse des gesamten Genoms eines Organismus hat sich international der Begriff Genomics etabliert. Durch die Untersuchung der Proteine und ihrer Wechselwirkungen – die Proteomics – erhofft man sich, Interaktionen zwischen unterschiedlichen Proteinkomplexen und damit ihre Zellfunktionen besser verstehen zu können. Hier setzt man hohe Erwartungen in die Systembiologie, die versucht, einen Organismus als interagierendes Netzwerk von Genen, Proteinen und chemischen Reaktionen zu sehen. Bei diesem Ansatz konnte am Beispiel von Hefezellen ein umfassendes Bild [Abbildung 1.1] der zahlreichen Wechselwirkungen der Protein-Komplexe aufgezeigt werden [5, 14].

Voraussetzung für alle „omics“-Ansätze ist die Verfügbarkeit von Hochdurchsatz-Screeningverfahren. Im Vergleich zur DNA-Sequenzierung mit 500000 Basenpaaren pro Tag sind Methoden für die funktionelle Genomanalyse noch nicht so weit entwickelt. Während sich zwar für Untersuchungen des Genoms die DNA-Microarray-Technologie in Form von „Gen-Chips“ dem Produktionsstadium nähert, bedarf diese Methodik für die Proteinanalyse mittels „Protein-Chips“ noch erheblicher Weiterentwicklung. So können mit den derzeit verfügbaren Geräten Expressionsniveaus von lediglich 1000 Proteinen pro Tag bestimmt werden [15, 16]. Bei anderen Verfahren werden die Zellproteine elektrophoretisch oder chromatographisch aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch identifiziert, um dadurch die Proteinexpression, also Anzahl, Größe und chemische Zusammensetzung der Proteine in einer Zelle, zu analysieren. Die beobachteten Protein-Protein-Wechselwirkungen werden in entsprechenden Datenbanken verwaltet [17].

## 1.2 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Zusätzlich zu den bereits genannten Verfahren gibt es auch noch eine Vielzahl fluoreszenzspektroskopischer Methoden, mit denen Protein-Wechselwirkungen untersucht werden können. So zum Beispiel die zeitaufgelöste Spektroskopie, Fluoreszenzanisotropie-Messungen oder FRET (Förster Resonance Energy Transfer) [18]. All diese Methoden sind zwar sehr sensitiv für Protein-Wechselwirkungen, jedoch ist dafür die Markierung der Proteine mit fluoreszierenden Farbstoffen notwendig. Problematisch ist dabei, dass diese kovalent gebunden sind und die Wechselwirkung mit anderen Proben während der Untersuchung stören können. Damit die Probe auch nach der Markierung ihre biologische Funktion behält, ist bei der Markierung Vorsicht geboten. Dies ist der Grund, aus dem immer mehr markierungsfreie Verfahren verfügbar werden, wie die „Nanowire“-Nanosensoren [19], AFM-Kraftspektroskopie [20, 21] und Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR)-Spektroskopie. Mittels kommerziell erhältlicher Geräte ist es möglich, nicht nur die Thermodynamik sondern auch die Kinetik molekularbiologischer Wechselwirkungen, wie Rezeptor-Ligand-Bindungen, markierungsfrei zu untersuchen [22, 23].

In dieser Arbeit wird eine weitere markierungsfreie Methode für den Nachweis und die Quantifizierung von Protein-Wechselwirkungen entwickelt. Diese basiert auf der zeitaufgelösten Detektion der nativen Tryptophan-Fluoreszenz von Proteinen. Die Aminosäure Tryptophan ist als Baustein von Proteinen in mehr als 99,5% der bekannten menschlichen Proteine mit einem Molekulargewicht über 10kDa enthalten [24]. Dadurch entfallen sowohl die zeitaufwendige Markierung der Proteine als auch die darauf folgenden Waschschriffe, so dass auch kleine Probenmengen oder *in vivo* Messungen möglich werden. Tryptophan ist im Gegensatz zu kommerziellen Farbstoffen aber instabiler bzgl. Photobleichen und besitzt eine geringere Quanteneffizienz. Die Vorteile der nativen Proteinfluoreszenz zeigen sich jedoch in ihrer Fluoreszenzlebensdauer, die sehr stark von der chemischen Umgebung abhängt. Darüber hinaus ist sie unabhängig von der stationären Fluoreszenzintensität, die durch Streuung und Absorption unterschiedlich sein kann.

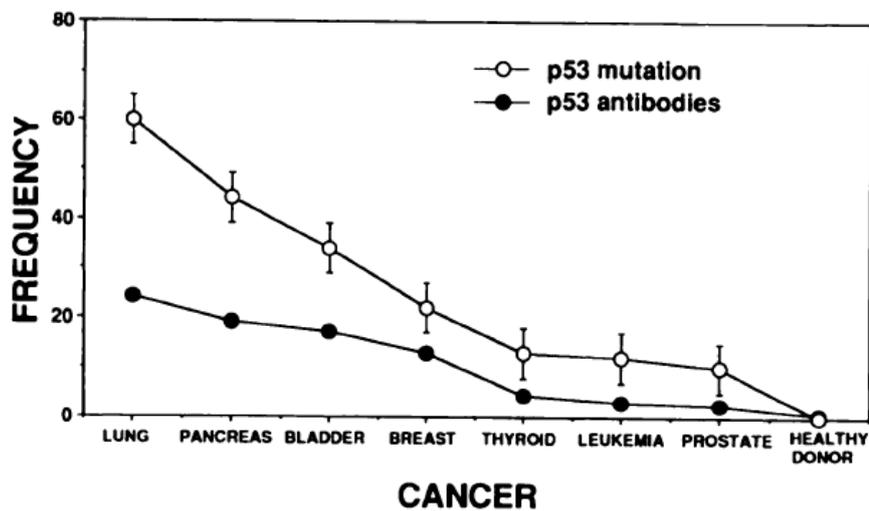
In der medizinischen Analytik wird der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) als Standardverfahren eingesetzt. Dabei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an das nachzuweisende Antigen binden. Dieser oder ein weiterer Antikörper, der an den

Antigen-Antikörper-Komplex bindet werden zuvor mit einem Enzym markiert. Eine durch das Enzym katalysierte Reaktion führt zu einem Farbausschlag und dient somit als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Basierend auf diesem Verfahren soll ein Antigen aber lediglich durch die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer detektiert werden und dadurch schneller und einfacher anzuwenden sein. Darüber hinaus soll das vorgestellte Verfahren das Potenzial haben, durch „Protein-Chips“ im Hochdurchsatz-Screening eingesetzt zu werden.

### **1.2.1 Das Tumorsuppressorprotein p53**

Beispielhaft wird das für die Krebsforschung bedeutende Tumorsuppressorprotein p53 und ein Modellantikörper verwendet. Das Protein p53 wurde 1979 von Lane [25] und Levine [26] unabhängig voneinander entdeckt. p53 ist ein Phosphoprotein, das bei Menschen nur schwer im Zellkern normaler Zellen nachzuweisen ist [27]. Erst im Zusammenhang mit der Reparatur einer zerstörten DNA wird das Protein p53 aktiv. p53 kann dann verhindern, dass eine normale Zelle zu einer Tumorzelle wird, denn nach DNA-Schädigung reguliert es als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion des programmierten Zelltods, der so genannten Apoptose, oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind [28]. Dies hat dem Protein den Beinamen „Wächter des Genoms“ eingebracht [29]. Für Tumorzellen ist charakteristisch, dass sich während des Tumorwachstums genetische Veränderungen anhäufen. Es ist daher nicht erstaunlich, dass bei menschlichen Krebserkrankungen in fast 50% aller Fälle eine genetische Veränderung des p53-Proteins festgestellt wird und diese Veränderung somit zu den am häufigsten gefundenen gehört [30, 31]. Dabei handelt es sich bei mehr als 95% dieser genetischen Veränderungen des p53-Proteins um Punktmutationen, die sich über den zentralen Teil des Gens verteilen. Auf Grund dieser Mutationen kommt es zu Veränderungen in einer zentralen hydrophoben Domäne des Proteins, die äußerst wichtig für die Tumorsuppressorfunktion des Proteins ist. Als Folge dessen findet eine Inaktivierung der Proteinfunktionalität statt. Der Verlust der p53-Funktion spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Krebs, sie ist jedoch nicht der ursächliche Auslöser für das unkontrollierte Wachstum von Zellen.

Die Genmutation hat auch Einfluss auf die Proteinstabilität. Ein mutiertes p53-Protein, das eine veränderte Konformation aufweist, hat eine Halbwertszeit von mehreren Stunden, während normales p53 (Wildtyp) eine Halbwertszeit von ~20 Minuten hat. Daher akkumuliert mutiertes p53 im Zellkern von Tumorzellen in dem Maße, dass es sich sogar immunologisch nachweisen lässt [1]. Zusätzlich führt diese Menge p53-Protein zu einer vermehrten Produktion von Antikörpern gegen p53. Im Blutserum von unterschiedlichen Krebspatienten konnten Antikörper gegen das p53 gefunden werden [28]. Diese werden als p53-Autoantikörper bezeichnet, weil sie gegen ein körpereigenes Antigen gerichtet sind. [Abbildung 1.2] zeigt die Korrelation zwischen p53-Antikörpern und p53-Genmutationen für verschiedene Krebsarten [32].



**Abbildung 1.2: Korrelation zwischen p53-Antikörpern und p53-Genmutationen für verschiedene Krebsarten [32].**

Obwohl der Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Krebsarten, den damit verbundenen Genmutationen und der Produktion von p53-Autoantikörpern bislang noch nicht vollständig verstanden wurde, eröffnet dies eine neue Möglichkeit für diagnostische Anwendungen. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von p53-Antikörpern eine Krebserkrankung mit einer Spezifität von 96% indizieren, während die p53-Antikörper in Körperflüssigkeiten gesunder Probanden mit weniger als 0,5% nur sehr selten auftraten [28]. In wenigen, aber sehr verbreiteten Krebsarten wie Lungen- oder Leberkrebs kann p53-Autoantikörper unter Umständen für die Krebsfrüherkennung oder Diagnose von Folgeerkrankungen verwendet werden [33].

Die Bindestellen der Immunantwort am p53-Antigen konnten durch Serumantikörper von Krebspatienten mit unterschiedlichen Krebsarten sehr genau eingegrenzt werden. Dazu wurde das gesamte p53-Protein in kurze einander überlappende Peptide aufgeteilt. Jedes synthetisierte Peptid wurde als Antigen mit ELISA auf Bindung von p53-Antikörpern im Blutserum untersucht, so dass lineare p53-Peptidepitope gefunden werden konnte, die sich im C- und N-terminalen Bereich des Proteins befinden und gänzlich verschont von Mutationen sind [34]. Zwei dieser kurzen Peptide in der N-terminalen Region (Aminosäuren 11-35 bzw. 41-60) sind unabhängig von der Art der Krebserkrankung. 98% der untersuchten Seren reagierten mindestens mit einem dieser beiden Peptide. Daher ist der Einsatz dieser Peptidepitope viel versprechend für p53-Autoantikörper-Immunoassays.

Routinemäßig wird der nach einem heterogenen Verfahren arbeitende ELISA zur Detektion von p53-Autoantikörpern eingesetzt, dessen Nachweisgrenze im Bereich von  $10^{-9}$ M bis  $10^{-11}$ M liegt. Große Nachteile dieses Tests sind die Testdauer, die im Bereich von mehreren Stunden liegt und die Tatsache, dass nach jeder Inkubation zusätzliche Waschschriffe erforderlich sind. Außerdem kann es dazu kommen, dass ein ELISA durch unspezifische Bindung falsche Positivsignale liefert. Bei der Untersuchung einer Körperflüssigkeit auf p53-Antikörper entstehen darüber hinaus auch hohe Kosten, weil dazu rekombinantes p53-Protein verwendet wird. In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels zeitaufgelöster nativer UV-Fluoreszenz entwickelt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, die Bindung von p53-Antikörpern an unmarkierten Peptidepitopen nachzuweisen und zu quantifizieren.

### **1.3 Protein-RNA-Wechselwirkungen**

Neben Protein-Protein-Wechselwirkungen werden in dieser Arbeit auch Protein-RNA-Wechselwirkungen untersucht. Dazu verwendet man kurze farbstoffmarkierte RNA-Oligonukleotide und das Protein AtGRP7 aus dem physiologischen System eines zirkadianen Slave-Oszillators in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Im Folgenden werden sowohl der biologische Hintergrund, wie auch die sich daraus ergebenden Experimente vorgestellt.

### 1.3.1 Der zirkadiane Slave-Oszillator in *Arabidopsis thaliana*

Die *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand, Schottenkresse) ist eine in der Natur relativ häufig vorkommende kleine blühende Pflanze aus der Familie der



**Abbildung 1.3: Zeichnung der Pflanze *Arabidopsis thaliana***

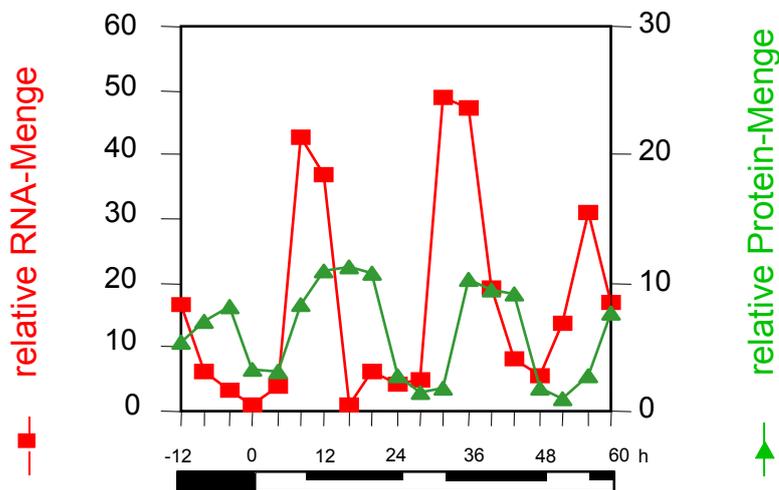
Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*). Obwohl sie keine landwirtschaftliche Bedeutung hat, befinden sich in derselben Familie die so genannten Wintergemüse wie verschiedene Kohlsorten aber auch Raps, Senf, Meerrettich oder Kresse. Die *Arabidopsis thaliana* wurde 1943 erstmals als biologischer Modellorganismus vorgeschlagen und ist heute eine Modellpflanze mit wichtigen Eigenschaften für die genetische und molekularbiologische Grundlagenforschung: Sie hat ein mit 125 Megabasen relativ kleines Genom, das im Jahr 2000 sequenziert wurde. Seitdem weiß man, dass es vorwiegend aus kodierenden DNA-Sequenzen

besteht. Der Generationszyklus, also die Zeit von der Keimung des Samens bis zur Reife, beträgt lediglich 6 Wochen und eine Langzeitaufbewahrung der Samen ist ausgesprochen einfach. Daher sind bereits viele Mutanten kommerziell erhältlich. Besonders wichtig für ihre Bedeutung als Modellorganismus ist aber, dass *Arabidopsis thaliana* die Physiologie höherer Pflanzen repräsentiert.

Seit der ersten Beschreibung der Bewegung der Blätter im Tagesverlauf im 17. Jahrhundert interessieren sich Wissenschaftler für den Mechanismus der biologischen Uhr von Pflanzen. Diese innere Uhr kontrolliert eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. die Blätterbewegung, Photosynthese oder die Expression von Genen. Entsprechend der Tag-Nacht-Dauer auf Grund der Erdrotation geschieht dies in einem 24 Stunden-Rhythmus. Obwohl Menschen den Einfluss der inneren Uhr bei einem Jet Lag eher als störende Eigenschaft empfinden, hat sie eine bedeutende biologische Funktion. So steigt beispielsweise die Körpertemperatur schon vor dem Aufwachen an, so dass der Körper auf eine erhöhte Aktivität am Tag vorbereitet wird. Auch bei dämmerungs- oder nachtaktiven Tieren und sogar bei Pflanzen gibt es derartige Anpassungen der Aktivitätsphasen. Der für Pflanzen wichtige Sonnenaufgang wird von

ihnen durch Aktivierung des Photosyntheseapparats noch vor Sonnenaufgang vorbereitet. Sie stellen ihre Blätter tagsüber horizontal, um Photosynthese auf einer möglichst großen Fläche betreiben zu können.

Die Steuerung dieser Prozesse durch die innere Uhr basiert auf einem molekularbiologischen Rückkopplungsmechanismus, bei dem Proteine eines zentralen Oszillators, die so genannten „clock“-Proteine, die Transkription ihrer eigenen Gene im 24 Stunden-Rhythmus beeinflussen. Auf diese Weise kommt es zu einer Oszillation der Proteinkonzentration in der Zelle [35]. Zur Erzeugung einer 24 Stunden-Periodizität tragen zusätzlich verschiedene Ebenen der posttranslationalen Regulation durch Phosphorylierung der Oszillatorproteine oder durch Regulation ihres Abbaus bei. Darüber hinaus spielt die regulierte Translokation der „clock“-Proteine in den Zellkern eine Rolle, wo sich in Abhängigkeit von der Tageszeit Phasen der Transkriptionsaktivierung und -reprimierung abwechseln [36]. In *Arabidopsis thaliana* sind die beiden MYB-Transkriptionsfaktoren CCA1 und LHY sowie das Kernprotein TOC1 gefunden worden. Diese sind Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus und bilden einen molekularen Oszillator mit einem 24 Stunden-Rhythmus [36]. Wie jedoch die Signaltransduktion der zeitlichen Information von diesem Oszillator innerhalb der Zelle erfolgt, wurde bislang nur unzureichend verstanden.

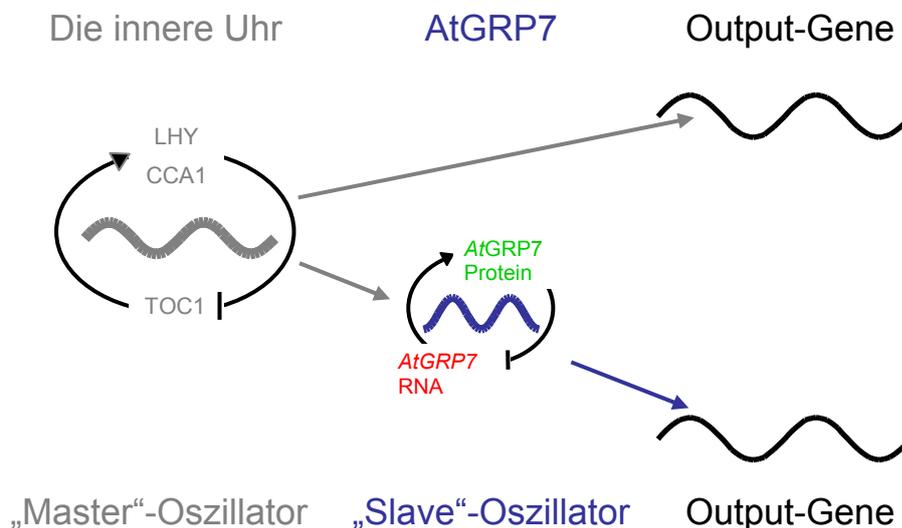


**Abbildung 1.4: Relative Menge der RNA und des Proteins AtGRP7 im zeitlichen Verlauf.**

Die Regulation von Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene wird hingegen durch Proteine ausgeübt, die spezifisch an bestimmte Bindestellen auf der mRNA binden und dadurch deren Prozessierung beeinflussen. Das von der inneren Uhr

kontrollierte Protein AtGRP7 (*Arabidopsis thaliana* Glycin-reiches RNA-Bindeprotein) ist ein putatives RNA-Bindeprotein, das zu einer neuen Klasse von kleinen Glycin-reichen Proteinen mit einem RNA-Erkennungsmotiv gehört [37-39]. Das AtGRP7-Transkript zeigt eine zirkadiane Oszillation mit einem Maximum am Abend, d.h. am Ende der Lichtphase [Abbildung 1.4]. Die Konzentration des Proteins oszilliert ebenfalls, wobei das Maximum erst mehrere Stunden später erreicht wird [38]. Der Anstieg der Proteinkonzentration führt zu einem Absinken der Transkriptionskonzentration. Sie ist also Teil eines Rückkopplungsmechanismus, der die zirkadiane Oszillation seiner RNA beeinflusst.

Ferner weiß man, dass er von dem CCA1/LHY/TOC1-Oszillator gesteuert wird, womit es sich um den ersten bekannten molekularen „Slave“-Oszillator der inneren Uhr handelt [Abbildung 1.5]: der CCA1/LHY/TOC1-Oszillator aktiviert das Atgrp7-Gen, wodurch die Konzentration der AtGRP7-RNA steigt [40]. Danach steigt auch die AtGRP7-Konzentration und bindet an seine eigene RNA. Diese wird alternativ gespleißt und ist dadurch instabil, was zum Absinken der RNA-Konzentration führt und in Folge dessen auch zum Absinken der Konzentration des Proteins AtGRP7. Man geht davon aus, dass AtGRP7 weitere Transkripte reguliert und an der Weiterleitung zirkadianer Informationen innerhalb der Zelle beteiligt sein könnte.



**Abbildung 1.5: Zusammenspiel des zirkadianen „Master“- und „Slave“-Oszillators.**

Der prinzipielle Bindungsmechanismus zwischen RNA und RNA-bindenden Proteinen wurde bis heute nur teilweise verstanden. Es gibt zwar Ergebnisse von exemplarisch untersuchten Modellproteinen, diese lassen sich jedoch nicht auf alle Proteine

verallgemeinern [41]. Insbesondere liegen bislang keine Erkenntnisse über die Struktur des Proteins AtGRP7 und der RNA vor. Darüber hinaus ist die Binderegion des Proteins AtGRP7 an seine RNA nur bis auf ungefähr 32 Nukleotide eingegrenzt [42], weshalb bislang keine genaueren Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Die Eingrenzung der Binderegion erfolgte durch RNA Bandshift-Assays und UV-Crosslinking, was die Arbeiten mühsam und zeitaufwendig machte.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Bindungsmechanismus zwischen AtGRP7 und seiner mRNA besser zu verstehen. Dazu soll zunächst ein geeignetes Verfahren etabliert werden, das ausreichend sensitiv ist und somit nur geringe Probemengen der Bindungspartner benötigt. Zusätzlich soll das Verfahren einfach anwendbar sein und in kurzer Zeit robuste Messwerte liefern, um eine Vielzahl von Proben auf eine Bindung untersuchen zu können. Darüber hinaus soll das Verfahren – neben der für eine Bindung charakteristischen Dissoziationskonstanten – weitere thermodynamische und kinetische Parameter über den Bindungsmechanismus liefern. Mit Hilfe dieser Parameter können dann unterschiedliche Konformationen bzw. Konformationsänderungen der RNA bei der Anbindung an das Protein AtGRP7 untersucht werden. Zunächst soll die bereits bekannte Bindungsregion auf eine kurze Bindungsstelle eingegrenzt werden. Diese soll für weitere Experimente verwendet werden, um die Konformation der RNA-Bindestelle genauer zu untersuchen. Dazu wird die Bindestelle als RNA-Hairpin synthetisiert und im Vergleich zu gänzlich unstrukturierter RNA auf durch die Bindung des Proteins induzierte Konformationsänderungen untersucht.

### **1.3.2 Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)**

Eine mögliche Technik zum Studium von Protein-RNA-Wechselwirkungen und Konformationsdynamiken ist die schnelle FCS, die Fluktuationen der Fluoreszenz von Farbstoffen auf einer Submikrosekunden-Zeitskala auflösen kann. Dadurch kann z.B. die Diffusion von Farbstoffen in wässriger Lösung in das Anregungsvolumen und wieder heraus beobachtet werden. Es ist aber bekannt, dass die Fluoreszenz von Oxazin- und Rhodamin-Farbstoffen selektiv durch Komplexbildung mit dem Nukleotid Guanosin oder der Aminosäure Tryptophan durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET) gelöscht wird [43-47]. Entgegen FRET (Förster Resonance Energy Transfer), der auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beruht und somit über einen Abstand von bis zu

10nm stattfinden kann, entsteht PET-Quenching durch van-der-Waals-Kontakt und hat daher eine extrem kurze Reichweite. Dies führt zu einem Zwei-Zustands-Modell, bei dem der Farbstoff entweder fluoreszenzgelöscht oder fluoreszierend ist, was direkt die Kontaktformation zwischen Farbstoff und Löschmolekül widerspiegelt. Durch dieses Einzelmolekül-empfindliche Verfahren und der Eigenschaft der Fluoreszenzlöschung durch PET ist man in der Lage, Konformationsänderungen von Makromolekülen zu beobachten. Dazu wird die Fluoreszenz des Farbstoffs als Reporter für den Abstand zum Guanosin eingesetzt. Kommt es auf Grund von Konformationsänderung zum Kontakt zwischen Farbstoff und Guanosin, so kann dies mit hoher Sensitivität und Zeitauflösung beobachtet werden [48, 49]. Die FCS hat in den letzten Jahren als Nachweisverfahren für die Konformationsdynamik von flexiblen Biopolymeren an Bedeutung gewonnen, weil die Konformationsraten direkt aus der Amplitude und der charakteristischen Zeit der Korrelationsfunktion bestimmt werden können [47, 49-55].

## 2 Physikalische Grundlagen

### 2.1 Absorption und Fluoreszenz von Molekülen

Moleküle haben im Allgemeinen verschiedene innere Freiheitsgrade, die den Energiezustand eines Moleküls bestimmen: Es gibt Translationsfreiheitsgrade, die die Bewegung des Moleküls im Raum widerspiegeln und von der Molekülstruktur abhängige Schwingungs- und Rotationsfreiheitsgrade. Die Möglichkeit der Änderung der energetischen Zustände gebundener Elektronen bezeichnet man als elektronische Freiheitsgrade. Die Größenordnung der damit verbundenen charakteristischen Energien lässt sich theoretisch abschätzen. Man erhält für elektronische Energien  $\sim 1\text{-}10\text{eV}$ , für Schwingungsenergien  $\sim 0.1\text{eV}$  und für Rotationsenergien  $\sim 0.001\text{eV}$ .

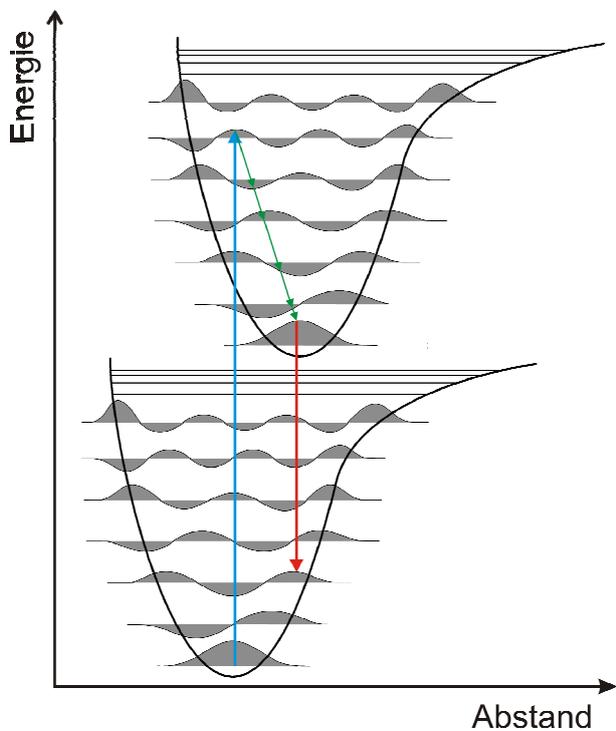
Der Übergang eines Moleküls von einem energetisch niedrigeren Zustand  $m$  zu einem energetisch höheren Zustand  $n$  kann unter Anderem durch die Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung erfolgen. Dabei absorbiert das Molekül ein Photon, wenn die Energiedifferenz zwischen den Energieniveaus des Moleküls die Bohr'sche Frequenzbedingung:

$$\Delta E = E_n - E_m = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad 2.1$$

erfüllt, wobei  $E_m$  und  $E_n$  die Energien des jeweiligen Zustandes,  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum,  $\nu$  die Frequenz,  $\lambda$  die Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit ist. Auf Grund der abgeschätzten Energien und [Gleichung 2.1] ergibt sich auch eine Abschätzung der für die Anregung benötigten Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung. So liegen Rotationsübergänge im fernen Infrarot bzw. Mikrowellen-Spektralbereich, Schwingungsübergänge im Infrarot-Bereich und elektronische Übergänge im ultravioletten und im sichtbaren Spektralbereich.

Die molekularen Energieniveaus sind von den elektronischen Zuständen geprägt, weil die Energieunterschiede bei diesen am größten sind. Diese Zustände spalten in Schwingungs- und Rotationsniveaus auf, deren Energien deutlich geringer sind. Bei

den folgenden Darstellungen genereller Art werden die Rotationsfreiheitsgrade aus Gründen der Übersichtlichkeit vernachlässigt. Die Betrachtungen beschränken sich daher auf elektronische Übergänge und Schwingungsübergänge.



**Abbildung 2.1: Franck-Condon-Diagramm der Schwingungsniveaus des elektronischen  $S_0$ -Grundzustandes und des  $S_1$ -Zustandes: Absorption (blau), Schwingungsrelaxation (grün) und Emission (rot). Elektronische Übergänge verlaufen nach dem Franck-Condon-Prinzip stets vertikal.**

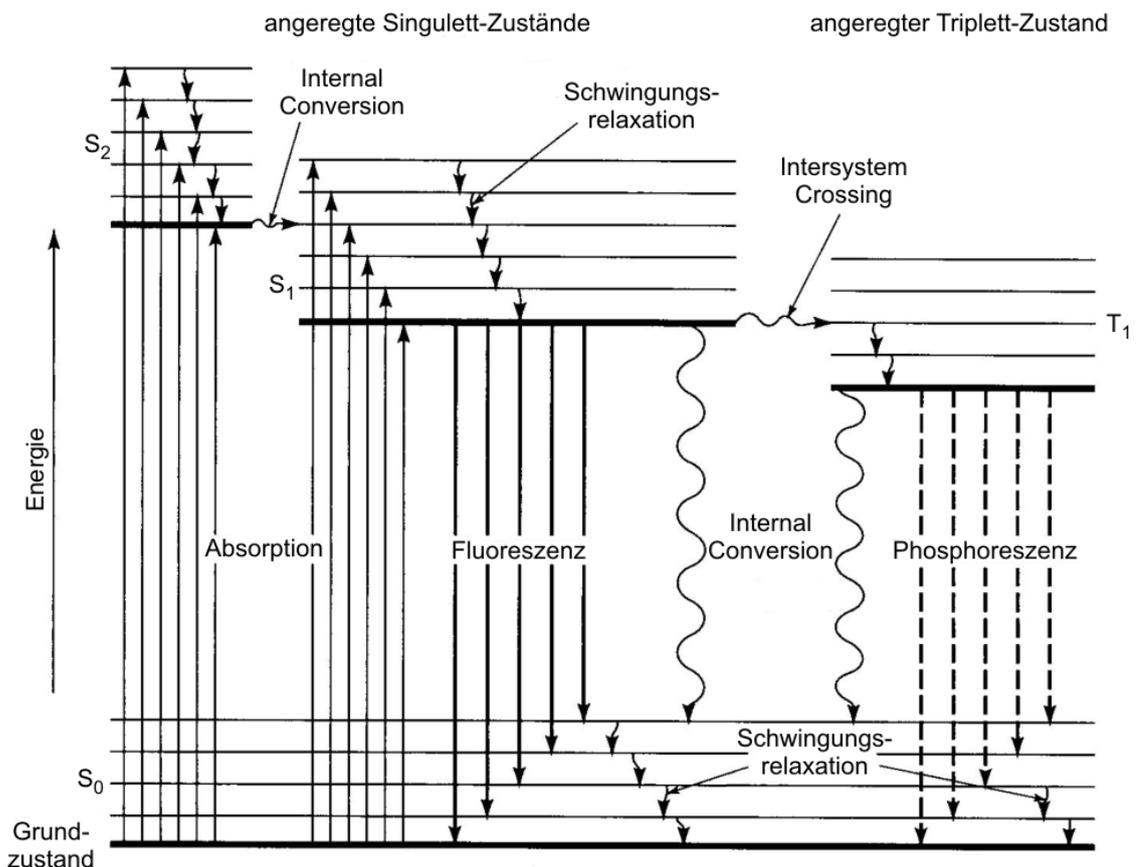
Der Prozess der Absorption eines Photons erfolgt quasi instantan mit einer charakteristischen Zeit von  $10^{-15}$ s. Der elektronische Übergang zwischen verschiedenen Energieniveaus findet dabei so schnell statt, dass sich der Kernabstand währenddessen nicht ändert. Dabei ermöglicht die vergleichsweise geringe Masse der Elektronen, die 3 Größenordnungen geringer als die des Kerns ist, die hohe Geschwindigkeit des elektronischen Übergangs gegenüber der Kernbewegung. Dies wird als Franck-Condon-Prinzip bezeichnet. Es erklärt, dass alle elektronischen Übergänge vertikal erfolgen [Abbildung 2.1].

Die Elektronenkonfiguration mit der niedrigstmöglichen Energie wird als Grundzustand  $S_0$  bezeichnet. Im thermischen Gleichgewicht befinden sich die meisten Moleküle im Grundzustand  $S_0$ , wobei die Besetzungswahrscheinlichkeit der Vibrationsniveaus durch eine Boltzmann-Verteilung gegeben ist. Absorption findet dann aus dem  $S_0$ -Grundzustand in ein beliebiges – meistens höheres – Schwingungsniveau des ersten angeregten  $S_1$ -Zustandes statt. Innerhalb von  $10^{-12}$  bis  $10^{-10}$ s relaxiert das Molekül strahlungslos durch Abgabe von Wärme auf Grund von Stößen mit benachbarten Atomen in den Schwingungsgrundzustand, was als Schwingungsrelaxation bezeichnet wird. Für die spontane Emission eines Photons beim Übergang von einem angeregten Zustand in ein höheres Schwingungsniveau des Grundzustandes, der auf der gleichen Zeitskala

wie die Absorption stattfindet, gilt ebenfalls das Franck-Condon-Prinzip. Dabei ist eine quantenmechanische Voraussetzung für die Berechnung von Übergangsintensitäten nach dem Franck-Condon-Prinzip, dass das Überlappungsintegral von Grundzustand und angeregtem Zustand, der so genannte Franck-Condon-Faktor, nicht verschwindet:

$$\left| \langle \Psi_a | \Psi_g \rangle \right|^2 \neq 0 \quad 2.2$$

wobei  $\Psi_a$  und  $\Psi_g$  die Wellenfunktionen des angeregten Zustandes bzw. des Grundzustandes sind. Wenn also die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs zwischen 2 Schwingungsniveaus für die Absorption maximal ist, so folgt daraus auch die größte Wahrscheinlichkeit für diesen Übergang bei der Emission.



**Abbildung 2.2:** Jablonski-Diagramm der möglichen strahlenden und strahlungslosen Übergänge in einem Molekül.

Die Gesamtheit aller möglichen Übergänge ist im Jablonski-Diagramm [Abbildung 2.2] dargestellt. Der Singulettgrundzustand wird mit  $S_0$  bezeichnet, die angeregten elektronischen Zustände mit  $S_1, S_2, S_3, \dots$ . Für die Triplettzustände verfährt man analog:

$T_1, T_2, T_3, \dots$ . Wie bereits erwähnt, spaltet jedes elektronische Niveau in eine Vielzahl von Schwingungs- und Rotationsniveaus auf, die auch das Molekül für eine gewisse Zeit einnehmen kann. Ein höher angeregtes Molekül, d.h.  $S_2, S_3, \dots$ , geht jedoch innerhalb von  $10^{-14}$  bis  $10^{-10}$ s von einem elektronisch angeregten Zustand auf ein höheres Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes über. Dieser Prozess wird als innere Konversion (Internal Conversion, IC) bezeichnet und ist strahlungslos. Anschließend erfolgt die bereits erwähnte Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand. Ein Vergleich mit der intrinsischen Lebensdauer des  $S_1$ -Zustandes von  $10^{-9}$  bis  $10^{-8}$ s zeigt, dass bis zum Übergang in den  $S_0$ -Grundzustand unter Aussenden eines Photons sämtliche Relaxationsprozesse durch IC abgeschlossen sind und somit der Übergang immer aus dem untersten Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes erfolgt. Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet. Anschließend kommt es auch hier zu einer Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand bis zum Erreichen des thermischen Gleichgewichts. Konkurrierend zu diesem Prozess gibt es jedoch auch strahlungslose Übergänge in den  $S_0$ -Grundzustand. Beim strahlungslosen Übergang vom  $S_1$ - in den  $S_0$ -Zustand wird die Energielücke durch IC überwunden. Das Molekül befindet sich dann in einem hoch angeregten Schwingungszustand und relaxiert anschließend ebenso strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand. IC vom  $S_1$ - in den  $S_0$ -Zustand ist bei einer charakteristischen Zeit zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-6}$ s vergleichsweise langsam. Er spielt aber bei vielen organischen Farbstoffen eine besondere Rolle und ist bei diesen für eine geringe Fluoreszenzquanteneffizienz verantwortlich. Ein ebenfalls konkurrierender Prozess führt über das Intersystem Crossing (ISC) in einen Triplettzustand. Dabei geht das Molekül durch Spinumkehr vom  $S_1$ - in den  $T_1$ -Zustand über. Dieser Übergang ist eigentlich Spin-verboden, die charakteristische Zeit beträgt jedoch  $10^{-10}$  bis  $10^{-8}$ s. Die Raten hängen aber stark vom Molekül, der chemischen Umgebung und der daraus resultierenden Übergangswahrscheinlichkeit ab. Der  $T_1$ -Zustand ist recht stabil. Ein möglicher Übergang vom  $T_1$ - in den  $S_0$ -Grundzustand kann unter Strahlungsabgabe in Form von Phosphoreszenz erfolgen. Weil dies erneut eine Spinumkehr mit sich führt, beträgt die Zeit etwa  $10^{-3}$  bis sogar  $10^2$ s. Auf der gleichen Zeitskala kann jedoch auch ein strahlungsloses IC erfolgen. Darüber hinaus ist es auch möglich, das Molekül in einen höheren Triplettzustand anzuregen. In diesem Fall gilt ebenfalls der zuvor beschriebene Zusammenhang.

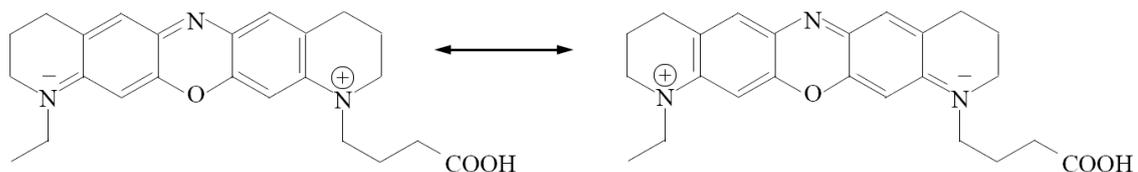
Die nach der Anregung eines Moleküls stattfindende Schwingungsrelaxation erfolgt unter Energieabgabe an die Umgebung. Der fluoreszierende Übergang in den

$S_0$ -Grundzustand ist demzufolge entsprechend [Gleichung 2.1] längerwellig. Beim Emissionsspektrum eines Moleküls ist daher zu beobachten, dass die Emission stets im längerwelligen Bereich als die Anregung stattfindet. Dieses Phänomen wird Stokes-Shift genannt. Er ist wichtig für hochempfindliche spektroskopische Anwendungen, weil das Fluoreszenzlicht durch geeignete Filter vom Anregungslicht (Rayleigh-Streuung) und der Raman-Streuung getrennt werden kann.

## 2.2 Fluoreszenz von Farbstoffen und Biomolekülen

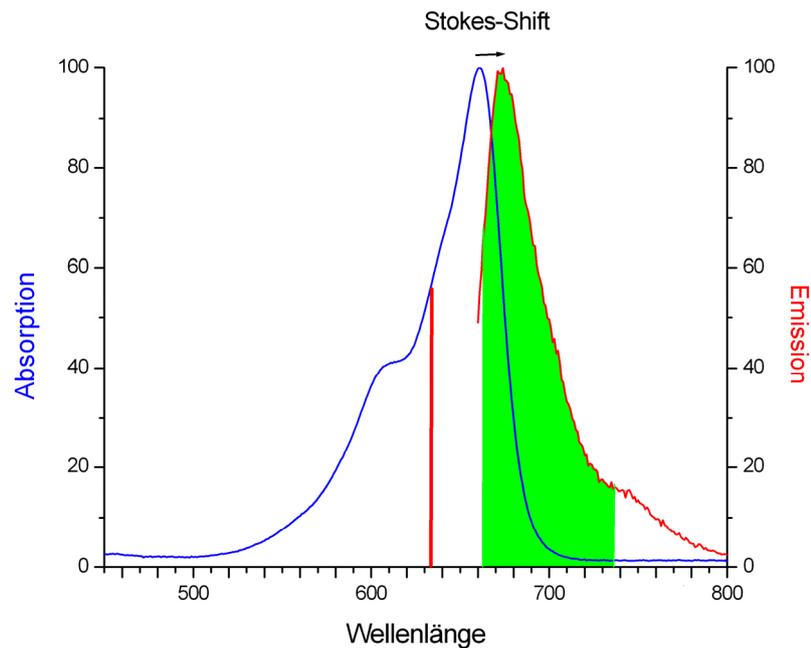
### 2.2.1 Der Farbstoff MR121

Farbstoffe, auch Fluorophore oder Chromophore genannt, besitzen die Eigenschaft, als Folge der Absorption von elektromagnetischer Strahlung Licht im sichtbaren Spektralbereich zu emittieren. Organische Farbstoffe zeichnen sich durch eine starke Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich aus. Diese Absorptionseigenschaften werden nur in Verbindungen mit konjugierten Systemen, d.h. in Systemen mit abwechselnden Einfach- und Doppelbindungen, beobachtet. Konjugierte Systeme können durch verschiedene, mesomere Strukturen beschrieben werden, wobei der reale Zustand des Moleküls – quantenmechanisch gesehen – eine Superposition dieser Strukturen ist.



**Abbildung 2.3: Mesomere Grenzstrukturen des Farbstoffs MR121**

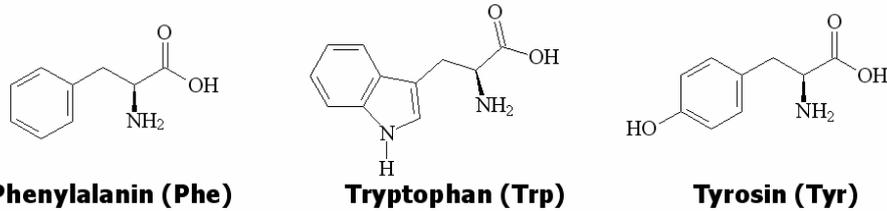
In dieser Arbeit wird das Oxazinderivat MR121 [Abbildung 2.3] als Farbstoff verwendet. Das Absorptions- und Emissionsspektrum ist in [Abbildung 2.4] dargestellt. Bei den Oxazinen handelt es sich um sehr photostabile Farbstoffe, weil sie sehr niedrige Besetzungswahrscheinlichkeiten der Triplettzustände aufweisen.



**Abbildung 2.4:** Absorptionsspektrum (blau) und Emissionsspektrum (rot) des verwendeten Farbstoffes MR121 in wässriger Lösung. Die bei Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie verwendete Anregungsquelle (Helium-Neon-Laser mit 632,8nm) wird durch den roten Strich und den durch den verwendeten Bandpassfilter definierten Detektionsbereich durch den grünen Bereich dargestellt.

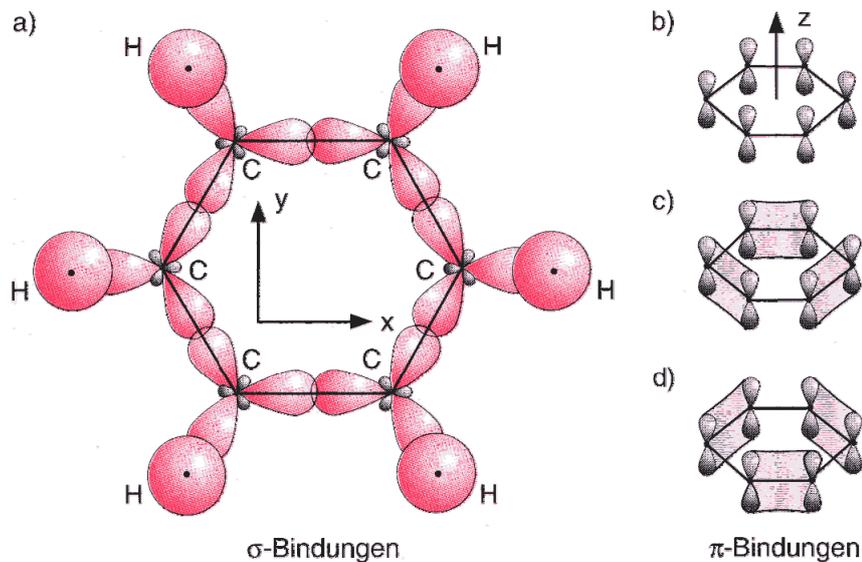
## 2.2.2 Fluoreszenz von Biomolekülen

Aromaten bzw. aromatische Verbindungen sind eine wichtige Verbindungskategorie in der organischen Chemie. Sie zeichnen sich durch eine besondere Bindungsstruktur aus, nämlich zyklische Moleküle mit konjugierten Doppelbindungen. Zu den so genannten aromatischen Aminosäuren gehören Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin [Abbildung 2.5]. Phenylalanin besitzt – wie der Name schon sagt – ein Phenylringssystem. Tryptophan besitzt einen Indolring an einer Methylengruppe und beim Tyrosin befindet sich an einem Phenylring eine Hydroxylgruppe.



**Abbildung 2.5: Strukturformel der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe, F), Tryptophan (Trp, W) und Tyrosin (Tyr, Y).**

Die in den Aminosäuren vorkommenden aromatischen Ringe lassen sich auf den einfachsten aromatischen Ring, den Benzolring, zurückführen. Benzol ist ein planares Molekül mit der Summenformel  $C_6H_6$ , in dem die 6  $sp^2$ -hybridisierten C-Atome ein regelmäßiges Sechseck bilden. An jedem C-Atom ist zusätzlich ein H-Atom gebunden. Der Winkel zwischen den C-C-Bindungen beträgt  $120^\circ$ , wobei die Bindungslänge mit 139,7pm durchgehend gleich ist und zwischen den Werten für eine Einfachbindung (147,6pm) und einer Doppelbindung (133,8pm)  $sp^2$ -hybridisierter C-Atome liegt. Dabei überlappt das s-Orbital mit 2 p-Orbitalen auf Grund einer starken Verformung, die durch die starke Wechselwirkung zwischen den an der Bindung beteiligten Atomen hervorgerufen wird. Ein Valenzelektron ist jeweils an den beiden C-C-Bindungen bzw. an der C-H-Bindung beteiligt. Dabei gehen die Atome  $\sigma$ -Bindungen ein. Die insgesamt 6 Elektronen der an der Hybridisierung unbeteiligten  $p_z$ -Orbitale stehen darüber hinaus für zusätzliche Bindungen zur Verfügung [Abbildung 2.6 b]. Die benachbarten  $p_z$ -Elektronen mit antiparallelem Spin können auf zwei nicht unterscheidbare Möglichkeiten eine  $\pi$ -Bindung eingehen [Abbildung 2.6 c,d]. Die Ladungsverteilung konzentriert sich bei einer  $\pi$ -Bindung ober- und unterhalb der Ebene der Verbindungsachse und den beteiligten Atomen. Im Gegensatz zur stärkeren  $\sigma$ -Bindung, bei der die Bindungselektronen zwischen den Atomen lokalisiert sind, zeichnen sich Elektronen einer  $\pi$ -Bindung durch eine höhere Beweglichkeit innerhalb des gesamten Moleküls aus, die sich über mehrere Atome erstrecken kann. Man spricht dabei von Delokalisierung, die sich bei zyklischen Molekülen über das gesamte Molekül erstrecken kann. Aufgrund der zuvor getroffenen Voraussetzungen lässt sich die notwendige Anregungsenergie bzw. -wellenlänge für einen Benzolring abschätzen.



**Abbildung 2.6:** Darstellung der  $sp^2$ -Hybridisierung der C-Atome in einem Benzolring mit  $\sigma$ -Bindungen (a) und möglichen  $\pi$ -Bindungen (b, c, d) [56]

Man bildet aus den Wellenfunktionen  $\phi_n$  der an der delokalisierten  $\pi$ -Bindung beteiligten 6 Elektronen der  $p_z$ -Orbitale eine Linearkombination  $\Psi$ :

$$\Psi = \sum_{n=1}^6 c_n \cdot \phi_n \quad 2.3$$

Die überlagerte Wellenfunktion  $\Psi$  ist jedoch nicht mehr auf ein einzelnes C-Atom lokalisiert, sondern über den ganzen Ring ausgedehnt. Um eine grobe Abschätzung zu erreichen, kann man die delokalisierten  $\pi$ -Elektronen wie Elektronen in einem Potenzialkasten mit der Größe  $L$  behandeln, wobei  $L$  der Umfang des Sechsecks des C-Gerüsts ist. Dann gilt aus Stetigkeitsgründen für die Wellenlänge  $\lambda$  Wellenfunktion:

$$L = n \cdot \lambda = \frac{n \cdot h}{p} \quad 2.4$$

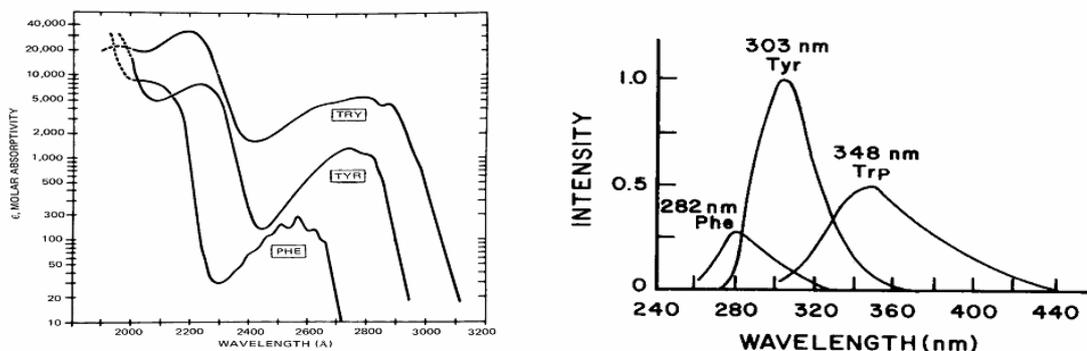
$h$  ist das Planck'sche Wirkungsquantum und  $p$  der Impuls des Elektrons. Die entsprechende Energie  $E_n$  ist dann durch:

$$E_n = \frac{p^2}{2m_e} = \frac{n^2 h^2}{2m_e L^2} \quad 2.5$$

gegeben, wobei  $m_e$  die Elektronenmasse und  $n$  die Quantenzahl ist. Der Abstand zwischen den 6 C-Atomen beträgt jeweils  $139,7\text{pm}$ , so dass man  $L = 6 \cdot 139,7\text{pm} = 838,2\text{pm}$  erhält. Die Anregung findet durch einen Übergang von  $n$  nach  $n+1$  statt. Die Energiedifferenz beträgt also:

$$\Delta E = E_{n+1} - E_n = \frac{(n+1)^2 h^2}{2m_e L^2} - \frac{n^2 h^2}{2m_e L^2} = \frac{(2n+1)h^2}{2m_e L^2} \quad 2.6$$

Setzt man nun die entsprechenden Zahlenwerte ein, so erhält man für  $n=1$  – also den Übergang von 1 nach 2 – eine Energiedifferenz in Höhe von  $\Delta E = 1,029 \cdot 10^{-18} \text{J}$ . Daraus ergibt sich eine Anregungswellenlänge von  $\lambda = 193\text{nm}$ . Benzolringe lassen sich also mit UV-Strahlung anregen. Bei den aromatischen Aminosäuren muss man diese theoretischen Ergebnisse aber relativieren, weil zum einen das Modell nur eine grobe Abschätzung liefert und zum anderen die Aminosäurereste keine Benzol-, sondern Phenyl- und Indolringe beinhalten. Experimentell gewonnene Absorptionsspektren [Abbildung 2.7] zeigen bereits bei  $\sim 310\text{nm}$  eine geringe Absorption für Tryptophan, Tyrosin bei  $\sim 295\text{nm}$  und Phenylalanin bei  $\sim 270\text{nm}$ . Tryptophan und Tyrosin zeigen bei  $\sim 280\text{nm}$  ein Maximum der Absorption, die für kürzere Wellenlängen zurückgeht. Ein weiteres Maximum liegt bei ungefähr  $220\text{nm}$ . Die Emission erstreckt sich vom Phenylalanin ab  $260\text{nm}$  bis zum Tryptophan mit  $440\text{nm}$ .



**Abbildung 2.7:** Absorptionsspektren der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (links) sowie die entsprechenden Emissionsspektren (rechts) [57].

Tryptophan und Tyrosin lassen sich optimal bei 280nm anregen, Phenylalanin hingegen gar nicht. Phenylalanin kann aber vernachlässigt werden, weil die Fluoreszenzemission gering ist. Auf Grund der Emission von Tyrosin und Tryptophan liegt der Bereich der maximalen Emission aromatischer Aminosäuren zwischen 300 und 400nm und lässt sich spektral gut von der Anregungswellenlänge bei 280nm trennen.

### **2.3 Fluoreszenzquanteneffizienz und -lebensdauer**

Neben der stationären Fluoreszenz sind die Fluoreszenzlebensdauer und die Quanteneffizienz wichtige optische Parameter in der Spektroskopie. Beide Parameter sind sehr stark abhängig von der chemischen Struktur und der Umgebung des Fluorophors. Die Fluoreszenzquanteneffizienz  $\Phi_f$  ist definiert als das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen. Der angeregte Zustand  $S_1$  kann auf zwei Arten depopuliert werden. Beim strahlenden Übergang in den Grundzustand findet Fluoreszenz mit der radiativen Rate  $k_r$  statt. Dabei gibt die Rate an, wie sich die Besetzungszahl eines Zustandes mit der Zeit ändert. Neben der Fluoreszenz tragen aber auch nicht strahlende Übergänge zur Depopulation eines Zustandes bei. Die so genannte nichtradiative Rate  $k_{nr}$  ergibt sich aus den nichtstrahlenden Übergängen, IC und ISC:

$$k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC} \quad 2.7$$

Hieraus folgt für die Quanteneffizienz:

$$\Phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{k_r}{k_r + k_{IC} + k_{ISC}} \quad 2.8$$

Quanteneffizienzen von nahezu 1 bedeuten, dass der  $S_1$ -Zustand fast ausschließlich durch einen strahlenden Übergang, d.h. durch Fluoreszenzphotonen, depopuliert wird. In diesem spielen strahlungslose Übergänge wie ISC und IC nur eine untergeordnete Rolle.

Befinden sich  $N$  Moleküle im angeregten Zustand, so ergibt sich durch die radiative Rate sowie die Raten für IC und ISC für die Depopulierung folgende Kinetik:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{IC} + k_{ISC}) \cdot N(t) \quad 2.9$$

wobei  $k_r$  die radiative Rate,  $k_{IC}$  die Rate für IC und  $k_{ISC}$  die Rate für ISC ist. Löst man nun diese Differentialgleichung unter der Annahme, dass sich zum Zeitpunkt  $t=0$   $N_0$  Moleküle im angeregten Zustand befinden, und ersetzt die Raten durch die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_f$ , so erhält man:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_f}} \quad 2.10$$

mit

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{IC} + k_{ISC}} \quad 2.11$$

Die Anzahl der angeregten Moleküle  $N(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  ist proportional zur beobachteten Fluoreszenzintensität  $I(t)$ , woraus sich folgende Gleichung ergibt:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_f}} \quad 2.12$$

wobei  $I_0$  die Emission zum Zeitpunkt  $t=0$  und  $\tau_f$  die Fluoreszenzlebensdauer ist. Aus der Gleichung ergibt sich, dass die Fluoreszenzlebensdauer die Zeit ist, in der die ursprüngliche Intensität auf  $1/e$  abgefallen ist. Übliche Fluoreszenzlebensdauern liegen im ns-Bereich und können durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bestimmt werden. Häufig lässt sich die Fluoreszenz jedoch nicht mit einer mono-exponentiellen Abklingkurve beschreiben. Gerade in komplexen biologischen Systemen tragen meist mehrere Fluorophore zur Gesamtemission bei, weil die Probe inhomogen ist oder in einem Molekül mehrere Fluoreszenzzentren vorhanden sind. Dann lässt sich der zeitliche Verlauf der Intensität mit einem multi-exponentiellen Ansatz beschreiben:

$$I(t) = I_0 \cdot \sum_n A_n \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{n,f}}} \quad 2.13$$

mit

$$\sum_n A_n = 1 \quad 2.14$$

wobei  $A_n$  die Anteile der  $n$ -ten Komponente an der Gesamtintensität ist. Aus [Gleichung 2.8] und [Gleichung 2.11] ergibt sich bei Konstanz der radiativen Rate eine Proportionalität der Fluoreszenzlebensdauer zur Quanteneffizienz:

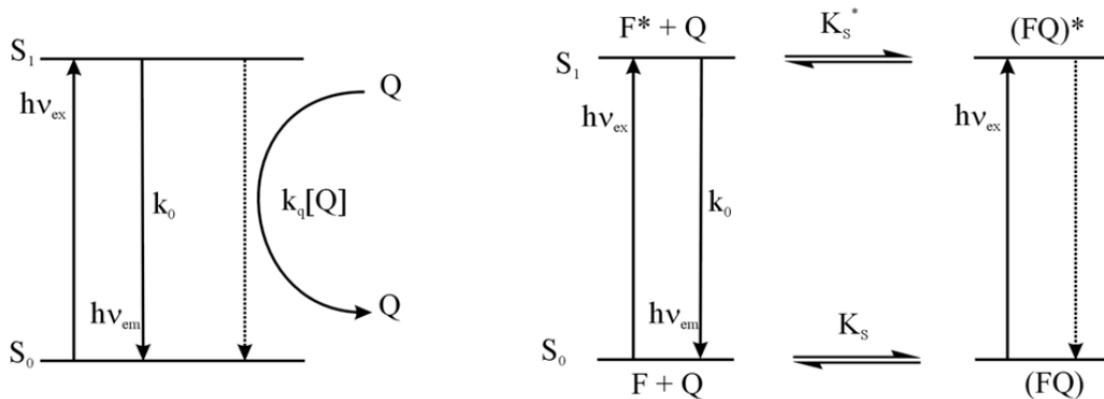
$$\Phi_f = k_r \cdot \tau_f \rightarrow \Phi_f \propto \tau_f \quad 2.15$$

Im Gegensatz zur intrinsischen Lebensdauer  $\tau_i$  eines Fluorophores, d.h. die idealisierte Lebensdauer in Abwesenheit aller nichtradiativen Übergänge, kann die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_f$  mit optischen Messverfahren beobachtet werden. Die beobachtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_f$  ist jedoch meist kleiner als die intrinsische Lebensdauer  $\tau_i$ , weil das System nicht frei von nichtradiativen Übergängen ist. Je größer diese Raten sind, umso kürzer ist die Fluoreszenzlebensdauer. Insbesondere führen große nichtradiative Raten, die beispielsweise durch die chemische Umgebung des Fluorophors kontrolliert werden können, zu verkürzten Lebensdauern.

## 2.4 Fluoreszenzlöschung

Moleküle – insbesondere Farbstoffe – lassen sich durch Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge in einen energetisch höheren Zustand anregen. Befindet sich der Farbstoff in einem elektronisch angeregten Zustand, so sind die elektronischen Eigenschaften gegenüber dem Grundzustand verändert. Daher sind nun Wechselwirkungen mit benachbarten Molekülen möglich, die zu einer Fluoreszenzlöschung führen können. Diese Prozesse variieren in der Effizienz und weisen eine starke Abstandsabhängigkeit der Wechselwirkungspartner auf. Daher lassen sie sich z.B. für die sensitive Beobachtung von Abständen im

Bereich unter 10nm verwenden, wodurch räumliche und konformationelle Änderungen inter- oder intramolekularer Abstände aufgeklärt werden können. Sie haben darüber hinaus aber auch Bedeutung für eine Vielzahl spektroskopischer Anwendungen [49].



**Abbildung 2.8: Dynamisches Fluoreszenzquenching (links):** Nach der Anregung ( $h\nu_{\text{ex}}$ ) geht der Quencher Q einen Komplex mit dem Fluorophor ein, der zu einer reduzierten gemessene Lebensdauer  $k_0$  führt. **Statisches Fluoreszenzquenching (rechts):** Das Fluorophor F und das Quenchemolekül Q gehen einen nicht oder nur schwach fluoreszierenden Komplex (FQ) im Grundzustand ein, wodurch sich die Konzentration der fluoreszierenden Moleküle verringert.

Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Modelle, das dynamische und statische Quenching: Beim dynamischen Quenching erfolgt die Fluoreszenzlöschung durch Stöße des angeregten Farbstoffes mit einem Löschmolekül. Dadurch geht der Farbstoff strahlungslos in den elektronischen Grundzustand über. Auf Grund der Ratengleichung für radiative und nichtradiative Übergänge führt dies zu einem Rückgang der stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenz, was eine geringere Fluoreszenzintensität und eine kürzere Fluoreszenzlebensdauer zur Folge hat. Trägt man in einem Stern-Volmer-Plot das Verhältnis der Fluoreszenzintensität und -lebensdauer mit Quencher und ohne Quencher gegen die Konzentration des Löschmoleküls auf, so erhält man eine Gerade:

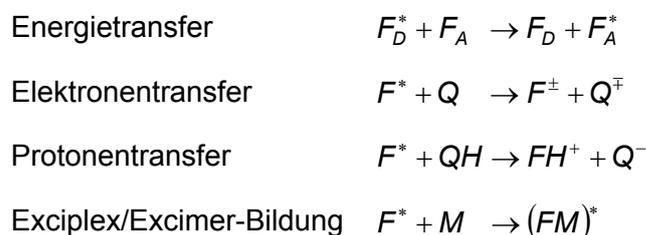
$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad 2.16$$

wobei  $I_0$  bzw.  $\tau_0$  die Fluoreszenzintensität bzw. -lebensdauer des Farbstoffes in Abwesenheit des Quenchers,  $I$  bzw.  $\tau$  in Anwesenheit des Quenchers in der Konzentration  $[Q]$  und  $k_q$  die dynamische Quenchingkonstante ist.

Beim zweiten Modell, dem statischen Quenching, geht man von einer Wechselwirkung zwischen dem im Grundzustand befindlichen Farbstoff und einem Quencher aus, die zu einem nicht, oder nur sehr schwach fluoreszierenden Komplex führt. Zusätzlich nimmt man auch eine Wechselwirkung mit der gleichen Gleichgewichtskonstante im angeregten Zustand des Farbstoffes an. Dadurch sinkt die Konzentration der fluoreszierenden Farbstoffmoleküle, was nur die Fluoreszenzintensität, aber nicht die Lebensdauer beeinflusst. Die Konzentrationsabhängigkeit des Quenchingvorgangs wird wie beim dynamischen Quenching ebenfalls durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q] \quad 2.17$$

wobei  $K_S$  die Komplexbildungskonstante von Quencher und Farbstoff ist [57]. Durch Messen der Fluoreszenzlebensdauer und der -intensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Quenchers sowie einer Stern-Volmer-Analyse können Informationen über die Kinetik und Thermodynamik der Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Quencher aufgelöst werden. Zwar lässt sich herausfinden, ob es sich um dynamisches oder statisches Quenching handelt, genauere Informationen über den eigentlichen Quenchingmechanismus sind aber nicht zugänglich. Um fluoreszenzspektroskopische Daten hinreichend deuten zu können, ist es unerlässlich, den Einfluss der chemischen Umgebung auf elektronisch angeregte Moleküle und ihre Fluoreszenzeigenschaften zu verstehen.

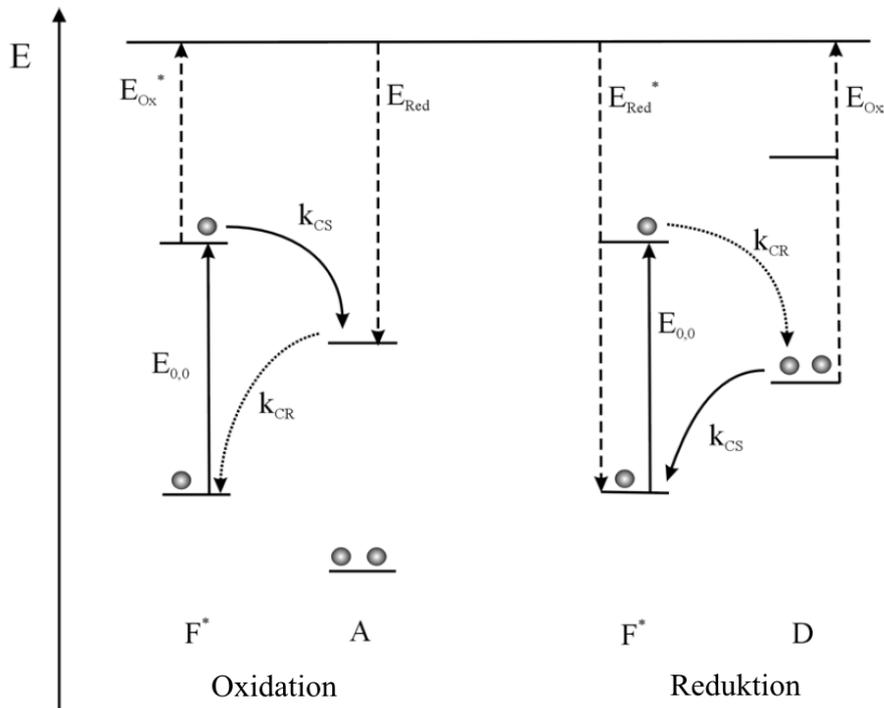


**Tabelle 1: Übersicht über fluoreszenzspektroskopisch relevante Fluoreszenzlöschmechanismen, die einen Farbstoff im angeregten Zustand  $F^*$  strahlungslos depopulieren.**

Der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist einer der bedeutendsten Fluoreszenzlöschmechanismen durch Energietransfer in der Spektroskopie. Er wurde

1948 von Förster vor dem Hintergrund der klassischen Elektrodynamik und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen als Energietransfer mit verhältnismäßig großer Reichweite ( $\sim 10\text{nm}$ ) theoretisch beschrieben [18]. Im Vergleich dazu findet ein Elektronentransfer nur bei kleinen Abständen statt, weil dabei Orbitalwechselwirkungen notwendig sind. Der für diese Arbeit wichtigste Prozess der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer (Photoinduced Electron Transfer, PET) soll im Folgenden genauer beschrieben werden. PET ist ein sehr wichtiger Reaktionstyp der Chemie, der auch wichtige Anwendungen in die Biochemie findet. So wird z.B. bei der Photosynthese in Pflanzen Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt.

Bei der Absorption eines Photons geht das Elektron des Moleküls vom HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) in das LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) über. Dadurch entstehen ein Elektronenloch im HOMO und ein energiereiches Elektron im LUMO. Das angeregte Molekül hat eine höhere Elektronenaffinität und somit ein geringeres Ionisierungspotential, d.h. es lässt sich einfacher oxidieren oder reduzieren. Dies erfolgt durch die Übergangsenergie  $E_{0,0}$  zwischen dem  $S_{0,v=0^-}$  und dem  $S_{1,v=0^-}$  Zustand, die durch die mittleren Energien der Absorptions- und Emissionsspektren abgeschätzt werden kann. Die Oxidation erfolgt durch einen Elektronenakzeptor (A), die Reduktion durch einen Elektronendonator (D). Die dadurch entstandenen Radikationen können durch Ladungsrekombination elektronisch relaxieren. Sämtliche Übergänge erfolgen dabei strahlungslos. Im Fall der Oxidation kann das Elektron des elektronisch angeregten Moleküls in ein energetisch niedrigeres Niveau des Akzeptormoleküls übergehen, wodurch es zur Ladungstrennung kommt. Im Fall der Reduktion erfolgt die Ladungstrennung durch einen Übergang des Elektrons vom energetisch höheren Donorniveau in das energetisch tiefere Niveau des Farbstoffs.



**Abbildung 2.9: Vereinfachtes Energieschema des photoinduzierten Elektronentransfers zwischen einem Farbstoff  $F^*$  und einem Elektronenakzeptor A bzw. einem Elektronendonator D.  $k_{CS}$  und  $k_{CR}$  stehen für die Ladungstrennungs- bzw. Ladungsrekombinationsrate.**

Ob ein Elektronentransfer energetisch günstig ist, hängt von der Änderung der freien Enthalpie der Ladungstrennung  $\Delta G_{CS}^0$  ab, die durch die Oxidations- und Reduktionspotenziale,  $E_{0,0}$  und der Coulombenergie des ladungstrennten Zustandes  $\Delta G_{Coulomb}^0$  abgeschätzt werden kann:

$$\Delta G_{CS}^0 = E_{Ox} - E_{Red} - E_{0,0} + \Delta G_{Coulomb}^0 \quad 2.18$$

mit

$$\Delta G_{Coulomb}^0 = \frac{-e^2}{\epsilon_s \cdot r} \quad 2.19$$

wobei  $\epsilon_s$  die relative Permittivität und  $r$  der Abstand der Wechselwirkungspartner ist.

Entsprechend gilt für die Ladungsrekombination:

$$\Delta G_{CR}^0 = -E_{Ox} + E_{Red} - \Delta G_{Coulomb}^0 \quad 2.20$$

Die Coulombenergie  $\Delta G_{Coulomb}^0$  wird bei Ladungstrennung aufgewendet und bei -rekombination abgegeben. Eine Betrachtung der Kinetik des photoinduzierten Elektronentransfers liefert im Wesentlichen zwei Kinetiken: Eine Kinetik ist das Fluoreszenzabklingverhalten, das durch die Fluoreszenzlebensdauer und die damit verbundenen Rate charakterisiert werden kann. Die zweite Kinetik beschreibt die Rate des Elektronentransfers  $k_{CS}$ . Die Marcus-Theorie liefert hier den Term:

$$k_{CS} = \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \frac{V_0^2}{h} e^{-\frac{(\lambda - \Delta G_{CS})^2}{4\lambda k_B T}} e^{-\beta r} \quad 2.21$$

Dabei ist  $\lambda$  die Reorganisationsenergie,  $V_0$  die maximale Kopplung (eine Art Überlappintegral der beiden Orbitale) und  $\beta$  ein Normierungsfaktor. Insbesondere findet man:

$$k_{CS} \propto e^{-\beta r} \quad 2.22$$

Dies bedeutet, dass die Elektronentransferrate abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist und exponentiell mit dem Abstand abfällt. Quantitative Prognosen sind jedoch mittels der heute bekannten Modelle nur in seltenen Fällen möglich. Erschwert wird die Beschreibung durch die enorme Anzahl schlecht messbarer Größen einerseits und die Komplexität des äußerlich einfach erscheinenden Mechanismus andererseits.

## **2.5 Theorie der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie**

Die Verfügbarkeit optischer Mikroskope mit Einzelmolekülempfindlichkeit hat den Weg für neue spektroskopische Verfahren geebnet, die teilweise unter dem Begriff der Fluoreszenzfluktuationsspektroskopie (FFS) zusammengefasst werden können. Mit diesem Verfahren kann die Fluoreszenz eines einzelnen oder zumindest einiger weniger Emitter analysiert werden. Makroskopische Systeme im thermischen Gleichgewicht unterliegen keinen messbaren Fluktuationen, weil dynamische Schwankungen durch Mittelwertbildung über eine Vielzahl von Molekülen unsichtbar bleiben. Sie werden lediglich als Rauschen wahrgenommen. Betrachtet man hingegen eine geringe Anzahl von Molekülen, so mitteln sich Fluktuationen in der Konzentration in einem Beobachtungsvolumen nicht mehr heraus. Sie stellen vielmehr eine Größe dar, die charakteristisch für den Gleichgewichtszustand ist. Thermische Fluktuationen der Fluoreszenz entstehen durch die statistische Bewegung, d.h. die Brownsche Molekularbewegung, bei der Diffusion durch ein Beobachtungsvolumen. Darüber hinaus sind auch Fluktuationen auf Grund der Änderung der Quanteneffizienz oder anderer spektraler Eigenschaften des Moleküls möglich. Dabei handelt es sich z.B. um Fluoreszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff, Triplettzustände oder FRET. Die FFS ermöglicht also, aus Intensitätsfluktuationen, die durch Diffusion durch das Beobachtungsvolumen, photophysikalische Prozesse oder chemische Reaktionen hervorgerufen werden, Informationen zu erlangen, die mittels Ensemblemessungen wegen einer Mittelung über eine Vielzahl von Molekülen nicht zugänglich sind. Eines der vielen fluktuationsspektroskopischen Verfahren ist die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS), die auf dem mathematischen Verfahren der Auto- bzw. Kreuzkorrelation beruht. Die theoretischen Grundlagen wurden in den frühen 70er Jahren entwickelt [58, 59]; erste Experimente von Magde, Elson und Webb folgten 1974 [52]. Die FCS wird im Hinblick auf das zeitliche Auflösungsvermögen und die Signalqualität lediglich durch die Qualität der Detektoren und der Auswertetechnik begrenzt. Auf Grund der geringen Sensitivität der Detektoren, einem nach heutigen Standards großen Beobachtungsvolumen und rauschender Laser konnten Fluktuationen zunächst nur schwer beobachtet werden. Durch den Einsatz von hochempfindlichen Einzelphotonendetektoren, wie Lawinenphotodioden (Avalanche Photo Diode, APD), konfokaler Mikroskopie und digitalen Hardwarekorrelatoren konnten die Detektionswahrscheinlichkeit sowie die räumliche und zeitliche Auflösung der Fluoreszenzfluktuationen stark erhöht und das

Beobachtungsvolumen verringert werden. Somit wurde FCS zu einer robusten, einfach zu bedienenden und zuverlässigen Technik [60], mit der man vielfältige Informationen mit einer einzigen Messung sammeln kann und dafür nur eine geringe Probenmenge einsetzen muss. Mittels FCS können photophysikalische Prozesse aufgeklärt werden; es können beispielsweise Molekulargewichte, Diffusionskoeffizienten und Rotationsdiffusionskoeffizienten bestimmt und chemische Reaktionen, uniforme und laminare Flüsse, sowie molekulare Aggregationen aufgeklärt werden. Diese können mittels FCS qualitativ und quantitativ untersucht werden, sofern sie reversibel sind und auf einer Zeitskala stattfinden, die geringer als die Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen ist. Darüber hinaus zählt FCS inzwischen auch zu einem der Standardverfahren in der Erforschung von Arzneimitteln und im Hochdurchsatz-Screening (High Throughput Screening, HTS) [61-63].

### 2.5.1 Autokorrelation

In einem Beobachtungsvolumenelement ergeben sich bei konstanter Anregung zeitliche Fluktuationen  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  mit  $\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt$  der Fluoreszenzintensität  $F(t)$ , die bei hinreichend geringer Molekülanzahl im Beobachtungsvolumen durch Konzentrationsfluktuationen  $\delta C(\vec{r}, t)$  verursacht werden. Einen Beweis für die Äquivalenz zwischen der Brownschen Molekularbewegung einzelner Moleküle und der Fluktuation der Konzentration in einem festgelegten Volumenelement führte Smoluchowski [64], der ergänzend zu Einsteins Arbeiten [65, 66] die makroskopischen und mikroskopischen Phänomene der Diffusion, der Brownschen Molekularbewegung und der Konzentrationsfluktuation mathematisch-konzeptionell zusammenfasste. Die zeitlichen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen lassen sich durch die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  beschreiben, die die zeitlich gemittelte Selbstähnlichkeit eines Signals zu den Zeitpunkten  $t$  und  $t+\tau$  widerspiegelt:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad 2.23$$

Auf Grund der Einschränkung auf ein Beobachtungsvolumenelement gibt  $G(\tau)$  die Wahrscheinlichkeit an, ein zum Zeitpunkt  $t$  detektiertes Molekül zum Zeitpunkt  $t+\tau$  ebenfalls detektieren zu können. Anders gesagt:  $G(\tau)$  gibt eine Verteilung von Aufenthaltsdauern einzelner Moleküle im Beobachtungsvolumen wieder.

Die in dieser Arbeit mittels FCS untersuchten biologischen Makromoleküle liegen in einer wässrigen Pufferlösung vor. Zur theoretischen Beschreibung kann eine ideale Lösung angenommen werden. Das bedeutet, dass die markierten Moleküle nicht miteinander in Wechselwirkung treten. Während einer Messung wird immer nur ein kleines Volumenelement der Gesamtlösung betrachtet. Dieses liegt in der Größenordnung von Femtoliter ( $10^{-15}\text{L}$ ), während das Volumen der gesamten Probe  $100\mu\text{l}$  beträgt. Somit kann das System im Sinne der statistischen Physik als ein großkanonisches Ensemble betrachtet werden [67]. Bei diesem sind Energie- und Teilchenaustausch über die Systemgrenzen möglich. Im thermischen Gleichgewicht diffundieren die Moleküle durch das kleine offene Beobachtungsvolumen und können dabei zwischen verschiedenen Zuständen mit unterschiedlichen Fluoreszenzquanteneffizienzen wechseln. Dies führt zu einer zeitlichen Fluktuation der Fluoreszenzintensität. Im Folgenden wird zunächst auf eine theoretische Beschreibung der Diffusion eingegangen. Anschließend folgen die Beschreibung der Zustände mit unterschiedlichen Quanteneffizienzen sowie die Berechnung der daraus folgenden Autokorrelationsfunktionen.

## 2.5.2 Diffusion

FCS-Messungen werden häufig zur Analyse der Diffusion von Molekülen herangezogen. Die Diffusion der Moleküle in der gesamten Probe und somit auch durch das Beobachtungsvolumen wird durch die Brownsche Molekularbewegung verursacht. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle, so dass ihre Fluktuation als Parameter für das Hinein- bzw. Herausdiffundieren der Moleküle in bzw. aus dem Beobachtungsvolumen beschrieben werden kann. Die Fluktuation der Fluoreszenzintensität geht also auf lokale Konzentrationsschwankungen der fluoreszierenden Moleküle zurück. Diese lokale Konzentrationsfluktuation  $\delta C(\vec{r}, t)$  lässt sich durch die Diffusionsgleichung:

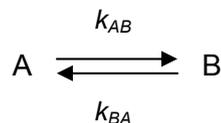
$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) \quad 2.24$$

beschreiben, wobei  $D$  der Diffusionskoeffizient ist. In Lösung ist  $D$  durch die Stokes-Einstein-Gleichung mit  $D = kT / 6\pi\eta R$  gegeben, wobei  $k$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $\eta$  die Viskosität des Mediums und  $R$  der hydrodynamische Radius des Moleküls ist. Als Näherung kann das Molekül geometrisch als Kugel angesehen werden und der hydrodynamische Radius mit  $R = \sqrt[3]{\frac{M_r / N_A}{4\pi\rho}}$  approximiert

werden, wobei  $M_r$  das Molekulargewicht,  $N_A$  die Avogadro-Konstante und  $\rho$  die durchschnittliche Dichte des Moleküls ist. Während das betrachtete Molekül durch das Anregungsvolumen diffundiert, können jedoch noch weitere Prozesse zu Fluktuationen der Fluoreszenzintensität führen: Vornehmlich sind dabei photophysikalische Prozesse, wie z.B. Bleaching oder Besetzung von Triplettzuständen, und chemische Prozesse, wie z.B. Löschung durch photoinduzierten Elektronentransfer, zu beobachten.

### 2.5.3 Konformationsdynamik

Die Base Guanosin löscht bei direktem Kontakt die Fluoreszenz des Farbstoffes MR121. Daher kann eine Konformationsdynamik in einem DNA- oder RNA-Oligonukleotid eine Fluoreszenzlöschung verursachen. Der Prozess der Löschung lässt sich durch einen Übergang zwischen zwei Zuständen, A und B, mit den Übergangsraten  $k_{AB}$  bzw.  $k_{BA}$  beschreiben:



Sei nun Zustand A der fluoreszierende und Zustand B der fluoreszenzgelöschte mit den Quanteneffizienzen  $\Phi_A = \Phi$  bzw.  $\Phi_B = 0$ . Unter der Annahme, dass sich die Diffusionszeit des Moleküls nicht ändert, also  $D_A = D_B = D$ , folgt als Ergänzung zu [Gleichung 2.24]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \delta C_A(\vec{r}, t) \\ \delta C_B(\vec{r}, t) \end{pmatrix} = D \nabla^2 \begin{pmatrix} \delta C_A(\vec{r}, t) \\ \delta C_B(\vec{r}, t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -k_{AB} & k_{BA} \\ k_{AB} & -k_{BA} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \delta C_A(\vec{r}, t) \\ \delta C_B(\vec{r}, t) \end{pmatrix} \quad 2.25$$

Der erste Term auf der rechten Seite der Gleichung beschreibt die Diffusion der Teilchen in entsprechenden Zuständen wie in [Gleichung 2.24] beschrieben. Der zweite Term ergänzt diese um die Kinetiken der beiden Zustände A und B. So wird Zustand A mit Rate  $k_{AB}$  depopuliert und durch einen Übergang von Zustand B in den Zustand A mit der Rate  $k_{BA}$  populiert, während das Analoge für Zustand B gilt. Negative Übergangsraten in der Matrix bedeuten daher eine Depopulation und positive Raten eine Population des entsprechenden Zustandes.

#### 2.5.4 Autokorrelation

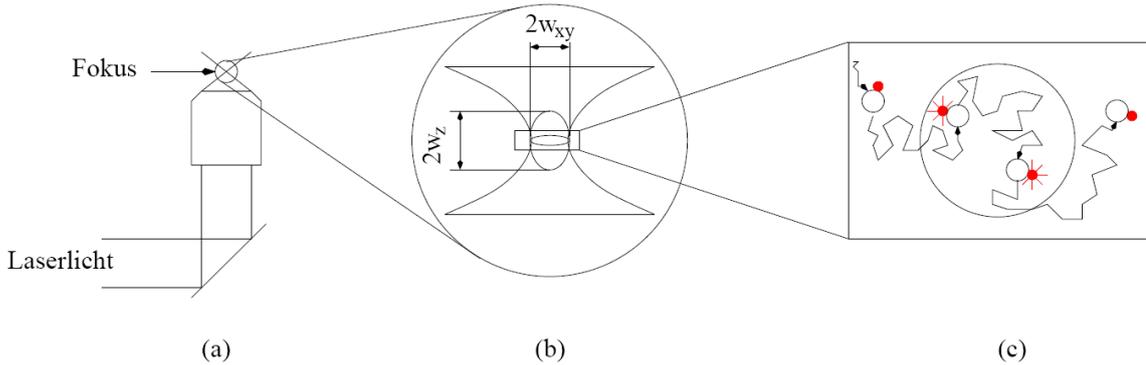
Befindet sich nur eine Art fluoreszierender Moleküle im Fokus, so ist eine Autokorrelation die einfachste und schnellste Methode zur Analyse molekularer Eigenschaften wie beispielsweise der Diffusion. Dabei wird die zeitliche Fluktuation der Fluoreszenzintensität untersucht. Geht man von einer konstanten Anregungsintensität aus, so kann die Fluktuation der Fluoreszenz  $\delta F(t)$  geschrieben werden als Abweichung der gemessenen Fluoreszenz  $F(t)$  vom Mittelwert  $\langle F(t) \rangle$ . Unter der Annahme, dass die Moleküle beim Diffundieren durch das Beobachtungsvolumen zwischen zwei Zuständen mit verschiedenen Quanteneffizienzen wechseln können, lassen sich die Fluktuationen schreiben als:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle = \kappa \langle I_0 \rangle \cdot \left( Q_A \int W(\vec{r}) \delta C_A(\vec{r}, t) d^3\vec{r} + Q_B \int W(\vec{r}) \delta C_B(\vec{r}, t) d^3\vec{r} \right) \quad 2.26$$

Dabei ist  $\kappa$  die Detektionseffizienz des Systems,  $\langle I_0 \rangle$  die Anregungsintensität,  $Q_A$  bzw.  $Q_B$  das Produkt aus dem Anregungsquerschnitt und der Fluoreszenzquanteneffizienz des fluoreszierenden Moleküls im Zustand A bzw. B,  $W(\vec{r})$  beschreibt das Beobachtungsvolumen und  $\delta C_A(\vec{r}, t)$  bzw.  $\delta C_B(\vec{r}, t)$  ist die räumliche und zeitliche Teilchenkonzentration der Moleküle im Zustand A bzw. B. Das Beobachtungsvolumen wird durch das Anregungs- und Detektionsvolumen definiert [Abbildung 2.10]. Bei einem konfokalen FCS-Setup mit genügend kleinen Lochblenden kann ein Gaußsches Anregungsprofil angenommen werden [53]:

$$W(\vec{r}) = e^{-\left(\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_{xy}^2} + \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right)} \quad 2.27$$

wobei  $\omega_{xy}$  bzw.  $\omega_z$  die Radien in lateraler und axialer Richtung sind, bei denen die Intensität auf  $1/e^2$  abgefallen ist.



**Abbildung 2.10:** Laserlicht wird durch ein Objektiv in die Probe fokussiert (a) und erzeugt dabei ein Gauß'sches Anregungsvolumen (b), in dem die Fluoreszenz von diffundierenden Molekülen detektiert werden kann (c).

Setzt man [Gleichung 2.26] in [Gleichung 2.23] ein, so erhält man:

$$G(\tau) = \frac{\sum_{i=A,B} \sum_{j=A,B} Q_i Q_j \iint W(\vec{r}) W(\vec{r}') f_{ij}(\vec{r}, \vec{r}', \tau) d^3\vec{r} d^3\vec{r}'}{\left( \sum_{i=A,B} Q_i \langle C_i \rangle \int W(\vec{r}) d^3\vec{r} \right)^2} \quad 2.28$$

mit

$$f_{ij}(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C_i(\vec{r}, 0) \delta C_j(\vec{r}', \tau) \rangle \quad 2.29$$

der Korrelationsfunktion der Konzentrationsfluktuation. Setzt man nun die Lösung von [Gleichung 2.25] und das Gauß'sche Anregungsprofil [Gleichung 2.27] ein und führt das doppelte Raumintegral aus, erhält man als Lösung:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \underbrace{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\omega^2 \tau_D}\right)^{-1/2}}_{\text{Diffusionsterm}} \cdot \underbrace{\left(1 + K \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_K}}\right)}_{\text{Konformationsdynamik}} \quad 2.30$$

Dabei ist  $\langle N \rangle = (\langle \delta C_A \rangle + \langle \delta C_B \rangle) \cdot V$  die durchschnittliche Gesamtanzahl der Moleküle,

$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D}$  die charakteristische Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen  $V$ .

$\omega = \frac{\omega_z}{\omega_{xy}}$  ist das Verhältnis der axialen zur lateralen Ausdehnung von  $V$ . Die

Konformationsdynamik wird durch  $K$  und  $\tau_K$  beschrieben. Dabei ist  $K = k_{AB} / k_{BA}$  die Gleichgewichtskonstante und  $\tau_K = 1/(k_{AB} + k_{BA})$  die Relaxationszeit der Konformationsdynamik. In [Gleichung 2.30] ist der Term für die Konformationsdynamik vom Diffusionsterm separiert. Dies ist nur dann zulässig, wenn  $\tau_K \ll \tau_D$ , d.h. die beiden Kinetiken auf unterschiedlichen Zeitskalen stattfinden. Die Diffusionszeit eines Moleküls ist ein wichtiger Parameter der Autokorrelationsfunktion.  $\tau_D$  ist antiproportional zur Diffusionskonstante und somit proportional zum hydrodynamischen Radius. Da der Radius näherungsweise proportional zur dritten Wurzel des Molekulargewichts ist, spiegelt sich eine Massenzunahme in einer verlängerten Diffusionszeit  $\tau_D$  eines Moleküls wider.

Mit Hilfe der Autokorrelationsanalyse lassen sich unterschiedliche Kinetiken, wie Diffusionszeit, Triplettzustände oder Photozerstörung untersuchen. Die charakteristischen Zeiten der untersuchten Kinetiken dürfen jedoch nicht unter  $1\mu\text{s}$  liegen, weil auf kürzeren Zeitskalen die Autokorrelation durch die Totzeit des Detektors und durch so genanntes Afterpulsing beschränkt ist. Beide Effekte weisen charakteristische Zeiten auf, werden dadurch bei der Autokorrelationsanalyse korreliert und führen zu einer Überlagerung mit dem tatsächlichen Signal. Eine Alternative stellt die Kreuzkorrelation dar, bei der das Fluoreszenzsignal durch einen halbdurchlässigen Spiegel auf zwei Detektoren aufgeteilt wird. Somit wird nicht das Signal eines einzelnen Detektors, sondern es werden die Ausgangssignale der beiden Detektoren miteinander korreliert. Dadurch werden die Totzeit des Detektors und der Einfluss durch Afterpulsing auf die Messdaten reduziert. Somit lassen sich Kinetiken bis in den Submikrosekundenbereich untersuchen. Um jedoch Kinetiken auf dieser kurzen Zeitskala untersuchen zu können, nutzt man das Antibunching-Prinzip: Ein Molekül kann nicht zwei Photonen gleichzeitig emittieren. Der Emission eines Photons geht

immer eine Absorption voraus. Das Molekül verweilt eine Zeit lang im angeregten Zustand und kehrt anschließend in den Grundzustand zurück. Die Verweildauern im angeregten Zustand sind exponentiell verteilt und ihr Durchschnitt entspricht der Fluoreszenzlebensdauer – etwa  $10^{-9}$ s. Somit sind zwei aufeinander folgende Photonen durch eine charakteristische minimale Zeitdauer voneinander getrennt. Befinden sich aber mehrere fluoreszierende Moleküle im Anregungsvolumen, so können mehrere Photonen gleichzeitig emittiert werden, die von verschiedenen Molekülen stammen. Da verschiedene Moleküle unabhängig voneinander Licht absorbieren und emittieren, sind die Ankunftszeiten der Photonen verschiedener Moleküle unkorreliert. Die Korrelationsfunktion gibt also die Wahrscheinlichkeit an, ein Photon zu einer Zeit  $t+\tau$  zu detektieren, falls zu der Zeit  $t$  ein Photon detektiert wurde.

Die Korrelationsfunktion wird für den Fall der Kreuzkorrelation umgeschrieben zu:

$$G(\tau) = \frac{\langle I_1(t)I_2(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad 2.31$$

wobei  $I_1(t)$  und  $I_2(t)$  die Ausgangssignale der ersten bzw. zweiten APD sind und  $\langle I(t) \rangle^2 = \langle I_1(t) \rangle \langle I_2(t) \rangle$  ist. Dabei wird angenommen, dass das Fluoreszenzlicht auf beide APD gleichmäßig aufgeteilt wird. Alle weiteren Resultate gelten analog zu den zuvor gemachten Annahmen.

### 2.5.5 Grenzen der FCS

Mittels der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie können geringe Konzentrationen untersucht werden. Durch das äußerst kleine beugungslimitierte Beobachtungsvolumen, das ungefähr 1 Femtoliter beträgt, werden Störsignale wie beispielsweise elastische Streuung und Autofluoreszenz des Hintergrunds hervorragend unterdrückt. Durch den Einsatz leistungsstabiler Laser, photostabiler Farbstoffe, hochwertiger optischer Komponenten, sowie rauscharmer und hochsensitiver Detektionselektronik kann ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 1:1000 erreicht werden. Trotz Optimierung dieser beeinflussbaren Komponenten unterliegt die FCS natürlicher Grenzen, die die Signalqualität beschränken. Insbesondere sind hier die Hintergrundphotonen zu nennen, die die Signalgüte der

Autokorrelation beeinträchtigen. Die Untersuchung von Fluktuationen ist nur möglich, wenn die Anzahl der Moleküle, die sich im zeitlichen Mittel im Beobachtungsvolumen befinden, eine obere Grenze nicht überschreitet. Das typische Fluoreszenzsignal eines durch das Beobachtungsvolumen diffundierenden Moleküls ist ein Photonenschauer von etwa 1000 Photonen. Die Diffusionszeit durch den Anregungsfokus ist für alle Moleküle im Mittel gleich, die Anzahl der emittierten Photonen pro Molekül ändert sich somit nicht. Bei einer konstanten durchschnittlichen Anzahl der Moleküle im Fokus, verursacht jedes hinein- oder herausdiffundierende Molekül relative Fluktuationen der Molekülanzahl  $\delta N / \langle N \rangle$ , die proportional zu  $1/\sqrt{\langle N \rangle}$  ist [60]. Wird die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle zu groß, nehmen die relativen Fluktuationen ab. Die durchschnittliche Anzahl der Moleküle im Fokus sollte daher zwischen 0,1 und 1000 liegen [68], um einerseits eine gute Photonenzählstatistik für die Messungen bei kurzen Messzeiten und andererseits Fluktuationen zu erhalten, die signifikant analysiert werden können. Der Einfluss von Streulicht ist ebenfalls möglichst gering zu halten. Dabei spielen die Rayleigh-Streuung des Anregungslasers sowie die Raman-Streuung, die durch das umgebende Lösungsmittel verursacht werden kann, eine wichtige Rolle. Neben gestreutem Anregungslicht kann auch Autofluoreszenz des Lösungsmittels oder von Verunreinigungen zu korreliertem oder unkorreliertem Hintergrundsignal beitragen. Durch Verwendung entsprechender Emissionsfilter lassen sich die negativen Einflüsse durch Streuung und Autofluoreszenz jedoch in den meisten Fällen minimieren. Unter Umständen muss die zu untersuchende Probe zusätzlich aufgereinigt werden. Darüber hinaus begrenzt – insbesondere bei sehr niedrigen Emissionsintensitäten – die Poisson-Statistik der Emission von Fluoreszenzphotonen, das so genannte „shot noise“, die Signalqualität der Fluoreszenzkorrelation.

Das Signal-zu-Rauschverhältnis  $S/N$  ist definiert als das Verhältnis des Mittelwertes zu der Standardabweichung der Messwerte. Bei Messungen der Fluoreszenzkorrelation hängt  $S/N$  insbesondere von der Gesamtmesszeit  $T$ , über die korreliert wird, und den detektierten Photonen pro Molekül und Zeiteinheit ab. Verrauschte Daten lassen sich durch eine längere Messzeit und eine möglichst große Anzahl der detektierten Photonen, die von der Anregungsleistung, dem Anregungsquerschnitt, der Fluoreszenzquanteneffizienz des Farbstoffs und der Detektionseffizienz des Setups abhängt, verbessern [69]. Da jedoch die Korrelation mittels Hardwarekorrelatoren mit unterschiedlich großen Zeitintervallen  $\tau$  arbeitet, wirkt sich eine größere Anzahl von detektierten Fluoreszenzphotonen vor allem auf sehr kleine Zeitintervalle aus. Für längere Zeitintervalle ist dieser Parameter weniger kritisch. Durch die Proportionalität

zwischen  $S/N$  und der Wurzel der Messzeit [70] sowie die Beschränkung durch „shot noise“ bei extrem niedrigen Konzentrationen [71], bei der sich weniger als 1 Molekül im Beobachtungsvolumen befindet, ergibt sich für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis:

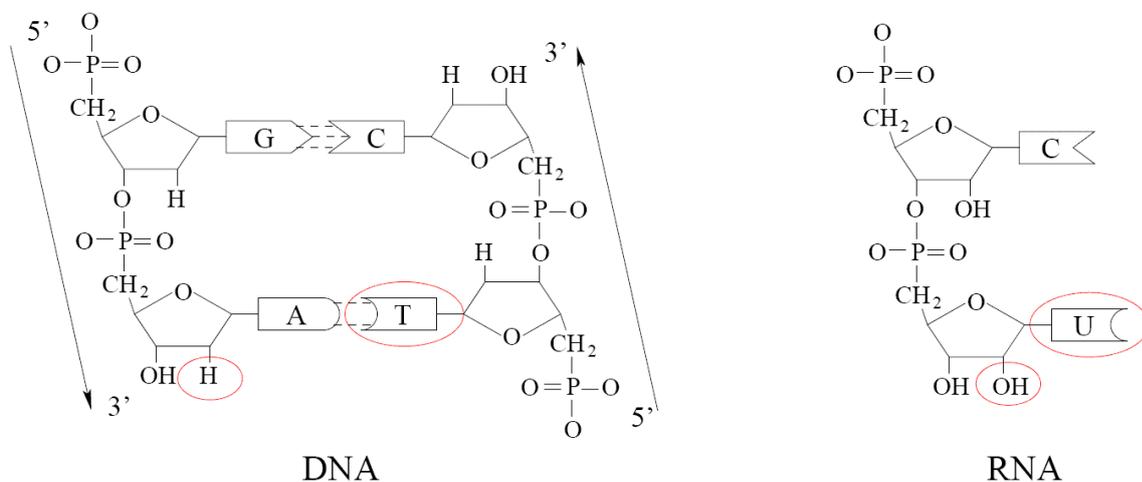
$$S/N \propto \kappa \cdot \langle I_0 \rangle \cdot Q \cdot \sqrt{T} \cdot \sqrt{N} \quad 2.32$$

wobei  $\kappa$  die Detektionseffizienz des Systems,  $\langle I_0 \rangle$  die Anregungsintensität,  $Q$  das Produkt aus dem Anregungsquerschnitt und der Fluoreszenzquanteneffizienz des fluoreszierenden Moleküls, sowie  $T$  die Gesamtmesszeit und  $N$  die Anzahl der im Beobachtungsvolumen vorhandenen Moleküle ist.

### 3 Biologische Grundlagen

#### 3.1 Aufbau von DNA und RNA

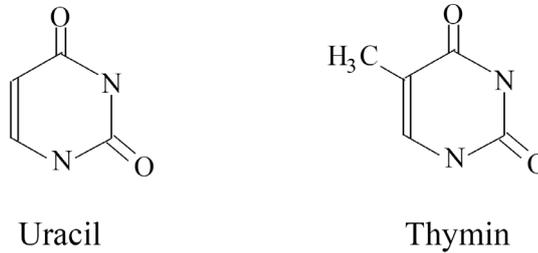
DNA besteht in der Regel aus zwei antiparallelen komplementären Polynukleotidketten. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker, einem Phosphatrest und einer Base. Im Fall der DNA ist der Zucker eine Desoxyribose, die Base ist Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin(T). Durch die Reihenfolge der Nukleotide in der DNA einer Zelle werden Informationen des Genoms kodiert. Zwei Polynukleotidketten werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen zusammengehalten. Dabei paart selektiv Adenin mit Thymin (zwei Wasserstoffbrücken) und Guanin mit Cytosin (drei Wasserstoffbrücken) [Abbildung 3.1]. Durch diese Komplementarität werden auch spezifische Bindungen und Erkennungsmechanismen ermöglicht.



**Abbildung 3.1: Doppelsträngige DNA unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen G-C und A-T (links) und einzelsträngige RNA (rechts). Unterschiede zwischen DNA und RNA sind rot markiert.**

RNA besteht in der Regel aus einer einzelsträngigen Polynukleotidkette. Der Zucker der RNA-Nukleotide ist eine Ribose. Darüber hinaus ist die Base Uracil durch Thymin ersetzt, das gegenüber dem Uracil um eine Methylgruppe  $\text{CH}_3$  erweitert ist [Abbildung 3.2]. Daher wird Thymin auch Methyluracil genannt. Die Methylgruppe trägt nicht zur

basenspezifischen Erkennung bei, daher paart Uracil im Fall von Strukturbildungen mit Adenin und bildet ebenfalls zwei Wasserstoffbrücken aus.



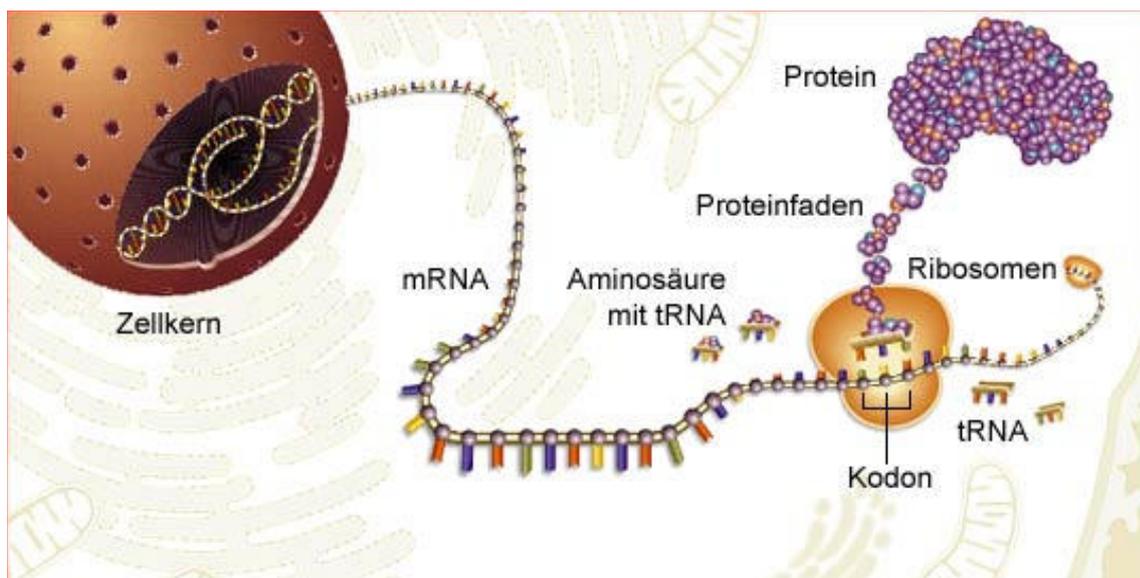
**Abbildung 3.2: Strukturformel von Uracil und Thymin. Die als DNA vorkommende Base Thymin wird in der RNA durch ein Uracil ersetzt.**

Obwohl sich DNA und RNA chemisch sehr stark ähneln, gibt es wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Polymeren. Da RNA vielfach einzelsträngig vorliegt, hat sie mehr Möglichkeiten, dreidimensionale Strukturen auszubilden. Außerdem erlaubt ihr die Einzelsträngigkeit chemische Reaktionen, die einer DNA nicht möglich sind. Der Zucker der RNA, die Ribose, ist mit der Desoxyribose der DNA bis auf eine Hydroxylgruppe an der 2'-Position im Pentose-Ring identisch. Auf Grund dieses Unterschiedes ist RNA weniger stabil als DNA, denn eine Hydrolyse durch Basen ist möglich. Die OH-Gruppe des Zuckers wird durch die negativ geladene OH-Gruppe der Base ihres H-Atoms beraubt. Der dann zurückgebliebene Sauerstoff geht eine Ringbindung mit dem Phosphor ein, wodurch die Bindung zum nächsten Nukleotid gelöst wird. Dadurch wird die RNA wieder in ihre Nukleotide zerlegt. Ribonucleasen – kurz RNasen genannt – katalysieren einen solchen Prozess. Auf Grund ihres hohen Vorkommens auf der menschlichen Haut ist beim Umgang mit RNA-Nukleotiden besondere Sorgfalt im Hinblick auf Verunreinigungen geboten.

### **3.2 Proteinbiosynthese in Zellen**

Jede Zelle stellt ein strukturell abgrenzbares eigenständiges und selbsterhaltendes System dar. Es bildet die Grundlage dafür, Nährstoffe aufzunehmen, diese in Energie umzuwandeln, verschiedene Funktionen zu übernehmen und vor allem sich selbst zu reproduzieren. Während Mikroorganismen wie Bakterien aus einzelnen Zellen bestehen, verbinden sich in Pflanzen und Tieren viele Millionen Zellen zu übergeordneten Strukturen wie Geweben und Organen. Im Laufe der Evolution haben

sich verschiedene Arten von Zellen gebildet, die grundlegend in Prokaryonten und Eukaryonten untergliedert werden können. Prokaryonten sind einfach gebaut, besitzen keinen Zellkern und treten immer als Einzeller auf, d.h. jede Zelle ist für sich selbst lebens- und funktionsfähig. Ihr Genom, d.h. das in der Basensequenz der DNA verschlüsselte Erbgut, befindet sich im Cytoplasma der Zelle. Im Gegensatz dazu können Eukaryonten sowohl als Einzeller als auch als Mehrzeller auftreten. Ihr Genom ist von einer Membran umschlossen, die den Zellkern bildet. Pflanzliche Zellen enthalten, im Gegensatz zu tierischen Zellen, zusätzliche funktionale Einheiten, wie eine Zellwand, eine Vakuole und Chloroplasten. Bei Mehrzellern bilden Zellen so genannte Zweckverbände. Sie teilen sich verschiedene Funktionen auf und sind oft einzeln nicht mehr lebensfähig. Durch die Spezialisierung in Vielzellern sind die oben beschriebenen Fähigkeiten eingeschränkt. In der vorliegenden Arbeit werden pflanzliche Zellen untersucht, die im Folgenden genauer betrachtet werden.



**Abbildung 3.3: Ablauf der Proteinbiosynthese: Im Zellkern wird die DNA in eine mRNA abgeschrieben (Transkription), aus dem Zellkern ausgeschleust und an den Ribosomen in ein Protein übersetzt (Translation) [72].**

Der so genannte Bauplan einer Zelle und die Funktion einzelner Einheiten sind in ihrem Genom als DNA-Basensequenz kodiert, die sich in der Regel im Zellkern befindet. Die Proteinbiosynthese bezeichnet die Herstellung eines Proteins oder Polypeptids in Lebewesen an den Ribosomen. Sowohl Proteine als auch Polypeptide sind Ketten aus Aminosäuren, die sich in ihrer Länge und ihrer Abfolge unterscheiden. Die Synthese gliedert sich in zwei Schritte: Zunächst erfolgt das Umschreiben der Informationen von der DNA in eine RNA (Transkription). Durch Bindung einer RNA-

Polymerase an einen Promotor wird der DNA-Doppelstrang entspiralisiert. Die Information der DNA wird durch die RNA-Polymerase in eine mRNA (messenger-RNA) umgeschrieben, indem ein zum codogenen DNA-Strang komplementärer prä-mRNA-Strang synthetisiert wird. Diese prä-mRNA enthält für die Proteinsynthese relevante, so genannte kodierende Abschnitte (Exons) und nicht kodierende Abschnitte (Introns). In einer Prozessierung der prä-mRNA werden die Introns durch den Vorgang des Spleißens entfernt und aus der prä-mRNA wird eine reife mRNA. Diese wird durch regulierten, aktiven Transport durch die Kernporen aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert und heftet sich am rauen endoplasmatischen Retikulum an die Ribosome. Neben den Exons enthält die mRNA noch untranslatierte (nicht kodierende) Bereiche (UTR, untranslated region), die der Regulation der Translationsinitiation und der Aktivität der RNAsen, die die RNA wieder abbauen, dienen. In der mRNA befindet sich jeweils ein untranslatierter Bereich am 5' Ende der Sequenz (5' UTR) sowie am 3' Ende (3' UTR).



**Abbildung 3.4: Aufbau einer mRNA bestehend aus 5' UTR, Exon, Intron und 3' UTR.**

Die Information der mRNA wird an den Ribosomen in eine Folge von Aminosäuren übersetzt, indem sie schrittweise abgelesen wird (Translation). Dies geschieht durch die tRNA, da für jede Aminosäure ein spezifisches tRNA-Molekül existiert, das über eine spezifische Bindungsstelle für ebendiese Aminosäure verfügt. An dem tRNA-Molekül ist außerdem eine so genannte Antikodonschleife vorhanden, deren Sequenz an Basen komplementär zu dem auf der mRNA vorhandenen Kodon ist. Dabei kodieren immer drei Nukleobasen für eine Aminosäure. Die Kodierung ist mehrfach redundant, aber eindeutig. Nach der Proteinsynthese zerlegen RNase-Proteine die mRNA in einzelne Nukleotide, die dadurch erneut für die Synthese neuer RNA zur Verfügung stehen. Der Prozess der Proteinsynthese von der Transkription der DNA-Sequenz bis zur Bildung eines funktionsfähigen Proteins wird als Genexpression bezeichnet.

### 3.3 Aminosäuren und Proteine

Aminosäuren sind eine Klasse kleiner organischer Moleküle mit mindestens einer Carboxylgruppe ( $-\text{COOH}$ ) und mindestens einer Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ). Sie liegen in neutraler wässriger Phase als Zwitterion vor. Die Säuregruppe gibt ein Wasserstoffion ab ( $pK_{a1}$ ) und trägt dann eine negative Ladung, die Aminogruppe nimmt ein Wasserstoffion auf ( $pK_{a2}$ ) und trägt dann eine positive Ladung. Bei einem bestimmten pH-Wert, dem so genannten isoelektrischen Punkt (pI), sind bei Aminosäuren gleich viele Säuregruppen negativ geladen wie Aminogruppen positiv geladen sind. Der pH-Wert am isoelektrischen Punkt lässt sich aus den beiden  $pK_a$ -Werten der Carboxylgruppe und der Aminogruppe durch  $pI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2$  berechnen. Aminosäuren erfüllen im Organismus unterschiedliche Funktionen, dienen jedoch vor allem als Bausteine von Peptiden und Proteinen. Nur für 20 – den so genannten proteinogenen – Aminosäuren sind im genetischen Code Codons enthalten, wodurch diese regelmäßig in Proteinen zu finden sind. Darüber hinaus fungieren Aminosäuren als Bausteine für Phospholipide und wirken selbst als Neurotransmitter. Andere wiederum sind Vorstufen von Neurotransmittern und verschiedenen Metaboliten, wie beispielsweise von Glucose oder von Purin- und Pyrimidinbasen.



**Abbildung 3.5: Sekundärstrukturen von Proteinen:  $\alpha$ -Helix (links) und  $\beta$ -Faltblatt (rechts), in dem 2 anti-parallele Stränge durch eine  $\beta$ -Schleife verbunden sind. Räumliche Anordnungen dieser Sekundärstrukturen zueinander werden als Tertiärstrukturen bezeichnet.**

Aminosäuren werden einerseits nach der chemischen Struktur ihrer Seitenketten, andererseits nach ihrer Polarität klassifiziert. Spektroskopisch besonders interessant sind die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp, W), Tyrosin (Tyr, Y) und Phenylalanin (Phe, F). Sie zeigen starke Lichtabsorption im UV-Bereich zwischen 250 und 300nm und Fluoreszenz zwischen 300 und 380nm. Verknüpft man Aminosäuren

durch Säureamid-Bindungen miteinander, entstehen lineare Makromoleküle, die man bis zu einer Kettenlänge von etwa 50 als Peptide bezeichnet. Bis zu einer Länge von ungefähr 100 Aminosäure-Resten bezeichnet man sie als Polypeptide; noch längere Ketten werden schließlich als Proteine bezeichnet. Jeder Organismus enthält Tausende verschiedener Proteine, die je nach Art verschiedene Funktionen übernehmen. Enzyme z.B. katalysieren den Stoffwechsel, Transportproteine hingegen transportieren wichtige Substanzen wie Sauerstoff und Eisen im Körper.

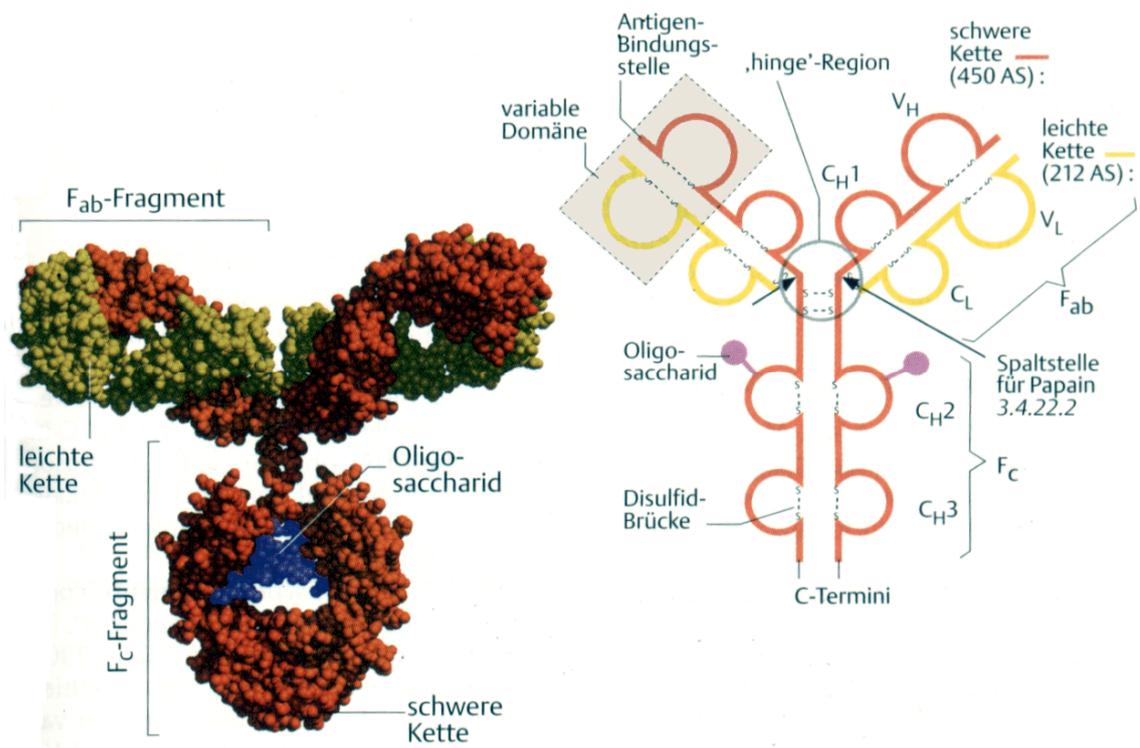
Für die Funktion der Proteine ist nicht nur ihre Aminosäuresequenz, sondern vor allem ihre räumliche Struktur verantwortlich, die in vier Kategorien eingeteilt werden kann. Die Primärstruktur der Proteine (Sequenz) wird durch eine lineare Kette von proteinogenen Aminosäuren gebildet, die über kovalente Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Durch chemische Eigenschaften der Aminosäuresequenz, wie z.B. die Position hydrophober und hydrophiler Seitenketten, wird die Sekundärstruktur des Proteins bestimmt. Dabei bilden sich immer wieder charakteristische Sekundärstrukturen aus [Abbildung 3.5]:

- $\alpha$ -Helix: Gehört zu den häufigsten Sekundärstrukturen, bei denen die Peptidkette schraubenförmig gewunden ist. Auf jede Umdrehung der Schraube entfallen 3,6 Aminosäuren. Die Ganghöhe der Schraube beträgt 0,54nm. Stabilisiert werden  $\alpha$ -Helices durch Wasserstoffbrücken zwischen den NH- und CO-Gruppen, die in der Sequenz jeweils 4 Positionen voneinander entfernt sind.
- $\beta$ -Faltblatt: Zwei fast gestreckte Konformationen der Peptidkette, bei der die Peptidebenen wie auf einem regelmäßig gefalteten Papierblatt angeordnet sind. In Faltblättern bilden sich Wasserstoffbrücken nur zwischen benachbarten Ketten aus, die parallel oder antiparallel nebeneinander verlaufen.
- $\beta$ -Schleife: Befindet sich an Stellen, an denen die Peptidkette ihre Richtung ändert. Sie besteht häufig aus 4 Aminosäure-Resten, die so angeordnet sind, dass sich der Verlauf der Kette um etwa  $180^\circ$  in die Gegenrichtung umkehrt.  $\beta$ -Schleifen liegen oft zwischen einzelnen Strängen antiparalleler Faltblätter oder zwischen Faltblatt und  $\alpha$ -Helix.
- Random Coil: Unstrukturierte Bereiche in Proteinen mit keiner erkennbaren Struktur wie beispielsweise  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter. Sie sind für die Proteinstruktur aber genauso wichtig wie die regelmäßigeren Formen, weil sie

unter anderem Rückwärtsbiegungen und dadurch die Ausbildung von sehr kompakten Strukturen erlauben.

Die Tertiärstruktur eines Proteins beschreibt die vollständige dreidimensionale Struktur der Kette. Die Kautzman-Regel beschreibt, dass die hydrophoben Bereiche im Inneren, während die hydrophilen und/oder geladenen Bereiche dem wässrigen Milieu zugewandt sind. In die Stabilisierung von Tertiärstrukturen sind oft Disulfidbrücken involviert. Insbesondere bei Proteinen ist die Tertiärstruktur charakteristisch und für die biologische Funktion unbedingt notwendig. Größere Proteine können aber aus mehr als einer Aminosäurekette bestehen. Die dreidimensionale Anordnung dieser einzelnen Ketten bezeichnet man als Quartärstruktur. Hydrophobe, ionische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen bestimmen dabei die räumliche Strukturierung von Aminosäureketten.

Eine wichtige Aufgabe der Proteine besteht in der Bereitstellung des Immunsystems. Dessen Hauptaufgabe ist die Abwehr von Virusinfektionen, Mikroorganismen und sonstigen Fremdmolekülen, die in den Organismus eindringen und Krankheiten verursachen. Die wichtigsten Proteine des Immunsystems sind die Antikörper – auch Immunglobuline (Ig) genannt. Antikörper werden im Zuge der humoralen Immunabwehr gebildet und befinden sich im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten. Sie selbst haben keine antimikrobiellen Eigenschaften, unterstützen aber das zelluläre Immunsystem, indem sie z.B. an Antigene auf der Oberfläche von Erregern binden, dadurch deren Interaktion mit Körperzellen verhindern und den Verdau des Erregers durch spezielle Zellen (Komplement-System) der Immunabwehr aktivieren. Diese Aufgabe verlangt eine hohe Spezifität und Affinität zu den entsprechenden Antigenen. Die Assoziationskonstante  $K_a$  für Antikörper-Antigen Wechselwirkungen liegt zwischen  $10^8$  und  $10^{13}M^{-1}$ . Hierdurch wird sichergestellt, dass das fremde Molekül auch bei niedrigen Konzentrationen, heterogenen Gemischen aus Proteinen, Nukleinsäuren und Elektrolyten, wie sie in Körperflüssigkeiten vorkommen, spezifisch erkannt wird. Da diese Wechselwirkung sehr spezifisch ist, muss eine Vielzahl Antikörper hergestellt werden können. Man geht davon aus, dass das vorhandene Genmaterial die Kapazität für 10 Millionen Antikörpertypen hat [73].



**Abbildung 3.6: Domänenstruktur des Immunglobulins G bestehend aus zwei schweren H-Ketten (rot bzw. orange) und zwei leichten L-Ketten (gelb) [74].**

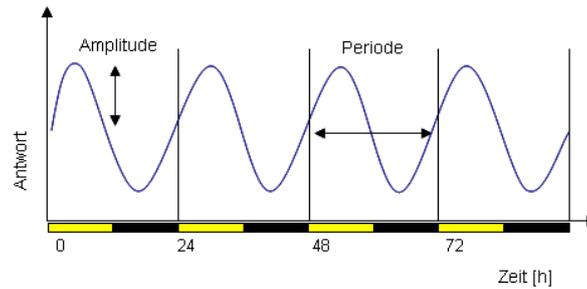
Die menschlichen Immunglobuline (Ig) lassen sich in 5 Klassen gliedern (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), wobei die Immunglobuline vom Typ G (IgG) die quantitativ wichtigsten Antikörper sind. Die IgG (Masse 150kDa) sind Tetramere aus zwei schweren H-Ketten (rot bzw. orange) und zwei leichten L-Ketten (gelb) [Abbildung 3.6], die im Wesentlichen aus  $\beta$ -Faltblättern bestehen. Die Proteinase Papain spaltet IgG in zwei  $F_{ab}$ -Fragmente und ein  $F_c$ -Fragment. Die  $F_{ab}$ -Fragmente („antigen binding“) bestehen jeweils aus einer L-Kette und dem N-terminalen Teil einer H-Kette und können noch Antigene binden. Das  $F_c$ -Fragment („crystallizable“) setzt sich aus den C-terminalen Hälften der beiden H-Ketten zusammen. Dieser Abschnitt dient der Bindung der IgG an Zelloberflächen, der Interaktion mit dem Komplement-System und dem Transport der Antikörper [75]. Immunglobuline sind modular aus mehreren Domänen aufgebaut. Die H-Ketten der IgG enthalten vier dieser Domänen ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ), die L-Ketten zwei ( $C_L$  und  $V_L$ ). Die Buchstaben C und V kennzeichnen jeweils konstante bzw. variable Bereiche. Disulfid-Brücken verbinden die beiden schweren Ketten untereinander, sowie die schweren und die leichten Ketten. Aber auch innerhalb der Domänen finden sich Disulfid-Brücken, die die Tertiärstruktur stabilisieren. Die Domänen haben eine Länge von etwa 110 Aminosäuren und sind untereinander homolog. Offenbar entstand die Antikörperstruktur durch Gen-Duplikation. In ihrem

zentralen Bereich, der so genannten „hinge“-Region, die wie ein Scharnier funktioniert, sind die Antikörper sehr beweglich.

Antikörper binden ein Antigen nicht zufällig, sondern erkennen mit ihrer Antigen-Bindungsstelle der variablen Domäne [Abbildung 3.6] sehr spezifisch Bindestellen auf dem Antigen, die so genannten Epitope. Ein Epitop ist ein kleiner Bereich eines Antigens, von dem ein Antigen meistens mehrere hat. Gegen jedes dieser Epitope kann ein spezifischer Antikörper gebildet werden. Es wird zwischen linearen bzw. kontinuierlichen und nicht-linearen bzw. diskontinuierlichen Epitopen unterschieden. Proteine bestehen aus Aminosäureketten und sind meist dreidimensional gefaltet. So können Epitope aus verschiedenen im Raum nah beieinander liegenden Aminosäureresten bestehen, die aber in der Aminosäuresequenz weit voneinander entfernt sind. Solche Epitope werden nicht-linear bzw. diskontinuierlich genannt, da sie nur im nativen Zustand des Proteins vorhanden sind. Werden die Aminosäureketten denaturiert findet der Antikörper das Epitop nicht mehr. Epitope, die auch nach einer Denaturierung bestehen bleiben, da sie aus Aminosäureresten bestehen, die in der Sequenz aufeinander folgen, werden folglich als linear bzw. kontinuierlich bezeichnet. Eine solche Sequenz ist üblicherweise ungefähr 15 Aminosäuren lang. Die meisten Antikörper erkennen das Antigen anhand eines diskontinuierlichen Epitops. Daher dürfen die meisten proteinogenen Antigene nicht entfaltet sind, sondern müssen in ihrer nativen Form vorliegen.

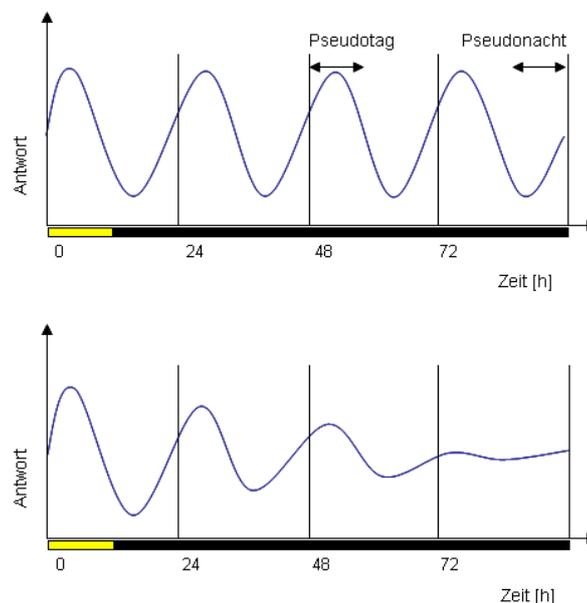
### **3.4 Eigenschaften zirkadianer Oszillatoren**

Zellen eines mehrzelligen Organismus haben unterschiedliche Funktionen, obwohl sie alle die gleichen DNA-Sequenzen in den Chromosomen enthalten. Ursache dafür ist eine zellspezifische Proteinbiosynthese. Dabei werden in unterschiedlichen Zelltypen nur bestimmte DNA-Sequenzen ausgelesen und Proteine synthetisiert. Eine Art der spezifischen Genexpression stellt die innere Uhr dar, der so genannte zirkadiane („circa diem“ (lat.): ungefähr ein Tag) Oszillator. Endogene Rhythmen kontrollieren dabei die Aktivität eines Organismus in Anlehnung an die Erdrotation mit einer Periodizität von 24 Stunden und einer bestimmten Amplitude der Antwort des Prozesses [Abbildung 3.7].



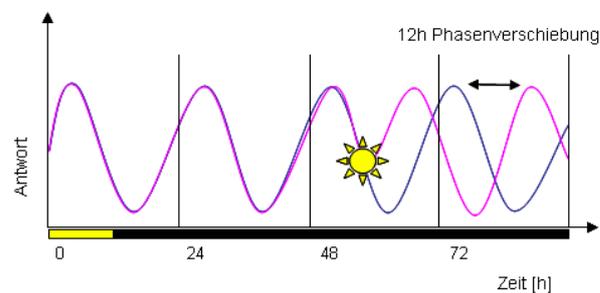
**Abbildung 3.7: Die Antwort eines zirkadianen Oszillators folgt dem Tag/Nacht-Rhythmus des Zeitgebers**

Nahezu alle physiologischen Prozesse unterliegen einem 24h-Rhythmus [35, 36], wobei beim Menschen der Schlaf-Wach-Rhythmus am auffälligsten ist. Bei Pflanzen spiegelt sich der zirkadiane Rhythmus in der Blattbewegung zur Photosynthese und im Öffnen und Schließen der Blüte oder der Blattöffnungen im Morgengrauen bzw. in der Dämmerung wider. Als externe Zeitgeberimpulse, die die innere Uhr synchronisieren, gelten Licht (hell-dunkel), Temperatur (warm-kalt) sowie auch Phasen der Nahrungsaufnahme und soziale Stimuli. Intensives Licht ist beim Menschen der stärkste Zeitgeber. Der Vorteil der Anpassungsfähigkeit eines Organismus an einen externen Zeitgeber liegt in der Antizipation zukünftiger Gegebenheiten und der Möglichkeit, sich mit einem zeitlichen Vorlauf auf diese einzustellen.



**Abbildung 3.8: Entfallen externe Stimuli, wie z.B. das Licht, setzt sich der endogene Rhythmus zunächst unter Annahme eines Pseudotages und einer Pseudonacht fort (oben). Nach einer Zeit kommt aber auch diese Oszillation zum Erliegen (unten).**

Wenn eine Pflanze unter konstanten Bedingungen, wie z.B. durchgängiger Dunkelheit oder Helligkeit, angezogen wird, läuft der endogene Oszillator unabhängig vom Hell-Dunkel-Rhythmus eines Tages. Die Pflanze erfährt dann einen Pseudotag und eine Pseudonacht [Abbildung 3.8 oben]. Wird die Pflanze jedoch für längere Zeit – wobei die genaue Länge je nach Pflanze und Antwortverhalten variiert – unter konstanten Bedingungen kultiviert, so kommt der zirkadiane Oszillator schließlich zum Erliegen [Abbildung 3.8 unten]. Auf Grund der Stärke des endogenen Oszillators kann eine signifikante Phasenänderung eine Pflanze deutlich durcheinander bringen [Abbildung 3.9]. Ein solches Phänomen ist beim Menschen als so genannter „Jet-Lag“ bekannt.

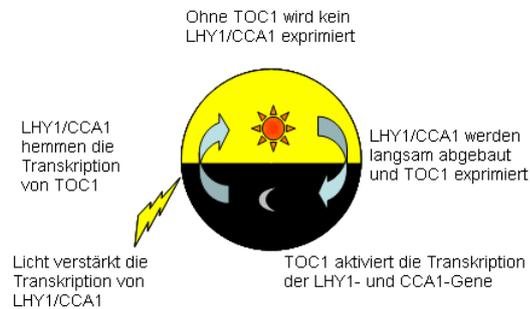


**Abbildung 3.9: Plötzliche Änderungen des Zeitgebers führen zu einer Irritation der inneren Uhr („Jet-Lag“)**

Jede Pflanzenzelle hat eine eigene unabhängige biologische Uhr. Diese sind jedoch untereinander durch Signale aus der Umgebung synchronisiert. Das Umgebungssignal kann direkte Auswirkung auf die Expression von Genen haben, die dann z.B. zu einer Proteinsynthese führen. Andererseits kann sich die Genexpression auch durch einen Rückkopplungsmechanismus selbst regulieren und somit eine Oszillation aufrechterhalten. In *Arabidopsis thaliana* spielen die Gene LHY (Late Elongated Hypocotyl), CCA1 (Circadian Clock Associated1) und TOC1 (Timing Of CAB Expression1) eine wichtige Rolle. Diese soll nun exemplarisch für den Mechanismus biologischer Uhren in Pflanzen erklärt werden. Eine weitaus detailliertere und umfangreichere Darstellung findet man in den Referenzen [76-78].

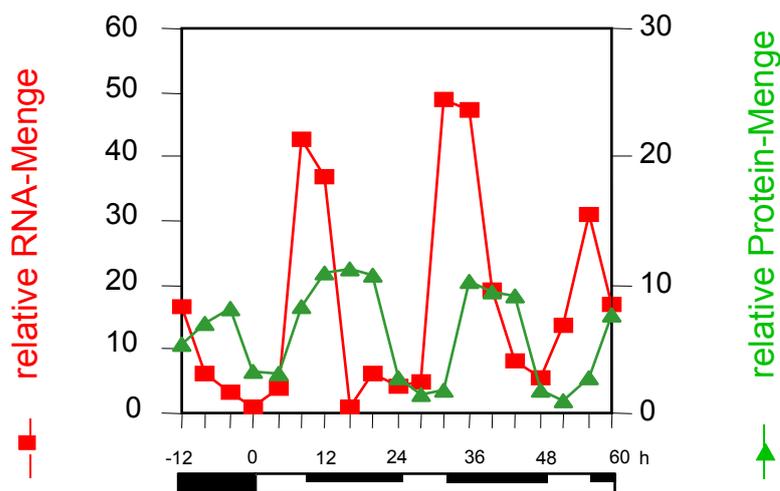
Die Expression von TOC1 nimmt zum Abend hin zu, wodurch die Transkription von LHY1 und CCA1 am folgenden Tag aktiviert wird. Man weiß aber, dass LHY1 und CCA1 direkt durch Licht aktiviert werden können, wodurch die Zunahme der Expression zusätzlich verstärkt wird. Im Gegensatz dazu wird die Expression von TOC1 durch LHY1 und CCA1 gehemmt. Dadurch fehlt aber TOC1 zur Aktivierung der

Expression von LHY1 und CCA1. Somit geht auch die Expression von LHY1 und CCA1 zurück. TOC1 wird dann nicht mehr gehemmt und der Kreislauf beginnt erneut.



**Abbildung 3.10: Beispiel eines bekannten zirkadianen Oszillators in *Arabidopsis thaliana***

Regulationen lassen sich vereinfacht durch Master- und ihnen untergeordnete Slave-Oszillatoren beschreiben. Der Master-Oszillator reguliert die Genexpression auf transkriptioneller Ebene; d.h. er bestimmt wann und welche Informationen von der DNA abgelesen und somit auch welche Proteine synthetisiert werden. Alle Regulationen, die nach der Transkription der Information in eine RNA stattfinden, werden als posttranskriptionell bezeichnet und Slave-Oszillatoren genannt. Hierbei kann die Regulation noch im Zellkern während des Spleißens, beim Transport aus dem Zellkern, bei der Translation der RNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz oder durch Abbau der RNA durch spezifisch bindende Proteine stattfinden.



**Abbildung 3.11: Relative Menge der RNA und des Proteins AtGRP7 im zeitlichen Verlauf [38]**

Der Regulationsmechanismus von *Arabidopsis thaliana* bedient sich des RNA-bindenden Proteins AtGRP7 (*Arabidopsis thaliana* Glycin-reiches RNA-Bindeprotein), das ein Teil eines zirkadianen Oszillators ist. Es reguliert die Konzentration seiner mRNA auf posttranskriptioneller Ebene [79], wobei es sich um einen untergeordneten Slave-Oszillator handelt [38]. Man geht davon aus, dass die Rückkopplungsschleifen von TOC1, LHY und CCA1 den übergeordneten Masteroszillator darstellen, weil diese neben verschiedenen physiologischen und molekularen Prozessen in *Arabidopsis thaliana* auch die *Atgrp7* Genexpression beeinflussen [40]. Bei der Regelung des Slave-Oszillators durch AtGRP7 bindet das Protein an seine prä-RNA und aktiviert eine alternative Spleißstelle [42]. Das alternativ gespleißte Transkript hat eine geringere Halbwertszeit als die reguläre mRNA. Das bedeutet, dass es schneller von RNA-verdauenden Proteinen zerlegt wird, was letztlich zu einer Abnahme der mRNA-Konzentration führt. Zudem kann aus diesem Transkript kein funktionsfähiges Protein synthetisiert werden. Die Konzentration des funktionsfähigen Proteins AtGRP7 nimmt daher ab. Somit ist die Konzentration des Proteins AtGRP7 in der Zelle nicht mehr hoch genug, um effizient die eigene prä-RNA zu binden. Wird das Minimum der Proteinkonzentration erreicht, fängt die mRNA an zu reakkumulieren. Dadurch entsteht eine im Tagesverlauf gegeneinander phasenverschobene Oszillation der Konzentrationen von AtGRP7 und seines Transkripts [Abbildung 3.11]. Um diesen Regulationsmechanismus besser verstehen zu können, ist es wichtig, die Bindung des Proteins an seine RNA zu untersuchen und zu charakterisieren.

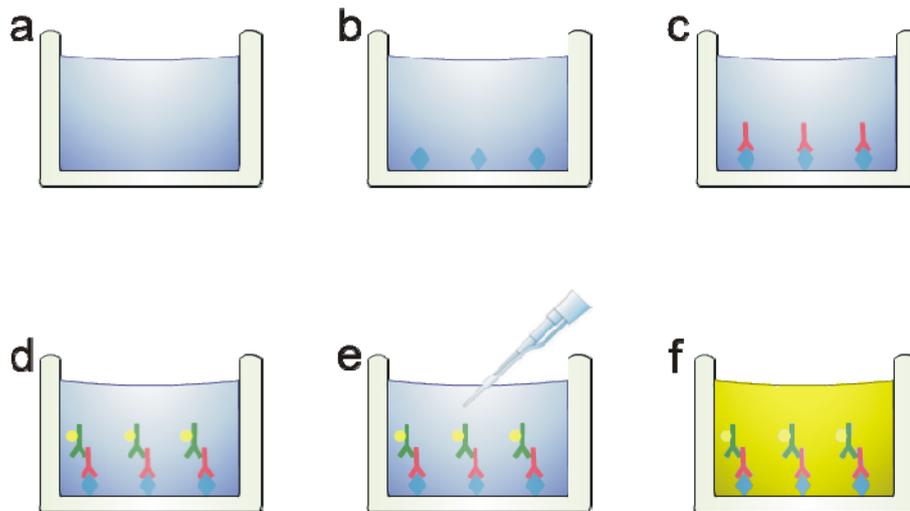
## **4 Methoden und experimenteller Aufbau**

In der vorliegenden Arbeit werden Experimente zu Protein-Protein-Wechselwirkungen am Beispiel der Antigen-Antikörper-Bindung mittels UV-FLIM durchgeführt. Darüber hinaus werden Protein-Wechselwirkungen mit DNA- bzw. RNA-Oligonukleotiden mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) untersucht. Im Folgenden wird ein Überblick über den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der ELISA-Technik und der Gelelektrophorese gegeben. Es wird die Analyse von Bindungsexperimenten vor dem Hintergrund des Massenwirkungsgesetzes erklärt. Darüber hinaus werden die beiden unterschiedlichen Versuchsaufbauten sowie die entsprechende Datenauswertung detailliert beschrieben. Zum Schluss folgt eine kurze Darstellung des Verfahrens der Farbstoffmarkierung von Oligonukleotiden.

### **4.1 Nachweis von Protein-Wechselwirkungen**

#### **4.1.1 Nachweis mittels ELISA und Gelelektrophorese**

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) und die so genannte Gelelektrophorese in Verbindung mit der Wester Blot-Technik sind in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung sowie in der Diagnostik häufig eingesetzte Nachweisverfahren von Antigenen und Antikörpern. Mittels dieser Verfahren können Proteine, Viren oder Hormone, aber auch Toxine und Pestizide in einer Probe – z.B. in Körperflüssigkeiten wie Blut, Blutserum oder Urin – nachgewiesen werden. Ein heterogener ELISA kann entweder Antigene durch monoklonale Antikörper (direkt) oder Antikörper, wie z.B. HIV-Antikörper, durch entsprechende Antigene (indirekt) nachweisen, wobei diese mit hoher Spezifität und Bindungsstärke an den entsprechenden Bindungspartner binden müssen.



**Abbildung 4.1: Prinzip eines ELISA-Assays. An das auf einer festen Phase (a) immobilisierte Antigen (b) bindet der entsprechende Antikörper (c). Dieser wird mit einem sekundären Enzym-konjugierten Antikörper (d) unter Zugabe eines Chromogens (e) durch Farbumschlag (f) nachgewiesen.**

Der Nachweis wird schrittweise auf einer so genannten festen Phase, wie z.B. einem Reagenzglas, einer Mikrotiterplatte oder einem anderen Substrat, durchgeführt [Abbildung 4.1 a]. Auf dem Substrat wird das entsprechende Antigen oder Peptidepitop kovalent oder durch Adsorption immobilisiert [Abbildung 4.1 b]. Dies wird mit einer standardisierten Menge der eingesetzten Körperflüssigkeit inkubiert. Dabei kommt es zur Bindung der in der Probe enthaltenen Antikörper an die immobilisierten Antigene. Durch einen Waschschrift werden alle nicht gebundenen Substanzen entfernt, so dass nur der am Antigen gebundene Antikörper zurückbleibt [Abbildung 4.1 c]. Dieser kann mit einem sekundären Detektionsantikörper, an dem ein Enzym (meistens Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase) kovalent gebunden ist, nachgewiesen und gegebenenfalls quantifiziert werden. So entsteht ein Antigen-Antikörper-Antikörper-Sandwich [Abbildung 4.1 d]. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen. Dann wird ein Chromogen, beispielsweise p-Nitrophenylphosphat, zugegeben [Abbildung 4.1 e]. Ein Chromogen ist die Vorstufe eines Farbstoffes, die erst nach einer Umwandlungsreaktion zum eigentlichen Farbstoff wird. Die alkalische Phosphatase spaltet bei der Umwandlung den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab, und es entsteht schwach gelbes p-Nitrophenol [Abbildung 4.1 f]. Diese Reaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu

bestimmenden Antikörpers in der Probe. Auf Grund der enzymatischen Verstärkung lässt sich eine Nachweisgrenze für Antikörper von  $\sim 10^{-11} \text{M}$  erreichen [80]. Daneben gibt es aber mehrere Nachteile: Der Assay dauert lange (mehrere Stunden), weil mehrere Inkubations- und Waschschriffe notwendig sind. Darüber hinaus kann es zu unspezifischer Adsorption von Antikörpern auf der festen Phase kommen, die unter Umständen zu einem falschen Positivsignal führen.

Beim Western Blot hingegen werden Antigene zuvor mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, bei der eine Mischung aus den zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Felds durch ein Gel, z.B. Agarose oder Polyacrylamid, wandert. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell, wodurch es zu einer Auftrennung kommt. Dieser Parameter wird als elektrophoretische Mobilität  $\mu$  bezeichnet. Vereinfacht lässt sie sich aus der Kraft, die auf ein geladenes Teilchen im elektrischen Feld wirkt, und der Reibungskraft nach Stokes ableiten:

$$F_{el} = q \cdot E$$

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

4.1

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

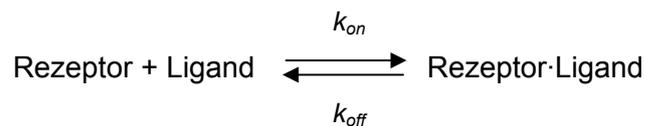
In realen Systemen wird die elektrophoretische Mobilität jedoch noch durch weitere Faktoren wie die Hydrathülle, die Ionenatmosphäre, der Dissoziationsgrad des Elektrolyten und Effekte durch das Trägermaterial beeinflusst.

Moleküle mit gleicher elektrophoretischer Mobilität bewegen sich mit gleicher Geschwindigkeit. Daher haben sie nach einer gewissen Zeit gleiche Strecken zurückgelegt und bilden so genannte Banden aus. Diese werden beim Western Blot nach der Auftrennung vom Gel durch ein senkrecht dazu angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese bleiben auf Grund elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden, die an der passenden Proteinbande auf der Membran binden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden dann durch Waschschriffe wieder entfernt.

Die Proteine lassen sich durch den Farbstoff Coomassie oder eine Silberfärbung, bei denen alle Proteine unspezifisch markiert werden, detektieren. Andere Farbstoffe sind in der Lage, alle phosphorylierten Proteine spezifisch zu markieren. Je nach Versuchsaufbau können einzelne Proteine auch direkt visualisiert werden. Dazu verwendet man radioaktiv markierte Proteine, bei denen Isotope während der Proteinsynthese oder Phosphorylierung eingebaut werden. Durch das Auftrennen der Antigene vor der Detektion durch die Antikörper können unspezifische Signale besser erkannt werden, was die Western Blot-Technik zu einem zuverlässigeren Verfahren als ELISA macht. Der Nachteil gegenüber ELISA ist jedoch, dass das Protokoll sehr aufwendig ist und mehr Zeit in Anspruch nimmt. Auf Grund seiner Eigenschaften wird ein Western Blot beispielsweise für die Bestätigung eines positiven ELISA-Ergebnisses einer HIV-Infektion eingesetzt.

#### 4.1.2 Analyse von Bindungsexperimenten

Die meisten Auswertungen von Bindungsexperimenten basieren auf einem einfachen Gesetz, dem so genannten Massenwirkungsgesetz, durch das die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor beschrieben wird:



Eine Bindung findet statt, wenn sich Rezeptor und Ligand diffusionskontrolliert treffen. Die Anzahl der Komplexierungen pro Zeiteinheit ist gegeben durch  $[\text{Rezeptor}] \cdot [\text{Ligand}] \cdot k_{\text{on}}$ , wobei  $[\text{Rezeptor}]$  und  $[\text{Ligand}]$  die entsprechenden Konzentrationen sind und  $k_{\text{on}}$  die Assoziationsrate ist. Wenn eine Bindung stattgefunden hat, bleiben Rezeptor und Ligand für eine bestimmte Zeit, die durch die Affinität der Bindungspartner gegeben ist, komplexiert. Analog zur Komplexierung findet auch eine Dissoziation, gegeben durch  $[\text{Rezeptor} \cdot \text{Ligand}] \cdot k_{\text{off}}$ , statt. Dabei ist  $[\text{Rezeptor} \cdot \text{Ligand}]$  die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Prozessen ist erreicht, wenn die Anzahl der gebildeten gleich groß wie die Anzahl der dissoziierten Komplexe pro Zeiteinheit ist:

$$[\text{Rezeptor}] \cdot [\text{Ligand}] \cdot k_{on} = [\text{Rezeptor} \cdot \text{Ligand}] \cdot k_{off} \quad 4.2$$

Durch dieses Gleichgewicht ist die Dissoziationskonstante  $K_d$  definiert:

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[\text{Rezeptor}] \cdot [\text{Ligand}]}{[\text{Rezeptor} \cdot \text{Ligand}]} \quad 4.3$$

Die Dissoziationskonstante gibt an, bei welcher Konzentration des Liganden die Hälfte der Rezeptoren im Gleichgewicht besetzt ist. Auf Grund der Definition kann die Dissoziationskonstante direkt am Wendepunkt einer Bindungsisotherme abgelesen werden. Ein kleiner Wert für  $K_d$  bedeutet daher eine hohe Affinität der Bindungspartner, weil schon eine geringe Menge ausreicht, um die Hälfte der Rezeptoren zu besetzen. Entsprechend bedeutet ein großer Wert für  $K_d$ , dass die Affinität gering ist. Die Assoziations- oder Affinitätskonstante  $K_a$  ist reziprok zu Dissoziationskonstanten definiert:

$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[\text{Rezeptor} \cdot \text{Ligand}]}{[\text{Rezeptor}] \cdot [\text{Ligand}]} \quad 4.4$$

## 4.2 UV-FLIM

### 4.2.1 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Untersuchung der Fluoreszenz von Molekülen ist eine weit verbreitete Methode, um Rückschlüsse auf Eigenschaften oder Wechselwirkungen dieser Moleküle zu ziehen. Im Wesentlichen unterscheidet man stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen. Bei Untersuchung der stationären Fluoreszenz arbeitet man mit konstanter Anregung und Detektion. Bei zeitaufgelösten Messungen hingegen werden eine kurze und gepulste Anregungslichtquelle, eine schnelle Elektronik und empfindliche Detektoren benötigt. Als Anregungslichtquelle kommen schnelle LEDs, Laserdioden oder gepulste Lasersysteme in Frage. Dadurch ist es möglich, kinetische Informationen über die Fluoreszenzemission, die auf einer Nanosekunden-Zeitskala stattfindet, zu erhalten. Während die Messung der stationären Fluoreszenz mit

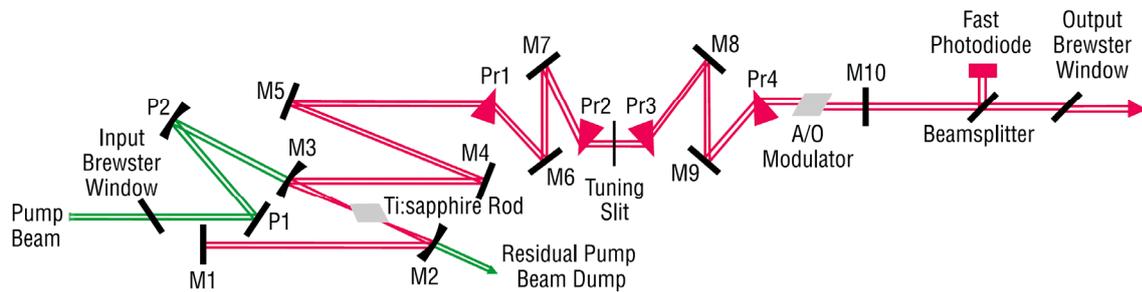
kommerziell erhältlichen Geräten schnell und einfach durchführbar ist, sind zeitaufgelöste Messungen im Allgemeinen sehr komplex und auf Grund der verwendeten Geräte teurer. Zeitaufgelöste Messungen sind in der Fluoreszenzspektroskopie weit verbreitet, weil die Fluoreszenzlebensdauer charakteristisch für jeden Fluorophor ist und stark von seiner chemischen Umgebung abhängt. Denn diese hat direkten Einfluss auf die Raten, mit denen der  $S_1$ -Zustand strahlend und strahlungslos depopuliert wird. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie liefert durch Messung der Fluoreszenzlebensdauer mehr Informationen als die herkömmliche stationäre Fluoreszenz. Deshalb ist sie zur Untersuchung von biologischen Makromolekülen besonders geeignet. Beispielweise kann man hier ein Protein bestehend aus zwei Tryptophan-Resten mit unterschiedlichen Lebensdauern betrachten. Wegen der spektralen Überlappung von sowohl Absorption wie auch Emission ist man üblicherweise nicht in der Lage, die Emission von beiden Tryptophan-Resten zu unterscheiden. Verwendet man aber eine zeitaufgelöste Messung so erhält man zwei unterschiedliche Lebensdauern von den Tryptophan-Resten. Diese können wiederum dazu verwendet werden, das Emissionsspektrum und die relativen Intensitäten der einzelnen Reste aufzulösen. Daraus entstehen aber auch Fragestellungen, z.B. inwiefern die Emission unter Umständen durch ein Substrat oder andere Makromoleküle als Störung beeinflusst wird. Diese Frage lässt sich auf Proteine, bei denen sich ein Tryptophan in der Nähe einer Bindungsstelle befindet, ausdehnen. Obwohl durch die Ratengleichung [Gleichung 2.15] ein bekannter Zusammenhang zwischen stationärer Intensität und Fluoreszenzlebensdauer besteht, gehen bei der zeitlichen Mittelung im Falle der stationären Intensität viele molekulare Informationen verloren. Denn häufig können Makromoleküle über mehr als eine Konformation verfügen oder das Fluoreszenzabklingverhalten einer gebundenen Probe hängt von einer besonderen Konformation ab. Diese Zustände können dann mit einer Fluoreszenzlebensdauerermessung aufgeklärt werden, indem zwei Fluoreszenzlebensdauerzeiten nachgewiesen werden. Das lässt dann den Rückschluss auf mehr als eine Konformation zu. Im Vergleich dazu zeigt die Messung der stationären Intensität nur eine Durchschnittsintensität, die im Wesentlichen von den Anteilen der beiden vorhandenen Fluoreszenzlebensdauerzeiten abhängt. Es können aber auch Energietransferraten gemessen werden, die für eine geringere Fluoreszenzlebensdauer oder eine Fluoreszenzlöschung verantwortlich sein können. Dieser Prozess kann stattfinden, wenn ein geeignetes fluoreszenzlöschendes Molekül, z.B. Tryptophan oder Guanosin, in der Nähe des entsprechenden Fluorophors, z.B. MR121, ist [81].

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer gibt es im Wesentlichen zwei Techniken: die Messung in der Zeit-Domäne und die Messung in der Frequenz-Domäne – auch Phasenmodulationsmethode genannt. Bei der Messung in der Zeit-Domäne wird die Probe durch einen kurzen Lichtpuls angeregt. Die Breite des Anregungspulses sollte dabei so kurz wie möglich – auf jeden Fall viel kürzer als die zu erwartende Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  – sein. Es wird der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität nach dem Anregungspuls gemessen. Dazu können ein schneller, schaltbarer Bildverstärker in Kombination mit einer CCD-Kamera oder eine Streak-Kamera verwendet werden. Danach kann die Fluoreszenzlebensdauer aus dem zeitaufgelösten Fluoreszenzabklingverhalten durch Fitten eines geeigneten Decay-Modells bestimmt werden. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, die Fluoreszenzlebensdauer durch zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) zu bestimmen. Dabei wird für jedes detektierte Fluoreszenzphoton die Zeit relativ zum Anregungspuls gemessen. Ein Histogramm der Ankunftszeit der Photonen nach dem Anregungspuls ergibt eine Fluoreszenzabklingkurve, die entsprechend ausgewertet werden kann. Eine alternative Methode ist die Messung in der Frequenz-Domäne. Bei diesem Verfahren wird die Probe durch Intensitäts-moduliertes Licht angeregt. Die Intensität des Anregungslichtes wird typischerweise durch eine Sinuswelle mit hoher Frequenz, dessen Schwingungsdauer in etwa der zu erwartenden Fluoreszenzlebensdauer entspricht, moduliert. Die Emission des Moleküls folgt mit der gleichen Modulationsfrequenz, ist aber auf Grund der Fluoreszenzlebensdauer gegenüber der Anregung verzögert. Dies führt zu einer konstanten Phasenverschiebung, aus der die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden kann.

#### **4.2.2 Experimenteller Aufbau**

Zur Messung von UV-Fluoreszenzlebensdauern werden eine gepulste Anregungslichtquelle mit kurzer Pulsdauer und eine schnelle, zeitaufgelöste, hochempfindliche, für ultraviolette Strahlung besonders geeignete Detektionseinheit benötigt. In den Experimenten wird daher ein kommerziell erhältliches zweistufiges Lasersystem der Firma Spectra-Physics sowie ein Frequenzverdreifacher der Firma GWU zur Erzeugung des Anregungslichtes eingesetzt. Die Detektionseinheit besteht

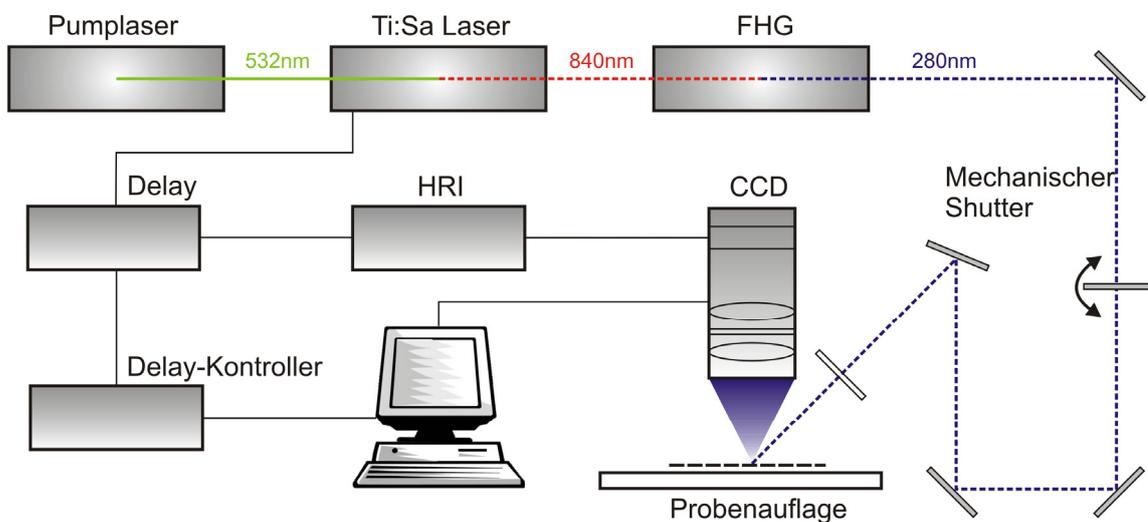
aus einer UV-durchlässigen Abbildungsoptik, einem schnellen Bildverstärker und einer rauscharmen CCD-Kamera.



**Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau des verwendeten Ti:Saphir-Lasers (Tsunami; Spectra-Physics).** Der Ti:Saphir-Kristall wird durch einen „Pump Beam“ optisch gepumpt. Mit dem „Tuning Slit“ lässt sich die Wellenlänge einstellen. Die Prismen Pr2 und Pr3 sorgen für die Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion. Der für die regenerative Modenkopplung verantwortliche akusto-optische Modulator wird durch ein Rückkopplungssignal der Photodiode gesteuert.

Als Pumplaser wird ein frequenzverdoppelter Nd:YVO<sub>4</sub> (Neodym-Yttrium-Vanadat) Hochleistungsdauerstrichlaser (Millennia Xs; Spectra-Physics) verwendet. Der Nd:YVO<sub>4</sub>-Kristall wird optisch durch zwei Diodenarrays mit 820nm gepumpt und emittiert intern einen Laserstrahl mit 1064nm Wellenlänge. Dieser wird durch einen LBO-Kristall (Lithium-Triborat) auf 532nm frequenzverdoppelt und ausgekoppelt. Durch diesen Prozess stehen schließlich 9W Pumpleistung zur Verfügung. Die Femtosekunden-Pulse werden von einem Titan:Saphir-Laser (Tsunami; Spectra-Physics) [Abbildung 4.2] erzeugt, der zwischen 720nm und 960nm durchstimmbar ist und im Experiment bei 840nm betrieben wird. Die Repetitionsrate der Pulse beträgt 80MHz. Die Moden sind regenerativ gekoppelt: d.h. der für die Modenkopplung verantwortliche akusto-optische Modulator wird über ein Rückkopplungssignal gesteuert. Dieses wird von einer Photodiode erzeugt, die sich im Resonator des Lasers befindet. Dadurch wird die Stabilität des Lasers z.B. gegenüber Temperaturschwankungen erhöht. Darüber hinaus steht für andere Laborgeräte ein 80MHz-Synchronisationssignal der Laserpulse zur Verfügung, um diese mit den Laserpulsen zu synchronisieren. Zeitliche Pulsbreiten von weniger als 100fs werden bei diesem Lasersystem durch Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion mit Hilfe zweier Prismen erzeugt. Die gemessene mittlere Leistung beträgt bei dieser Konfiguration ca. 1,6W. Das zur Anregung benötigte UV-Licht wird in einem weiteren Schritt durch Frequenzverdreifung der 840nm erzeugt. Dazu wird ebenfalls ein

kommerziell erhältliches System (Flexible Harmonic Generator, GWU-Lasertechnik) verwendet. Zunächst werden die 840nm in einem LBO-Kristall zu 420nm frequenzverdoppelt. Danach werden die erzeugten 420nm mit der Fundamentalen 840nm in einem BBO-Kristall (Bariumborat) gemischt. Erfolgt die Mischung räumlich und zeitlich kohärent, so kann eine Frequenzverdreifachung im BBO-Kristall erfolgen. Beides wird in diesem System durch die Justierung mit Spiegeln und einer variablen Delay-Strecke ermöglicht. Dadurch kann das zur optimalen Anregung benötigte gepulste Laserlicht mit 280nm Wellenlänge und einer Pulsdauer von 100fs (FWHM) mit einer Repetitionsrate von 80MHz erzeugt werden.

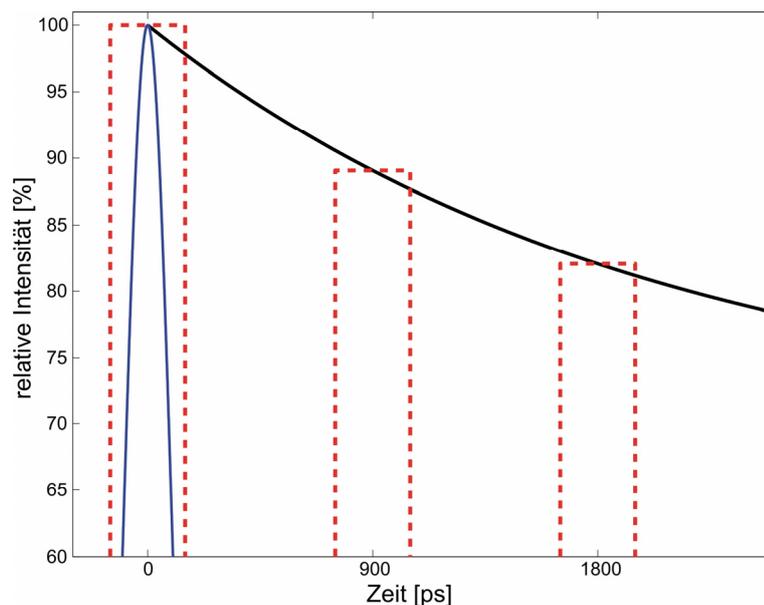


**Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau für Fluoreszenzlebensdaueremessungen:** Die Emission eines optisch gepumpten Ti:Sa-Lasers wird im FHG (Flexible Harmonic Generator) zu 280nm frequenzverdreifacht und durch einen holographischen Diffuser auf 1cm x 1cm aufgeweitet. Die Fluoreszenzemission wird über einen Bildverstärker (High Rate Imager, HRI), der mit den Laserpulsen synchronisiert ist, zeitaufgelöst von einer CCD-Kamera detektiert. Ein Computer übernimmt die Steuerung des Delays zwischen Laserpuls und Bildverstärkung sowie der CCD-Kamera.

Der so erzeugte UV-Laserstrahl mit 120mW Durchschnittsleistung wird mit einem holographischen Diffuser aufgeweitet, um die Probe auf einer Fläche von 1cm x 1cm mit 20mW/cm<sup>2</sup> homogen zu beleuchten. Die Emission des Fluoreszenzlichtes wird mit einer 1:1-Abbildung bestehend aus zwei UV-geeigneten Objektiven (UV Nikkor, f=105mm; Nikon) auf einen schnellen zeitaufgelösten Bildverstärker (High Rate Imager (HRI); Kentech Instruments) abgebildet. Die Detektion erfolgt mit einer hochempfindlichen CCD-Kamera (Sensicam; PCO). Um störende Reflektionen und Streuung des Anregungslichtes zu unterdrücken, wird ein Fluoreszenzfilter

(300-375nm; Edmund Optics) verwendet, der sich zwischen den beiden Objektiven befindet. Mit Hilfe eines mechanischen Shutters, der zwischen den einzelnen Messungen das Anregungslicht blockiert, wird das Photobleaching der zu untersuchenden Proben auf ein Minimum reduziert [Abbildung 4.3].

Das Neue an dem Setup ist ein Bildverstärker, mit dem zeitaufgelöste Fluoreszenzintensitätsbilder mit einer Gatebreite  $t_g$  zwischen 200ps und 1ns, die mit dem Laserpuls synchronisiert sind, aufgenommen werden können. Die Verzögerung zwischen Laserpuls und Beginn des Gates des Bildverstärkers wird durch einen steuerbaren Delay-Kontroller bestimmt. In den Experimenten wird der Bildverstärker mit einer konstanten Gatebreite  $t_g$  von 300ps und einem Gateabstand  $t_d$  von 900ps betrieben [Abbildung 4.4]. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer werden 10 Bilder mit einem Delay zwischen 0 und 8100ps aufgenommen. Für jedes Bild wird eine Belichtungszeit von 100ms verwendet.



**Abbildung 4.4: Zeitliche Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzlebensdauer messung: Anregungspuls (blau), Fluoreszenzabklingkurve (schwarz) und Zeitfenster des Bildverstärkers (rot).**

Die Steuerung der Kamera, des mechanischen Shutters und des Delay-Kontrollers erfolgt mit Hilfe der Software DaVis (Version 6.2; LaVision). Die weitere Verarbeitung und Auswertung der Daten wird mit MatLab (Version 7.0; MathWorks) durchgeführt.

### 4.2.3 Datenauswertung

Die Daten werden mit einem schnellen, schaltbaren Bildverstärker in Verbindung mit einer sensitiven CCD-Kamera aufgenommen. Bei den Messungen beschränkt man sich auf 10 Bilder, die zu unterschiedlichen Zeiten des Fluoreszenzabklingprozesses nach der Laseranregung aufgenommen werden, um Einflüsse des Photobleachings möglichst gering zu halten. Von den aufgenommenen Bildern wird ein konstanter Offset subtrahiert, um den Einfluss des Hintergrunds zu korrigieren. Die Bilder der stationären Fluoreszenzintensität werden durch Aufsummieren der Einzelbilder der gesamten zeitaufgelösten Serie berechnet.

Um Informationen über die Fluoreszenzlebensdauer zu erhalten, bedient man sich folgender Methoden: Jedes Bild  $i$  kann mit der Zeitinformation  $t_i = i \cdot t_d$  mit  $i = 0 \dots (N-1)$  parametrisiert werden. Jedem Pixel  $(x, y)$  eines Bildes kann eine Decay-Funktion  $D(x, y) = \{d_i(x, y)\} = \{d(t_i; x, y)\}$  zugeordnet werden, wobei  $d_i(x, y)$  für die Fluoreszenzintensität an der Stelle  $(x, y)$  des Bildes  $i$  steht. Das Fluoreszenzabklingverhalten eines Proteins wird üblicherweise durch ein multi-exponentielles Lebensdauer-Modell beschrieben. Dabei nimmt man an, dass jede aromatische Aminosäure mindestens eine charakteristische Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_n$  besitzt. Der Anteil eines jeden Fluorophors an der Gesamtintensität  $I_0$  wird mit  $A_n$  angegeben, so dass sich folgende zeitaufgelöste Intensitätsfunktion ergibt:

$$d(t_i; x, y) = I_0 \cdot \sum_n A_n(x, y) \cdot e^{-\frac{t_i}{\tau_n}} \quad 4.5$$

Jedes Pixel, aber auch ein Ausschnitt eines Bildes, kann dann mit Hilfe eines „nonlinear least-squares curve-fitting“-Algorithmus angefitet werden. Obwohl dies ein exaktes Modell zur Beschreibung des Fluoreszenzabklingverhaltens von Proteinen ist, zeigt sich in der Praxis häufig, dass ein Ansatz mit mehr als zwei Exponenten auf Basis vorhandener Daten nicht zuverlässig, d.h. numerisch instabil, angefitet werden kann. Daher beschränkt man sich meistens auf einen bi-exponentiellen Ansatz.

Aus diesem Grund wird zur Auswertung der Experimente eine alternative Methode genutzt, die eine absolut Modell-freie Beschreibung eines multi-exponentiellen Abklingverhaltens komplexer Proben, wie z.B. Proteine, ermöglicht. Die Decay-

Funktion  $D(x, y)$  lässt sich durch eine „mittlere Lebensdauer“  $\langle T(x, y) \rangle$  beschreiben, für die gilt:

$$\langle T(x, y) \rangle = \frac{\sum_{i=0}^{N-1} t_i \cdot d_i(t_i; x, y)}{\sum_{i=0}^{N-1} d_i(t_i; x, y)} \quad 4.6$$

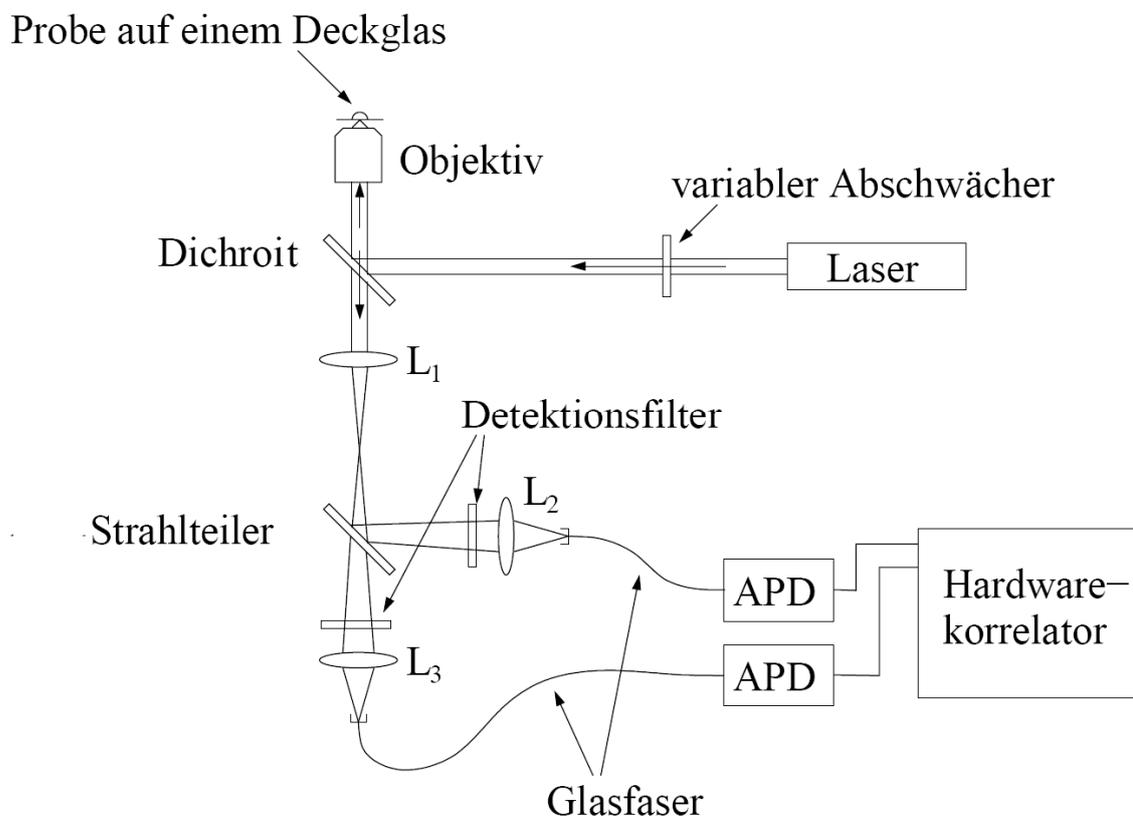
Bei der Berechnung der „mittleren Lebensdauer“ werden keine Informationen über die Gerätefunktion des Bildverstärkers oder des für jede einzelne aromatische Aminosäure zu Grunde liegenden Modells benötigt, was zu einer Vereinfachung der Auswertung von multi-exponentiellen Abklingverhalten führt. Darüber hinaus ist das Modell sehr schnell, weil kein aufwendiger Fit-Algorithmus benutzt wird, und kann in jede Analyse-Software eingebaut werden. Dadurch wird sogar eine Echtzeit-Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer möglich.

## 4.3 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

### 4.3.1 Experimenteller Aufbau

Die Kernkomponente des experimentellen Aufbaus für die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist ein invertiertes Mikroskop (Axiovert 100TV; Zeiss). Dieses ist mit einem 63-fach Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat; Zeiss) mit hoher numerischer Apertur  $NA=1,4$  ausgestattet. Die numerische Apertur bestimmt das Auflösungsvermögen des Objektivs und ist als  $NA = n \cdot \sin \alpha$  definiert. Dabei ist  $n$  der Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit (hier Öl mit  $n=1,52$ ) und  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel. Der Öffnungswinkel bestimmt, wie viele der emittierten Photonen gesammelt werden. Als Anregungsquelle wird ein Helium-Neon-Dauerstrichlaser (High-Power Red Cylindrical Helium-Neon Laser; Coherent) verwendet. Der Laser wird bei der üblichen Wellenlänge von 632,8nm in TEM<sub>00</sub>-Mode betrieben und hat eine maximale Ausgangsleistung von 35mW. Aus dem Absorptionsspektrum des Farbstoffs [Abbildung 2.4] ergibt sich, dass sich der Farbstoff MR121 bei dieser Wellenlänge mit einer Effizienz von ~55% des Absorptionsmaximums anregen lässt. Das

Absorptionsmaximum liegt bei ungefähr 660nm. Für die FCS-Experimente ist eine hohe Stabilität der Laserleistung erforderlich. Der hier verwendete Laser hat beim Leistungsmaximum von 35mW eine Intensitätsschwankung durch Modendrift von 5%. Das Rauschen beträgt im Bereich von 30Hz bis 10MHz weniger als 1%. Das Laserlicht wird durch einen Filter auf 500 $\mu$ W abgeschwächt und über einen dichroitischen Spiegel in das Objektiv eingekoppelt. Durch das Objektiv wird es in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht der Moleküle wird mit demselben Objektiv wieder eingesammelt. Durch den dichroitischen Strahlteiler wird es zusätzlich vom gestreuten Anregungslicht getrennt und auf eine 100 $\mu$ m-Lochblende (Pinhole) abgebildet.



**Abbildung 4.5: Schematischer Aufbau der FCS-Apparatur**

Das Pinhole wirkt als Raumfilter, der nur Licht aus der Fokusregion durchlässt und das Beobachtungsvolumen dadurch auf wenige Femtoliter reduziert. Somit wird das Signal-zu-Rausch Verhältnis signifikant verbessert. Das Fluoreszenzlicht wird über einen Detektionsfilter (HQ700/75) vom Streulicht gefiltert und durch einen nichtpolarisierenden Strahlteiler auf zwei Einzelphotonen-Avalanche-Photodioden (SPCM ARQ-15-FC; PerkinElmer Optoelectronics) aufgeteilt. Die APDs haben eine kreisförmige aktive Fläche von ~175 $\mu$ m Durchmesser. Die maximale Zählrate beträgt 10MHz und die Dunkelzählrate etwa 50Hz. Die Totzeit des Detektors, definiert als

minimale Zeit zwischen zwei detektierbaren Photonen, beträgt 50ns. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon zwei Impulse am Detektor erzeugt (Afterpulsing) liegt bei 0,5%. Die Ausgangssignale der beiden APDs werden in einem Hardwarekorrelator (Ultra-Fast External Multiple Tau Digital Correlator ALV-6010/1608; ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH) kreuzkorreliert. Bei der Korrelationsanalyse wird die Korrelationsfunktion nur für bestimmte diskret verteilte Verzögerungszeiten  $\tau$  berechnet. Diese Verzögerungszeiten lassen sich als Vielfache einer Zeiteinheit  $\Delta\tau$  beschreiben, durch die die zeitliche Auflösung festgelegt wird. Untersucht man verschiedene Kinetiken auf verschiedenen Zeitskalen, muss man über mehrere Größenordnungen der Zeit korrelieren. Um z.B. Kinetiken im Nanosekundenbereich zu untersuchen, darf  $\Delta\tau$  nur wenige Nanosekunden betragen. Wählt man eine lineare Verteilung der Verzögerungsdaten, so nimmt die Berechnung der Korrelationsfunktion sehr viel Zeit in Anspruch, die die Anwendungsmöglichkeiten der FCS einschränken. Einen Ausweg bietet die so genannten Multiple Tau-Methode: Hierbei sind die Verzögerungszeiten in Blöcke unterteilt. Innerhalb jedes Blocks sind die Verzögerungszeiten (Kanäle) linear als Vielfache der Zeiteinheit  $\Delta\tau$  verteilt. Von Block zu Block verdoppelt sich diese Zeiteinheit. Somit erhält man nicht nur ein  $\Delta\tau$ , sondern bis zu 40 verschiedene. Für eine höhere zeitliche Auflösung enthält der erste Block 16 und alle weiteren 8 lineare Kanäle. Der hier verwendete Korrelator arbeitet auf bis zu 40 Blöcken nebeneinander und auf bis zu 328 Kanälen, d.h. die Korrelationszeit wird für 328 verschiedene Verzögerungszeiten berechnet. Die hierbei kleinstmögliche Verzögerungszeit beträgt 6,25ns, wodurch Kinetiken bis in den ns-Bereich untersucht werden können.

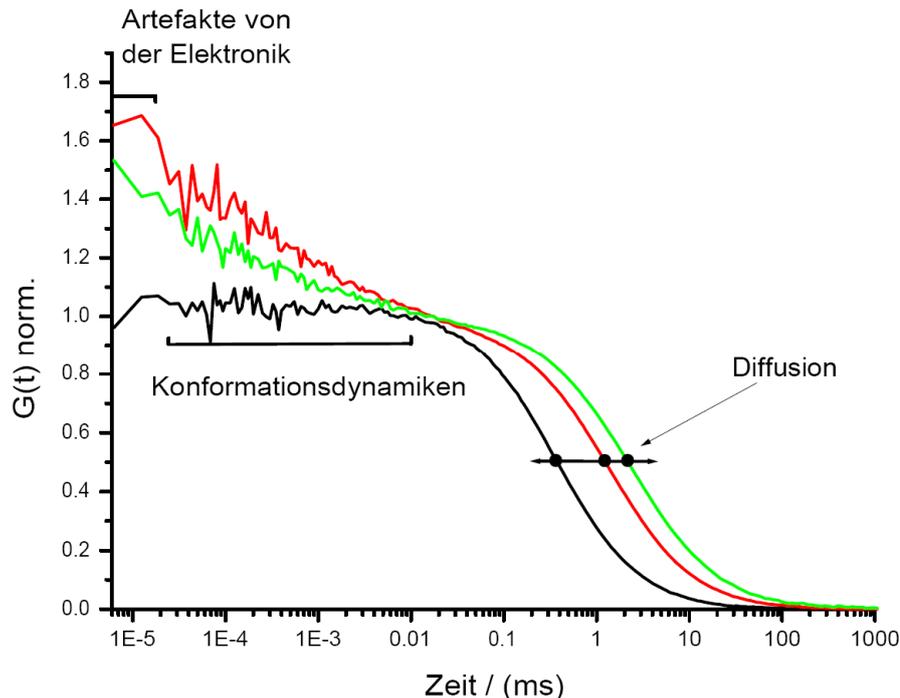
### 4.3.2 Durchführung

Für die Experimente werden die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide ( $10^{-6}\text{M}$ ) auf eine Konzentration von  $10^{-8}\text{M}$  in PBS verdünnt. Für Einzelmessungen werden 100 $\mu\text{l}$  Probelösung, bestehend aus 10 $\mu\text{l}$  Oligonukleotid in  $10^{-8}\text{M}$  Konzentration, 1 $\mu\text{l}$  etwa  $10^{-5}\text{M}$  Protein und 89 $\mu\text{l}$  PBST-BSA (PBS, 0,3mg/ml BSA, 0,05% Tween20), auf einen Muldenobjektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Für Titrationsmessungen werden Kammerdeckgläser (Lab-Tek, 8 Kammern; Nunc) verwendet. Bei einer Titration wird die Konzentration des Oligonukleotids konstant gehalten und die Konzentration des Proteins kontinuierlich verändert. Dazu wird eine

Stammlösung der Oligonukleotide mit einer Konzentration von  $10^{-9}\text{M}$  in PBST-BSA vorbereitet. Es wird mit einem kleinen Probenvolumen und  $10^{-5}\text{M}$  Proteinkonzentration begonnen. Durch Hinzupipettieren der Stammlösung wird das Volumen schrittweise vergrößert und damit die Konzentration des Proteins reduziert. Für die eingestellten Proteinkonzentrationen werden Korrelationskurven aufgenommen. Die Experimente werden am zuvor beschriebenen konfokalen FCS-Aufbau bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zur Vermeidung von Triplettzuständen wird stets eine Anregungsleistung von  $500\mu\text{W}$  verwendet. Um eine hinreichend rauscharme Korrelationsfunktionen zu erhalten, wird eine Messdauer von 1000s gewählt. Durch eine längere Korrelationszeit wird die Statistik für sehr kurze Verzögerungszeiten erhöht.

### 4.3.3 Datenauswertung

Bei der Auswertung der Messdaten in Form einer Korrelationsanalyse wählt man meist eine logarithmische Darstellung der Fluktuationen  $G(\tau)$  in Abhängigkeit von der Korrelationszeit  $\tau$ . Die zwei wesentlichen Charakteristika der Korrelationsfunktion sind die Amplitude  $G(0)$ , die Relaxationszeiten für die Diffusion  $\tau_D$  und die Konformationsdynamik  $\tau_K$  mit Amplitude  $A$ . Die Relaxationszeiten beschreiben die Dauer der Fluktuation und sagen somit etwas über die Dynamik der Moleküle aus. Einerseits kann dies die durch Diffusion beschränkte Aufenthaltsdauer der Moleküle im Beobachtungsvolumen sein, die als Diffusionszeit  $\tau_D$  bezeichnet wird. Die Diffusion durch das vom Versuchsaufbau – insbesondere vom Objektiv – vorgegebene Beobachtungsvolumen findet auf einer Millisekundenzeitskala statt. Andererseits kann die Korrelationsfunktion auch über verschiedene kinetische Parameter der Moleküle Auskunft geben, sofern dies innerhalb der Zeitauflösung des Systems liegt und messtechnisch aufgelöst werden können. In den folgenden Untersuchungen erfolgt eine Löschkinetik des Farbstoffes, die im (Sub-)Mikrosekundenbereich zu beobachten ist. Die Amplitude  $G(0)$  ist ein Maß für die relative Stärke der Fluktuation im zeitlichen Mittel. Je kleiner das beobachtete Volumenelement, desto größer ist sie. Bei einem festen Beobachtungsvolumen ist die Amplitude ein Maß für die mittlere Konzentration der Moleküle und entspricht dem Reziproken der Molekülanzahl.



**Abbildung 4.6:** Korrelierte Fluoreszenzfluktuation vom freien Farbstoff MR121 (schwarz), von farbstoffmarkierter RNA (rot) bzw. RNA-Protein-Komplexen (grün).

Befindet sich nur freier Farbstoff MR121 in der Lösung, kann dieser nicht gelöscht werden [Abbildung 4.6 schwarz]. Die Fluoreszenzfluktuation resultiert somit nur aus der Diffusion der Moleküle und evtl. aus Tripletzuständen. Bindet der Farbstoff an eine Nukleinsäurekette, nehmen die Masse und damit auch der hydrodynamische Radius zu, was zu einer Diffusionszeitverlängerung führt. Zudem kann MR121 an dem in der RNA/DNA-Sequenz enthaltenen Guanosin gelöscht werden, was eine zusätzliche Fluoreszenzfluktuation verursacht [Abbildung 4.6 rot]. Bindet an diesen Komplex das Protein AtGRP7, verlängert sich die Diffusionszeit erneut und die Konformationsdynamik, also die Löschkinetik, ändert sich [Abbildung 4.6 grün].

Im einfachsten Fall des freien Farbstoffs können die gemessenen Daten durch ein Modell frei diffundierender Moleküle ohne zusätzliche Dynamik beschrieben werden. Da es sich um einen konfokalen Aufbau handelt, kann das Modell auf eine zweidimensionale Diffusion reduziert werden:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \quad 4.7$$

Dabei ist  $N$  die Anzahl der Moleküle im und  $\tau_D$  die Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen. Ist der Farbstoff an eine Nukleinsäurekette gebunden, die ein Guanosin enthält, kann der Farbstoff gelöscht werden. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs wird dann mit entsprechenden Raten gelöscht, die zusätzliche Fluktuationen im Bereich von 100ns verursacht. Das Modell der frei diffundierenden Moleküle wird um den Term zur Beschreibung dieser Fluoreszenzlöschkinetik erweitert. Man erhält:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + K \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_K}} \right) \quad 4.8$$

Im Allgemeinen – gerade bei längeren Sequenzen – kann ein Oligonukleotid mehr als nur ein Guanosin enthalten, an dem der Farbstoff mit der entsprechenden Rate gelöscht wird. Für jeden der Löschprozesse nimmt die Fluoreszenzintensität exponentiell ab. Diese Relaxationsprozesse finden auf gleicher Zeitskala mit der unbekanntenen Verteilung  $\rho(\tau_K)$  der Relaxationszeiten statt. Sind diese Relaxationsprozesse unabhängig voneinander, kann die resultierende Löschkinetik als Superposition der einzelnen Relaxationsprozesse geschrieben werden:

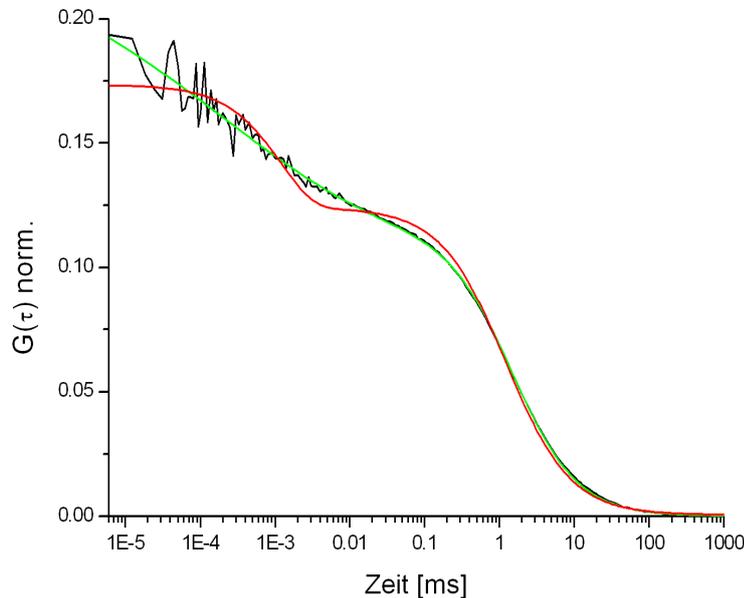
$$\phi(t) \approx e^{-\left(\frac{t}{\tau_K}\right)^\beta} = \int_0^\infty e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)} \rho(\tau) d\tau \quad 4.9$$

wobei  $\tau_K$  die charakteristische Zeit der Gesamtlöschkinetik und  $\beta$  ein Parameter zwischen 0 und 1 ist. Der rechte Teil der Gleichung wird als Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) Gleichung bezeichnet und ist eher bekannt als „stretched exponential“ [82, 83]. Damit wird [Gleichung 4.8] umgeschrieben zu:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + K \cdot e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_K}\right)^\beta} \right) \quad 4.10$$

Der Parameter  $\beta$  hat zunächst keine direkte relevante physikalische Bedeutung, sondern gibt nur eine Breite der Verteilung von  $\tau$  an. Je kleiner  $\beta$  ist, desto breiter ist die Verteilung. Er spiegelt somit lediglich die Inhomogenität der Löschung in Form

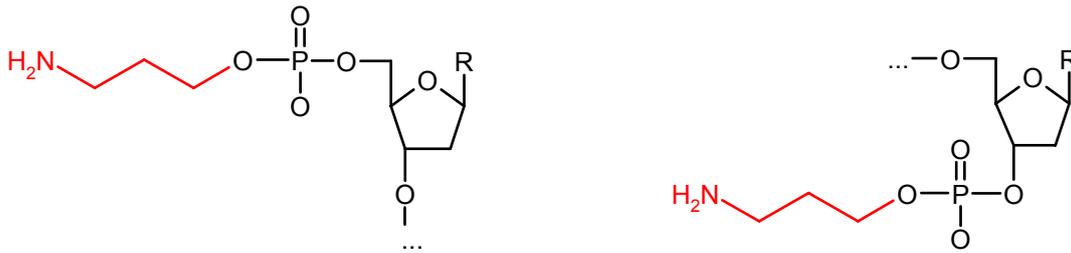
einer Breite der Verteilung wider. Der Einfluss des  $\beta$ -Parameters und die Qualität der Fitfunktionen sind in [Abbildung 4.7] dargestellt.



**Abbildung 4.7:** Die korrelierten Fluoreszenzfluktuationen (schwarz) lassen sich mit einem so genannten „stretched-exponential“ Modell (grün) besser fiten als mit dem üblichen exponentiellen Ansatz (rot).

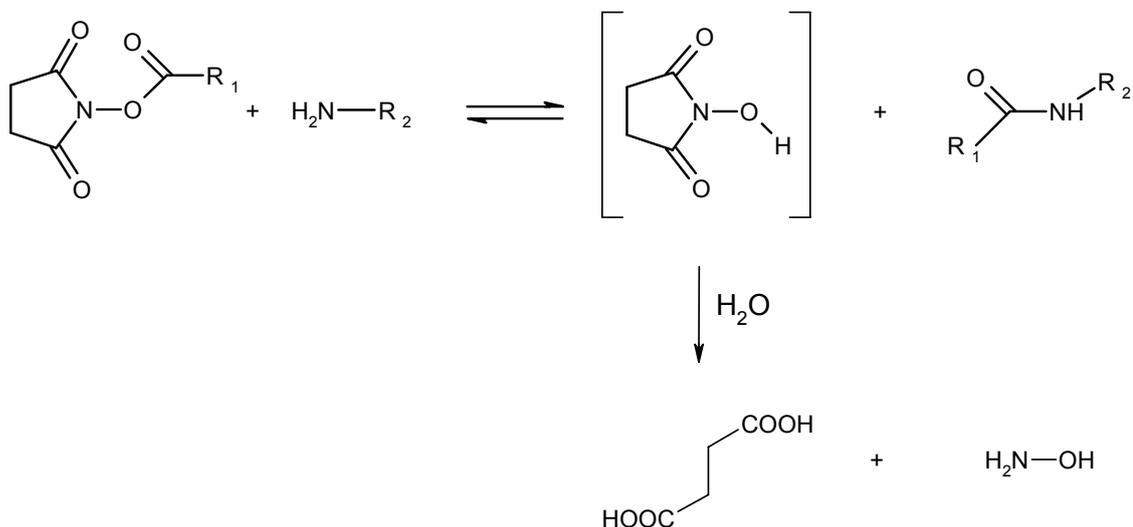
#### ***4.4 Modifikation von Oligonukleotiden mit organischen Farbstoffen***

Die für die Bindungsstudien benötigten Oligonukleotide werden bei den Firmen IBA (IBA GmbH) oder biomers (biomers.net GmbH) durch Festphasensynthese hergestellt. Bei der Synthese wird bereits eine aliphatische Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ) am 3'- oder 5'-Ende des Oligonukleotids angefügt [Abbildung 4.8]. Diese als Aminolink bezeichnete reaktive Gruppe verfügt zusätzlich über einen C3-Linker, der die Verbindung zum Molekül darstellt. Die Aminogruppe bietet die Möglichkeit, über eine Amidbindung verschiedene weitere Moleküle, wie beispielsweise Farbstoffe, kovalent an das Molekül zu binden.



**Abbildung 4.8:** C3-Aminolink (rot) am 5'-Ende (links) und am 3'-Ende (rechts) eines Nukleotids.

Viele organische Fluorophore mit einer reaktiven funktionellen Gruppe sind bereits kommerziell erhältlich. Diese können an ein anderes Molekül mit Hilfe einer weiteren entsprechenden funktionellen Gruppe kovalent gebunden werden. Man unterscheidet zwei Klassen von chemischen Modifikationen: Zum einen gibt es Farbstoffe, die einen N-Hydroxysuccinimidyl-Ester (NHS-Gruppe) beinhalten. Diese binden an primäre Amine wie sie bei Proteinen oder entsprechend modifizierten Oligonukleotiden vorkommen. Die Aminosäure Lysin beispielsweise besitzt ebenfalls eine entsprechende Aminogruppe. Zum anderen binden Maleimid-Gruppen an Thiole (SH-Gruppe), wie sie z.B. in der Aminosäure Cystein vorkommt.



**Abbildung 4.9:** Chemische Reaktion der Kopplung eines NHS-Esters an einen Aminolink.

An der Carbonsäureester-Gruppe wird ein Nukleophil, ein Elektronenpaardonor, ersetzt. Dadurch kann der Farbstoff ( $R_1$ ) an ein Aminolink zusammen mit dem gewünschten Molekül ( $R_2$ ), z.B. ein Oligonukleotid, gekoppelt werden. Durch diese Reaktion entstehen ein labiles N-Hydroxysuccinimid, das in wässriger Lösung weiter

zerfällt, und ein Komplex bestehend aus dem Zielmolekül und dem Farbstoff. Die Reaktion ist reversibel, so dass sich zwischen den beiden Zuständen ein Gleichgewicht einstellt. Da aber das N-Hydroxysuccinimid in wässriger Lösung weiter zerfällt, ist eine Rückreaktion nicht mehr möglich. Die beschriebene nukleophile Substitution am NHS-Ester wird durch eine leicht basische Umgebung katalysiert, die bei pH ~8,3 optimal stattfindet.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Oligonukleotide verwendet, die mit einem C3-Aminolinker modifiziert sind. Die Nukleotide werden mit dem Farbstoff MR121, der einen reaktiven NHS-Ester enthält, fluoreszenzmarkiert. Anschließend wird die Probe mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography; 1100 Series, Agilent) aufgereinigt. Die Aminogruppe darf nicht protoniert sein, damit sie reaktiv ist und für eine Kopplung zur Verfügung steht. Um eine hohe Konzentration unprotonierter Aminogruppen zu erreichen, muss der pH der Lösung entsprechend erhöht werden. Als konkurrierender Prozess zur eigentlichen Kopplung kann der NHS-Ester hydrolysieren und dadurch nicht mehr für eine Kopplung zur Verfügung stehen. Um eine hohe Koppeffizienz zu erreichen, muss die freie Weglänge zwischen Farbstoff und Oligonukleotid klein sein. Darüber hinaus wird Farbstoff im 3-fachen Überschuss hinzu gegeben. Da die Rate der Hydrolyse des NHS-Esters ebenfalls mit der Konzentration der Hydroxylionen ansteigt, sollte der pH-Wert der Reaktionslösung nicht zu hoch liegen.

Eine gepufferte Lösung mit pH 8,3 hat sich als guter Kompromiss zwischen beiden Prozessen erwiesen. Die Farbstoffmarkierung einzelsträngiger Oligonukleotide mit NHS-MR121 wird demnach mit dem folgenden Protokoll durchgeführt:

10nmol	Oligonukleotid (in Lösung, $10^{-4}$ M)
30 $\mu$ l	PBS
10 $\mu$ l	100 mM Natriumhydrogenkarbonatpuffer (pH 9,0)
30nmol	Farbstoff (in DMF (Fluka) gelöst)

Die Chemikalien werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für ungefähr 1-2 Stunden geschüttelt. Anschließend wird die Probe über HPLC mittels einer „reversed phase“ C18-Säule aufgereinigt. Dazu wird ein 20-minütiger Gradient zwischen zwei Lösungsmitteln A (wässrige Phase) und B (organische Phase) gefahren:

Lösungsmittel A	0,1M Triethylammoniumacetat (TEAA) in Wasser
Lösungsmittel B	0,1M TEAA in 75% Acetonitril und 25% Wasser

Anschließend wird das Lösungsmittel durch Vakuumzentrifugation entzogen.

## **5 Ergebnisse und Diskussion**

### ***5.1 Untersuchung der nativen UV-Fluoreszenzlebensdauer von Biomolekülen***

Im Folgenden soll nun der Aufbau eines hochempfindlichen Setups zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern biologischer Proben, wie z.B. Aminosäuren und Proteinen, beschrieben werden. Es sollen ausschließlich native Fluoreszenzlebensdauern gemessen werden, die ein Anfärben der Probe überflüssig machen. In den Versuchen soll eine bildgebende CCD-Kamera zum Einsatz kommen, die es ermöglicht, einen Messbereich von 1cm x 1cm zu erfassen. Dadurch soll eine schnelle, gleichzeitige Detektion mehrerer Proben – wie sie z.B. beim Auslesen von Microarrays notwendig ist – ermöglicht werden. Ziel der Versuche ist es, einen heterogenen Assay zu entwickeln, der Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen markierungsfrei durch Änderung der Fluoreszenzlebensdauer nachweisen kann. Der Aufbau soll zunächst mit einer Messreihe Tryptophan in wässrigen Lösungen unterschiedlicher pH-Werte getestet werden. Danach folgen Untersuchungen zur Konformationsänderung von Proteinen und damit verbundenen Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer am Beispiel von menschlichem Serumalbumin. Abschließend soll eine Machbarkeitsstudie im Nachweis von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen erbracht werden.

#### **5.1.1 Einfluss von Photobleaching**

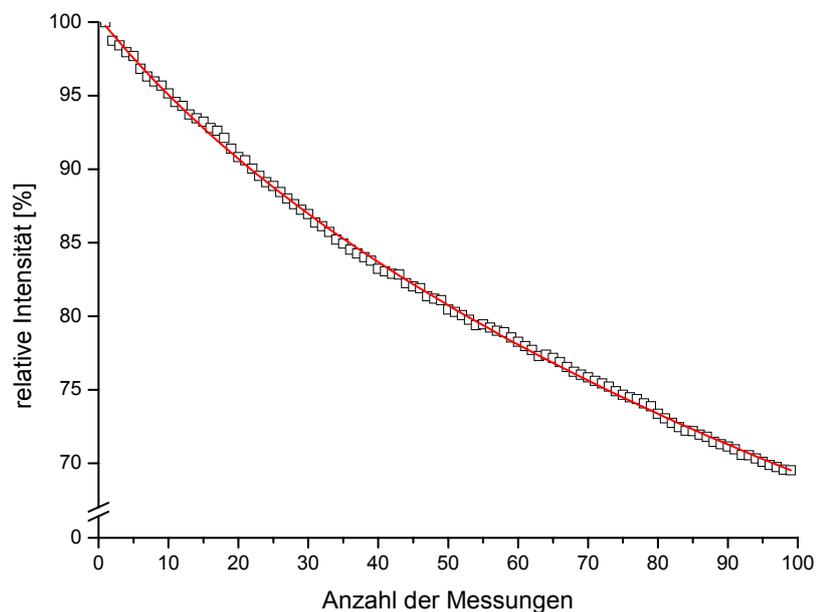
Sowohl der Farbstoff MR121 wie auch die hier verwendeten aromatischen Aminosäuren können bei wiederholter Anregung eine Verminderung der Fluoreszenzintensität zeigen. Insbesondere zeigt sich dieser Effekt, wenn sie mit sehr hoher Leistung angeregt werden. Dieser Prozess wird als Photozerstörung oder Photobleichen („Photobleaching“) bezeichnet, womit alle Photoreaktionen zusammengefasst werden, die ein Fluorophor aus dem angeregten Zustand in einen irreversiblen Dunkelzustand überführen. Ursache dafür ist eine Zerstörung des chromophoren Systems durch photochemische Reaktionen, wie z.B. die Bildung von

Radikalen oder Ionen. Dabei kommt es zur wiederholten Anregung eines Schwingungsniveaus mit so hoher Energie, dass die Bindungen des Moleküls aufgebrochen werden können. Zusätzlich kann das chromophore System auch durch Oxidation durch Sauerstoff zerstört werden.

Meistens ist Photobleaching unerwünscht, weil dadurch das Fluoreszenzsignal vermindert und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtert wird. Bei manchen Techniken der Mikroskopie wird der Prozess der Photozerstörung aber auch ausgenutzt, um die Fluoreszenz in einem definierten Bereich zu minimieren. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) bezeichnet die Regenerierung der Fluoreszenz in diesem Probenbereich durch Diffusions-, Transport- oder andere Bewegungen unzerstörter Fluorophore aus der Umgebung in den gebleichten Bereich. Dadurch kann beispielsweise die Mobilität von Molekülen in Membranen oder lebenden Zellen nachgewiesen werden [84-86].

Die aromatischen Aminosäuren sind jedoch – verglichen mit konventionellen Farbstoffen – photophysikalisch und photochemisch sehr instabil. Dies liegt zum einen an der chemischen Struktur, zum anderen an der Anregung mit energiereichem UV-Licht. Insbesondere bei hoher Anregungsleistung kommt es verstärkt zu photochemischen Reaktionen, wie z.B. Photodissoziation oder -oxidation. Bei den UV-FLIM-Experimenten in dieser Arbeit werden Proteine mit einer Durchschnittsleistung von 120mW angeregt. Auf Grund der gepulsten Anregung bei 280nm mit einer Pulsbreite von 150fs und einer Repetitionsrate von 80MHz ergibt sich eine Spitzenleistung von mehr als 10kW mit einer Energie von 1,5nJ pro Puls. Obwohl die Energie eines einzigen Laserpulses sehr gering ist, werden hohen Spitzenleistungen erreicht, die zu einer Photodissoziation führen. Bleaching führt zu Messartefakten, die sich beispielsweise in einer zusätzlichen Decay-Komponente der Fluoreszenzlebensdauer widerspiegeln können. Dadurch wird die Messgenauigkeit beeinträchtigt, was sich gerade bei längeren Decay-Komponenten besonders bemerkbar macht. Um den Einfluss von Bleaching möglichst gering zu halten, wird ein mechanischer Shutter in den Strahlengang eingebaut, der die zu untersuchende Probe vor UV-Strahlung schützt, die für die Messung unnötig ist, aber z.B. beim Verschieben des Gates auftritt. Darüber hinaus kann Bleaching generell durch eine geringe Anzahl von Messungen mit einer kurzen Belichtungszeit pro Messung reduziert werden.

Bei dem hier verwendeten UV-FLIM-Versuchsaufbau kann der Messfehler durch Bleaching auf weniger als 5% reduziert werden, wenn maximal 10 Messungen mit einer Belichtungszeit von 100ms pro Messung durchgeführt werden. Eine Referenzmessung einer Proteinprobe (BSA) [Abbildung 5.1] macht deutlich, dass bei dieser Anzahl von Messungen nur 5% Intensitätsverlust durch Bleaching zu erwarten ist. Dadurch sind aussagekräftige, reproduzierbare Lebensdauerermessungen möglich, bei denen man allerdings in Kauf nehmen muss, Abklingzeiten mit geringen Amplituden nicht auflösen zu können.



**Abbildung 5.1:** Normierte Referenzmessung einer Proteinprobe (BSA) in PBS zur Bestimmung des Einflusses von Photodissoziation auf die Fluoreszenzintensität. Die Anregung erfolgte mit  $20\text{mW/cm}^2$  und einer Belichtungszeit von 100ms. Nach 10 Messungen ist die Intensität auf 95% der Ursprungsintensität zurückgegangen, nach 100 Messungen ist noch ca. 70% der ursprünglichen Intensität vorhanden.

## ***5.2 Fluoreszenzlebensdauer von Tryptophan in Abhängigkeit vom pH-Wert***

Ziel der Versuchsreihe ist es, den Versuchsaufbau zu testen und die Messdaten dabei mit einem etablierten System zu vergleichen. Dazu beschränkt man sich auf ein

möglichst einfaches, bereits erforschtes Testsystem, das als Referenz dient. Erste Fluoreszenzlebensdaueruntersuchungen an Aminosäuren wurden auf Grund der Bedeutung nativer Fluoreszenz von Proteinen an der Aminosäure Tryptophan durchgeführt. Im Vordergrund standen dabei Untersuchungen des Einflusses von pH-Wert und Temperatur auf die Fluoreszenz. Bereits 1959 untersuchte White die Abhängigkeit der Quanteneffizienz von Tryptophan vom pH-Wert des Lösungsmittels [87]. 1970 folgten die ersten Experimente mit gepulster Anregung zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer [88] – ebenfalls in Abhängigkeit vom pH-Wert. Weitere Untersuchungen im Jahre 1979 ergaben, dass Tryptophan selbst bei neutralem pH-Wert kein mono-exponentielles Abklingverhalten zeigt, sondern zusätzlich eine kurze Komponente, die bei ungefähr 0,5ns liegt, zu beobachten ist [89]. Diese Komponente ist auf die Existenz verschiedener Rotationsisomere (Rotamere) zurückzuführen [89, 90]: In Lösung kann die Seitenkette des Tryptophans verschiedene Konformationen annehmen, die – verglichen mit der Fluoreszenzlebensdauer – nur sehr langsam, genauer gesagt auf einer ns-Zeitskala, ineinander übergehen. Einer dieser Konformationen wird die zusätzliche kurze Komponente zugeschrieben, wodurch das Auftreten zweier Lebensdauerkomponenten von Tryptophan in wässriger Lösung beobachtet wird. Auf der Grundlage der vorhandenen Literatur und der Eigenschaft der kleinsten fluoreszierenden Einheit eines Proteins, werden im Folgenden die Aminosäure Tryptophan sowie deren pH-Abhängigkeit betrachtet. Mit diesem Modell sollen die Möglichkeiten und Grenzen des in den Experimenten verwendeten Aufbaus untersucht werden. Gleichzeitig kann der Aufbau dadurch validiert und optimiert werden.

Es werden 10mM Tryptophan in PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl; Fluka, 79382) gelöst, und die Lösung wird auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Folgende pH-Werte stehen zur Verfügung: 1,56; 2,65; 3,68; 4,71; 5,93; 6,96; 7,51; 8,47; 9,45; 10,53; 13,02. Für die Fluoreszenzlebensdauermessungen wird eine 1mm dicke hydrophobe Silikonmatte (Press-to-Seal; Invitrogen), in die 12 Löcher mit 2mm Durchmesser gestanzt werden, auf das Glassubstrat gepresst. Dadurch entstehen Probenkammern, die ca. 3µl Flüssigkeit aufnehmen können. Diese werden mit jeweils 2,5µl Tryptophan-Lösung unterschiedlichen pH-Wertes befüllt. In 3 Messungen werden danach 4 Probenkammern in einer Messung nach dem vorgestellten Verfahren untersucht. Zusätzlich wird von den Proben mit einem kommerziell erhältlichen Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse; Varian) ein Emissionsspektrum aufgenommen, um weitere spektroskopische Parameter zu erhalten und diese mit den Ergebnissen der

Fluoreszenzlebensdauermessungen vergleichen zu können. Dazu werden 50µl Tryptophan in wässriger Lösung mit unterschiedlichem pH in eine UV-geeignete Küvette aus dem Quarzglas Suprasil (105.251 QS; Hellma) gefüllt. Entsprechend der Anregungswellenlänge bei den Fluoreszenzlebensdauermessungen wird auch bei den Messungen der stationären Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzspektrometer Anregungslicht der Wellenlänge 280nm verwendet. Wegen der verwendeten Lichtquelle und der Arbeitsweise des Gerätes ist das Licht nicht monochromatisch, sondern hat eine Bandbreite von 5nm. Die Detektion im Bereich von 290 bis 550nm erfolgt ebenfalls mit einem 5nm-Fenster. Die Spannung der Photomultipliertube im Gerät wird so eingestellt, dass alle Spektren in dem Dynamikbereich des Spektrometers vermessen werden können.

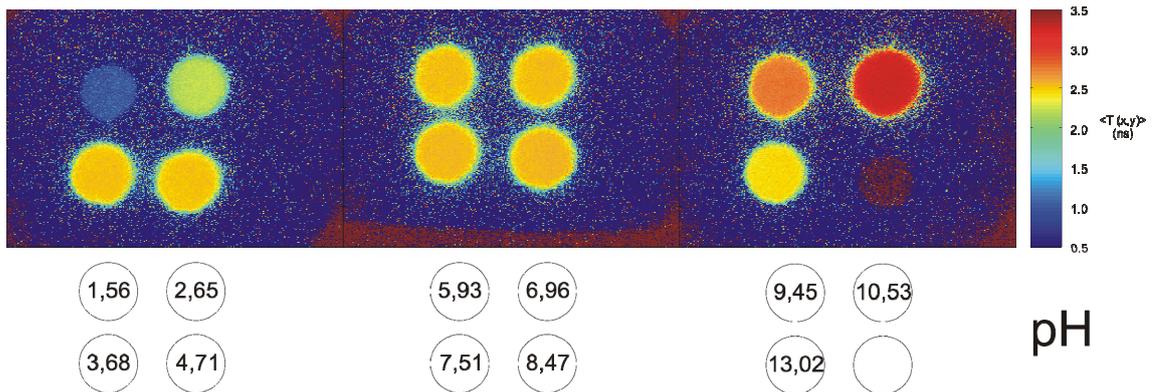
Aus den Messdaten wird die mittlere Lebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  berechnet, die in Falschfarben dargestellt werden kann [Abbildung 5.2]. Für den mittleren pH-Bereich zwischen 5,93 und 8,47 erfolgt eine zusätzliche Darstellung mit einer angepassten Farbskalierung zwischen 2,46 und 2,56ns [Abbildung 5.3]. In jedem Spot wird eine rechteckige „Area of Interest“ definiert, deren Ecken auf dem Umfang des Spots liegen und somit fast den gesamten Spot umfassen. Dabei ist ein Rauschen von  $\pm 5$ ps pro Pixel zu berücksichtigen. Da sich aber innerhalb der auszuwertenden „Area of Interest“ ungefähr 1000 Pixel befinden, kann das Rauschen durch Mittelwertbildung auf unter 1ps reduziert werden. Es spielt daher für die weitere Auswertung keine Rolle. Die aus jedem Spot berechnete mittlere Lebensdauer  $\langle T \rangle$  ist in [Tabelle 2] dargestellt. Das Fluoreszenzabklingverhalten wird darüber hinaus mit einem bi-exponentiellen Modell gefittet:

$$d(t_i) = I_0 \cdot \left( A_1 \cdot e^{-\frac{t_i}{\tau_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t_i}{\tau_2}} \right) \quad 5.1$$

Dazu wird die Intensität der zuvor gewählten Area of Interest für jedes Bild der Bilderserie gemittelt und anschließend entsprechend gefittet. Eine Übersicht über die so erhaltenen Parameter  $A$  und  $\tau$  befindet sich in ebenfalls in [Tabelle 2].

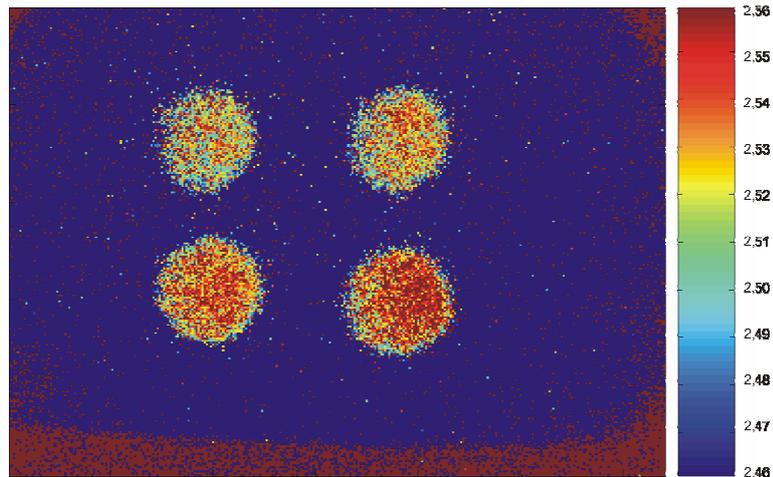
Die mit dem Fluoreszenzspektrometer aufgenommenen Spektren sind in [Abbildung 5.5] dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wird zum einen hinsichtlich der Gesamtintensität in dem Wellenlängenbereich von 300 bis 550nm, zum anderen

hinsichtlich des Wellenlängenbereiches, der auf Grund der verwendeten Emissionsfilter bei den Lebensdauermessungen zur Verfügung stand (300-375nm), ausgewertet. [Abbildung 5.4] zeigt sowohl die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T \rangle$  wie auch die berechneten stationären Fluoreszenzintensitäten. Weil sich die Form des Emissionsspektrums in dem untersuchten pH-Bereich stark ändert, ist in [Tabelle 2] zusätzlich noch die Wellenlänge des Emissionsmaximums angegeben.



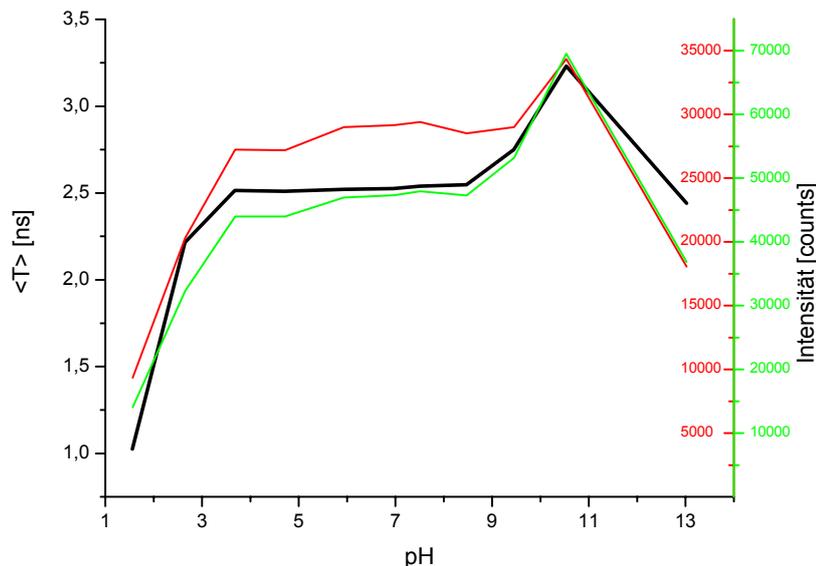
**Abbildung 5.2: Falschfarbendarstellung der mittleren Lebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  von Tryptophan in Abhängigkeit vom pH-Wert der PBS-Lösung. In der unteren rechten Kammer befindet sich keine Probe.**

In [Abbildung 5.2] lassen sich bereits deutliche Unterschiede der mittleren Fluoreszenzlebensdauern des Tryptophans bei unterschiedlichem pH-Wert erkennen. Diese variieren zwischen ca. 1,0 und 3,2ns. Die Schwankung der Lebensdauer innerhalb einer Probenkammer ist äußerst gering. Die Lebensdauer des Tryptophans lässt sich deutlich von der Umgebung differenzieren. Die umgebende Silikonmatte hat eine kurze Lebensdauer und erscheint daher in der Falschfarbendarstellung dunkelblau. Für das darunter befindliche Glassubstrat, das neben der Silikonmatte und in der leeren Probenkammer zu erkennen, erhält man eine Lebensdauer von mehr als 3,5ns. Da das Substrat aber nur sehr schwach fluoresziert, ist der Störeinfluss gering und für weitere Untersuchungen nicht relevant.



**Abbildung 5.3:** Darstellung der mittleren Lebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  von Tryptophan für pH 5,93; 6,96; 7,51; 8,47 mit einer Falschfarbenskala zwischen 2,46 und 2,56ns.

Wie in [Abbildung 5.3] zu erkennen ist, lassen sich bei geeigneter Wahl der Falschfarbendarstellung sogar noch geringste Lebensdauerunterschiede, die im Bereich von 10ps liegen, auflösen. Die berechneten Werte schwanken in einem Spot um  $\sim 0,02\text{ns}$  und lassen somit sehr exakte Messungen noch kleinster Lebensdaueränderungen zu. Das Rauschen kann durch Mittelung über mehrere Pixel weiter reduziert werden.

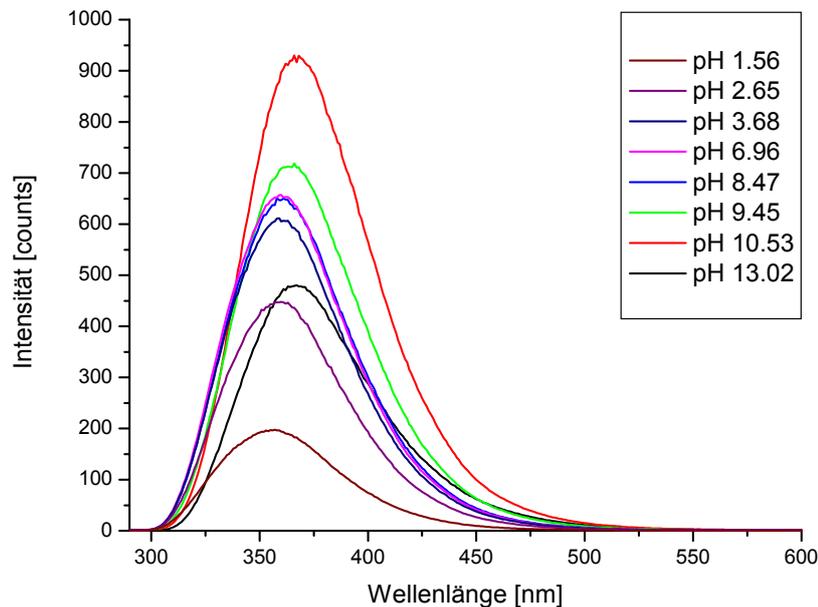


**Abbildung 5.4:** Mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T \rangle$  (schwarz) und stationäre Intensität von Tryptophan im Bereich von 300nm bis 375nm (rot), sowie von 300nm bis 550nm (grün).

Die in einem Spot gemessenen mittleren Lebensdauern  $\langle T \rangle$  sind in [Abbildung 5.4] und [Tabelle 2] dargestellt. Sie zeigen zwischen pH 1,5 bis 3,5 einen Anstieg von 1,03 auf 2,53ns. Er folgt ein deutliches Plateau bis ca. pH 8,5. Das Maximum mit einer Lebensdauer von 3,23ns wird für pH 10,5 erreicht, bevor sie auf 2,44ns abfällt. Einen parallelen Verlauf zeigt die stationäre Fluoreszenzintensität sowohl im Wellenlängenbereich zwischen 300nm und 375nm, als auch zwischen 300nm und 550nm: Von pH 1,5 bis 3,5 steigt die Fluoreszenzintensität von Tryptophan auf das 2- bis 3-fache an, die bis ca. pH 8,5 nahezu konstant ist. Zwischen pH 8,5 und 10,5 nimmt die Intensität weiter zu und fällt bei pH 13 unter das vorherige Niveau ab. Die gemessenen stationären Intensitäten stimmen mit den Referenzergebnissen von [87] überein. Der Anstieg der Fluoreszenz im Bereich um pH 11 ist zwar etwas geringer, lässt sich aber mit der groben Auflösung der pH-Werte bei der hier durchgeführten Messung erklären, mit der das Maximum nicht exakt aufgelöst werden kann. Entscheidend ist jedoch, dass die mittlere Lebensdauer  $\langle T \rangle$  bei den untersuchten pH-Werten der Tryptophan-Lösung eine gute Korrelation mit der stationären Intensität zeigt und ebenfalls mit früheren Untersuchungen von [91] übereinstimmt. Besonders der Bereich zwischen pH 3,5 und 8,5 lässt sich durch Fluoreszenzlebensdauer-messungen gut mit den Referenzen in Einklang bringen, weil die Bestimmung der Lebensdauer unabhängig von der Konzentration ist und leichte Konzentrationsungenauigkeiten keinen Einfluss auf das Messergebnis haben.

pH	$\tau_1$ [ns]	$A_1$	$\tau_2$ [ns]	$A_2$	$\langle T \rangle$ [ns]	$\lambda_{\max}$ [nm]
<b>1,56</b>	0,880	0,74	1,560	0,26	1,025	357
<b>2,65</b>	0,640	0,29	2,663	0,71	2,215	360
<b>3,68</b>	0,697	0,17	3,008	0,83	2,515	359
<b>4,71</b>	0,543	0,19	2,991	0,81	2,509	361
<b>5,93</b>	0,644	0,17	3,030	0,83	2,522	359
<b>6,96</b>	0,576	0,19	3,036	0,81	2,525	360
<b>7,51</b>	0,687	0,17	3,067	0,83	2,539	359
<b>8,47</b>	0,535	0,22	3,103	0,78	2,548	357
<b>9,45</b>	0,999	0,25	3,728	0,75	2,749	366
<b>10,53</b>	1,214	0,24	5,626	0,76	3,232	366
<b>13,02</b>	0,727	0,06	2,681	0,94	2,441	367

**Tabelle 2: UV-Fluoreszenzlebensdauern von Tryptophan bei unterschiedlichen pH-Werten: Angegeben sind die Lebensdauern und Amplituden, die mittels eines bi-exponentiellen Fit-Modells ermittelt wurden, sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T \rangle$  eines Spots.  $\lambda_{\max}$  gibt das Emissionsmaximum der stationären Fluoreszenz an.**



**Abbildung 5.5: Spektrum der stationären Fluoreszenzintensität von Tryptophan bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen mit einem Fluoreszenzspektrometer. Anregung bei 280nm, Detektion von 290 bis 600nm.**

Neben dem Anstieg der Fluoreszenzintensität und der -lebensdauer mit steigendem pH-Wert ist in [Abbildung 5.5] auch eine geringe Verschiebung der Wellenlänge des Emissionsmaximums zu beobachten, die in [Tabelle 2] dargestellt ist. Das Maximum der Fluoreszenzemission verschiebt sich lediglich bei pH-Werten > 9,5. In diesem Bereich ist eine Verschiebung um 7nm in den längerwelligen Bereich zu beobachten. Sie ist aber nicht aussagekräftig, weil sie mit dem Verlauf der stationären Intensität bzw. der Fluoreszenzlebensdauer nicht korreliert.

Um genauere Informationen über das Fluoreszenzabklingverhalten zu erhalten, werden die Messdaten mit einem bi-exponentiellen Modell angefitet. Die Daten lassen sich mit einem tri-exponentiellen Modell nur unzureichend beschreiben. Die Anwendung zweier Exponenten erweist sich als stabil und liefert für Tryptophan in einer neutralen PBS-Lösung eine lange Lebensdauer von ca. 3ns, was ebenfalls mit früheren Ergebnissen übereinstimmt. Darüber hinaus lässt sich auch die kürzere Decay-Komponente (0,5ns) auflösen, deren Anteil an der Gesamtintensität im Bereich zwischen pH 3,68 und 8,47 ungefähr 18% beträgt. Im sauren Bereich überwiegt sie mit 74%, während sie für sehr basische Lösungen fast völlig verschwindet. Gleichzeitig

wird aber auch die Zeit der langen Komponente kürzer. Aus der Ratengleichung ergibt sich, dass eine geringere Intensität sowie eine kürzere Lebensdauer gleichbedeutend mit einem strahlungslosen Übergang ist, der Fluoreszenzlöschung widerspiegeln kann. Um den Einfluss des pH-Wertes des Lösungsmittels auf die Tryptophanfluoreszenz zu erklären, reduziert man die Betrachtungen im Wesentlichen auf die Amino- bzw. Carboxylgruppe. In neutraler wässriger Lösung liegt Tryptophan zwar neutral, aber als Zwitterion vor: Die Aminogruppe ist protoniert ( $-\text{NH}_3^+$ ) mit  $\text{pK}_{\text{a}1} = 2,38$  und die Carboxylgruppe ionisiert ( $-\text{COO}^-$ ) mit  $\text{pK}_{\text{a}2} = 9,34$ . Man weiß, dass sich die Fluoreszenz des Indolrings sehr leicht durch Elektronentransfer löschen lässt. Als gute Löscher sind z.B. Acrylamid, Ammonium, Tyrosine, Disulfide, Peptidbindungen oder Radikalfänger bekannt. Daher kann die Fluoreszenz von Tryptophan in Lösung sogar intramolekular durch eine positiv geladene Ammoniumgruppe gelöscht werden. Dieser Prozess wird durch die Ergebnisse deutlich und soll im Folgenden detailliert dargestellt werden: Von ca. pH 8,5 bis pH 10,5 ist ein Anstieg der Fluoreszenz und der -lebensdauer zu beobachten. Bei diesem pH-Wert dissoziiert die protonierte Aminogruppe zu der neutralen Form  $-\text{NH}_2$  und steht nicht mehr als Elektronenakzeptor und somit auch nicht mehr als Quencher zur Verfügung [92, 93]. Das 3-Methylindol, das zum Tryptophan bis auf die fehlende Aminogruppe identisch ist, zeigt keinen pH-abhängigen Anstieg der Fluoreszenz [90]. Bei niedrigem pH (unter ca. pH 3,5) ist ein Abfall der Fluoreszenz und der Lebensdauer zu beobachten, was auf einen intramolekularen Quenchingprozess hindeutet. Dieser wird durch die neutrale Carboxylgruppe  $-\text{COOH}$  verursacht, die nun als Elektronenakzeptor fungiert. Auffällig ist jedoch, dass auch bei sehr hohem pH (größer als pH 11) ein erneuter Rückgang der Fluoreszenz(-lebensdauer) erfolgt. Auch hier vermutet man, dass der Indolring durch Hydroxylgruppen, d.h. durch Kollision mit  $\text{OH}^-$  oder Deprotonierung des Stickstoffs des angeregten Indols, gequencht wird.

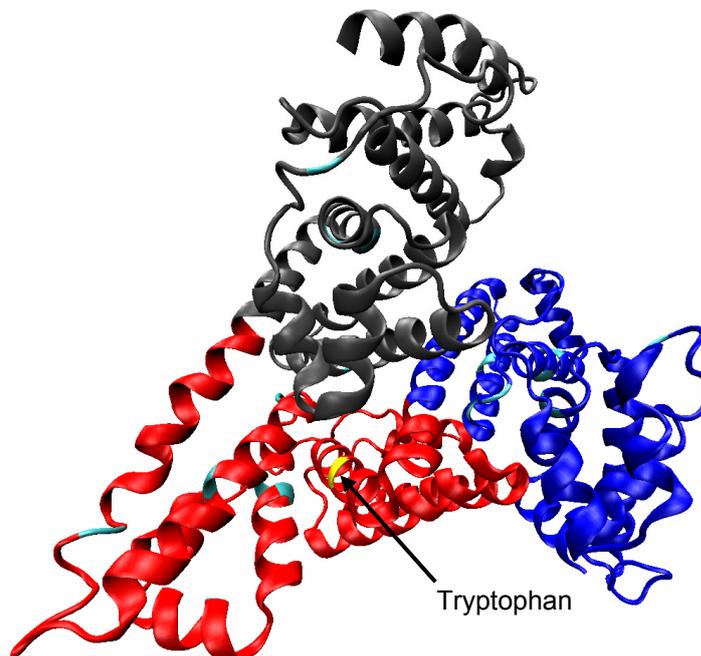
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Benchmark erfüllt ist. Es hat sich gezeigt, dass die Technik gut geeignet ist, um kleinste Änderungen der nativen Fluoreszenzlebensdauer von Proteinen schnell sichtbar zu machen.

### **5.3 Untersuchungen zur Proteinfaltung des menschlichen Serumalbumins**

Da der Aufbau kleinste Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer nachweisen kann, wird die vorgestellte Technik für die im Folgenden beschriebene Detektion von Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen ausgenutzt. Zuvor wurde gezeigt, dass man Änderungen der chemischen Umgebung von Tryptophan-Resten detektieren kann. Daher ist es nahe liegend, den Nachweis einer Änderung der Umgebung von Tryptophan, das in einer Polypeptidkette – sprich Protein – vorliegt, durchzuführen. Neben der Auswahl eines möglichst einfachen Proteins, in dem nur wenige Fluorophore vorhanden sind, soll eine kontrollierbare Methode, wie z.B. die definierte Zugabe einer Chemikalie, angewendet werden, um die Struktur dieses Proteins schrittweise beeinflussen zu können.

Die Information für die biologisch aktive, d.h. native, Konformation von Proteinen ist bereits durch ihre Aminosäuren-Sequenz festgelegt. Die nativen Formen vieler Proteine entstehen im Reagenzglas spontan innerhalb weniger Mikro- bis Millisekunden. Trotzdem gibt es spezielle Hilfsproteine, so genannte Chaperone, die unter den im Zellinneren herrschenden Bedingungen die Bildung nativer Formen bestimmter Proteine unterstützen. Dieser Übergang eines Proteins vom denaturierten, entfalteten Zustand in die native, gefaltete Konformation bezeichnet man als Proteinfaltung [94]. Unter der Entfaltung bzw. Denaturierung versteht man die Umwandlung eines gefalteten, biologisch aktiven Proteins in eine entfaltete inaktive Form. Eine Denaturierung ist mit einem biologischen Funktionsverlust verbunden. Das denaturierte Protein kann in einer Vielzahl von verschiedenen Konformationen vorliegen, denn im denaturierten Zustand eines Proteins kann - im Gegensatz zur genau definierten Struktur des nativen Proteins – keine eindeutige Molekülkonformation zugeordnet werden. Auf Grund ihrer hohen Flexibilität sind die einzelnen Konformationen experimentell oft nicht einzeln zugänglich [95]. Die Denaturierung erfolgt durch Aufhebung der nicht-kovalenten Bindungen und der Disulfidbrücken; Peptidbindungen bleiben dabei bestehen. Proteine können thermisch oder chemisch denaturiert werden. Chemische Denaturierung kann z.B. durch pH-Änderung, durch Zugabe von Harnstoff,  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Guanidiniumhydrochlorid erfolgen. Der Prozess ist in der Regel reversibel: Das Entfernen vom Denaturanten führt zu einer Renaturierung des Proteins [96]. Faltungsstudien an Proteinen in vitro haben in den

letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen, weil unvollständig gefaltete Zwischenzustände gefunden wurden, die Einblicke in den Mechanismus der Proteinfaltung gewähren [97-99]. Ein wichtiges Ziel der Molekularbiologie ist es darüber hinaus, die Gesetzmäßigkeiten der Proteinfaltung zu verstehen. Denn dann wäre es möglich, die Konformation eines Proteins aus der leicht zugänglichen DNA-Sequenz vorherzusagen. Bislang werden photochemische Methoden, Techniken wie „ultrafast mixing“ oder die Laser-Temperatursprung-Spektroskopie verwendet. Auf Grund der enormen Komplexität von Proteinfaltungsvorgängen ist es von großer Wichtigkeit, möglichst viele komplementäre Messparameter zur Verfügung zu haben. Obwohl die stationäre Tryptophanfluoreszenz ein gängiger Parameter ist, wurde der hohe Informationsgehalt der zeitaufgelösten Fluoreszenz bis zum heutigen Tage kaum zur Untersuchung von Proteinfaltungsvorgängen genutzt. In der hier vorgestellten Methode wird die Proteinfaltung ausschließlich auf Grund der nativen UV-Fluoreszenzlebensdauer detektiert. Daher ist keine Markierung notwendig, die die Proteinstruktur beeinflussen könnte.



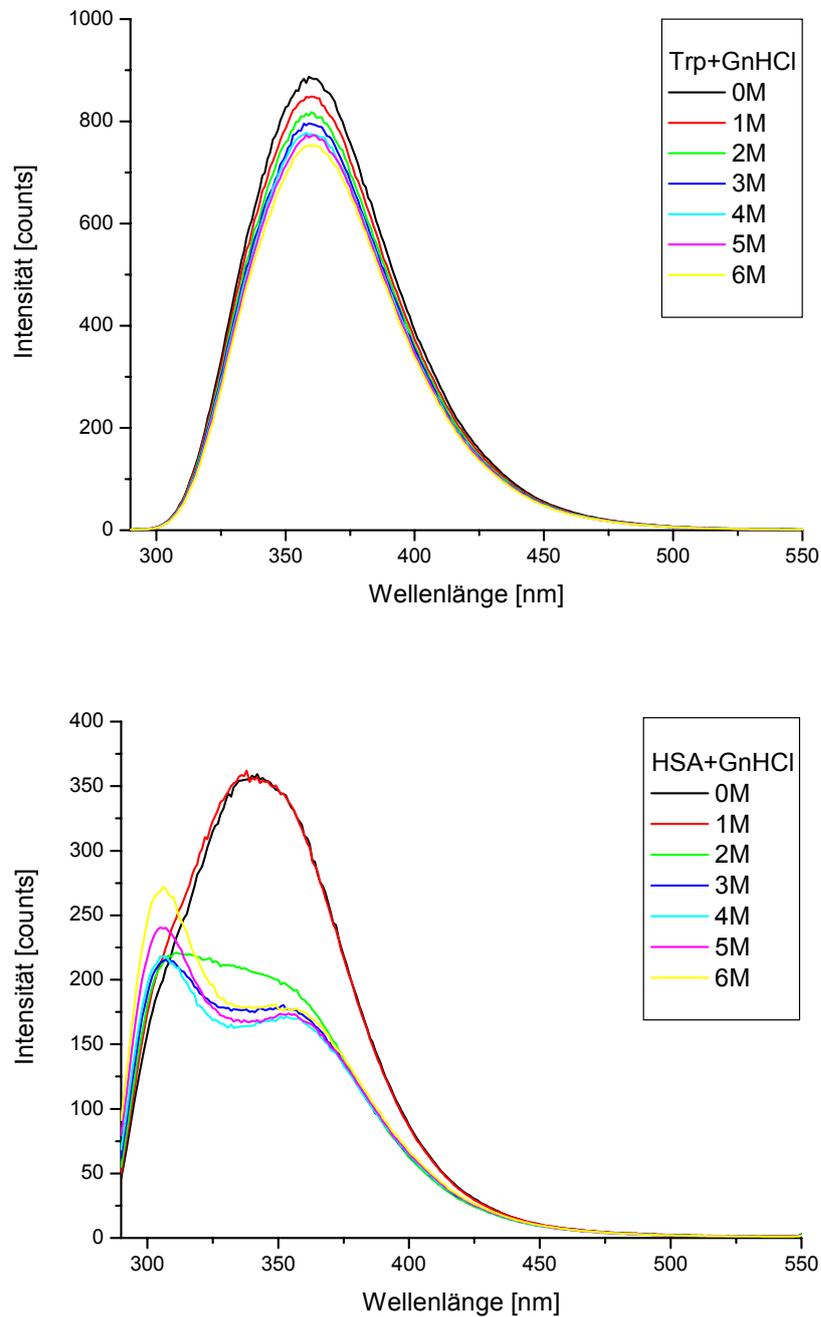
**Abbildung 5.6: Visualisierung von menschlichem Serumalbumin mittels VMD [100]: Domäne I (blau), Domäne II (rot), Domäne III (grau), Tryptophan (gelb), Tyrosin (türkis)**

Als Albumine wird eine Gruppe einfacher, wasserlöslicher Proteine bezeichnet, die in Körperflüssigkeiten, tierischem Gewebe und in manchen Pflanzensamen enthalten sind. Menschliches Serumalbumin (Human Serum Albumin, HSA) ist mit 55% bis 62%

das häufigste Protein in menschlichem Blutplasma. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit 585 Aminosäuren. Dabei treten die sauren Aminosäuren im Überschuss auf. Die räumliche Struktur des Proteins wird durch 17 Disulfidbrückenbindungen stabilisiert [101]. HSA besitzt ein relativ niedriges Molekulargewicht von ca. 66500Da, aber eine hohe Nettoladung. Es zeigt auf Grund dieses hohen Ladungs-Masse-Verhältnisses eine gute Bindungsfähigkeit von Wasser,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und Fettsäuren. Darüber hinaus ist es auch im Stande, eine Vielzahl von unterschiedlichen Metaboliten und schlecht löslichen Arzneimitteln zu binden [102-104]. Die Hauptfunktion von HSA ist jedoch der Transport von Fettsäuren. Jedes Albuminmolekül kann bis zu sieben Fettsäuremoleküle binden, die ihren hydrophoben Teil in tiefen Taschen des Proteins vor dem umgebenden Wasser verbergen. Menschliches Serumalbumin besteht aus drei homologen  $\alpha$ -helikalen Domänen I-III, die wiederum in zwei Untereinheiten A und B gegliedert sind [105, 106]. [Abbildung 5.6] zeigt die Struktur des Proteins HSA mit dem Programm Visual Molecular Dynamics [100], dessen Kristallstruktur (1AO6) mit einer Auflösung von 2,5Å in einer Proteindatenbank hinterlegt ist [107, 108]. Die unterschiedlichen Domänen sind dabei farblich gekennzeichnet. Die Entfaltung der drei Domänen, obwohl nicht nur von der Topologie sondern auch von der räumlichen Struktur sehr identisch [107], ist unterschiedlich [109]. HSA enthält nur ein Tryptophan (Trp-214), das sich in der Domäne IIA fast zentral in der zweiten  $\alpha$ -Helix befindet. Zusätzlich sind noch 16 Tyrosine und 30 Phenylalanine vorhanden. Auf Grund eines einzigen Tryptophans eignet es sich jedoch besonders gut für den Nachweis der Entfaltung des Proteins bzw. der Domäne IIA mittels nativer UV-Fluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit werden UV-Lebensdauerinformationen mit dem bereits vorgestellten Versuchsaufbau gewonnen. Vergleichend dazu werden ebenfalls Emissionsspektren aufgenommen und entsprechend ausgewertet.

Fettsäuren- und Globulinfreies menschliches Serumalbumin (A3782; Sigma) wird in PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Phosphat-gepufferte Lösung (pH 7,4)) mit 0 bis 6M Guanidiniumhydrochlorid (GnHCl, 50933; Fluka) gelöst. Die Endkonzentration von HSA beträgt 1mg/ml. Als Denaturant wird GnHCl verwendet, das unteren anderem die Wasserstoffbrücken aufbricht. Um den Einfluss von GnHCl auf die Fluoreszenz von Tryptophan zu untersuchen und die Messungen mit HSA gegebenenfalls zu korrigieren, werden die Messungen zusätzlich mit Tryptophan und entsprechender GnHCl-Konzentration durchgeführt. Die Fluoreszenzlebensdauer sowie die

Emissionsspektren der stationären Fluoreszenz werden nach dem bereits zuvor beschriebenen Verfahren aufgenommen und ausgewertet.



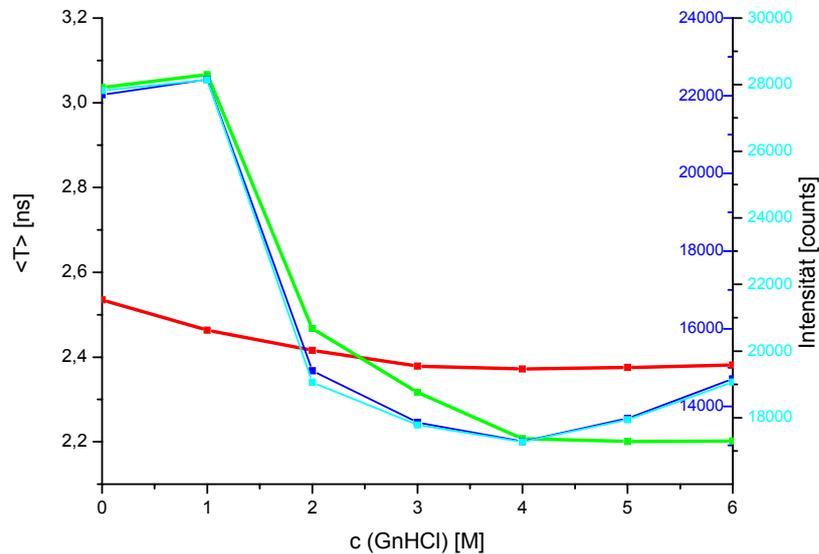
**Abbildung 5.7: Emissionsspektrum der stationären Fluoreszenz von Tryptophan (oben) und von menschlichem Serumalbumin (unten) in PBS mit unterschiedlichen GnHCl-Konzentrationen. Anregung mit 280nm, Detektion zwischen 290 und 550nm.**

Die Fluoreszenzintensität des Tryptophans nimmt mit höheren Konzentrationen von GnHCl ab, wobei jedoch die Form des Spektrums identisch bleibt [Abbildung 5.7]. Die

Intensität von HSA nimmt zwar ebenfalls zwischen 1 und 4M GnHCl ab, steigt danach aber zumindest im Bereich von 290 bis 350nm wieder leicht an. Während das Spektrum von Tryptophan bis auf die Abnahme der Intensität unverändert bleibt, ändert es sich bei HSA stark: Mit steigender GnHCl-Konzentration bilden sich zwei Maxima bei 306nm und 355nm aus. Bereits im nativen Zustand ist das Maximum der Emission gegenüber dem Emissionsspektrum von Tryptophan (360nm) in den kürzerwelligen Bereich (340nm) verschoben und verbreitert auf Grund der Mischung zweier Spektren. Dies deutet darauf hin, dass die im Protein enthaltenen Tyrosine ebenfalls nicht unerheblich zur Emission beitragen. Sehr deutlich zeigt sich dies bei höheren GnHCl-Konzentrationen – d.h. bei zunehmender Denaturierung des Proteins – bei denen zwei deutliche Maxima zu erkennen sind, die jeweils von Tyrosin und Tryptophan herrühren. Im nativen Zustand überwiegt die Tryptophan-Fluoreszenz. Die Ursache hierfür ist die Faltung in wässriger Umgebung. Hydrophobe Aminosäuren befinden sich im Innern des Proteins, während sich hydrophile Aminosäuren nach außen falten. Mit zunehmender Denaturierung wird diese starre Anordnung auf Grund der Aufhebung der Tertiärstruktur aufgelöst, so dass auch hydrophobe Aminosäuren einer wässrigen – und damit chemisch veränderten – Umgebung ausgesetzt werden. Einen weiteren, jedoch deutlich geringeren Effekt ruft der Energietransfer vom Tyrosin zum Tryptophan hervor, der dazu führt, dass die Emission von Tyrosin abnimmt und die von Tryptophan ansteigt. Erst mit zunehmender Denaturierung und damit verbundener Entfaltung des Proteins, nimmt der Abstand zwischen Tyrosin und Tryptophan zu und der Energietransfer wird ineffizient [57]. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass dieser Effekt auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist.

Die Gesamtintensität zwischen 300 und 375nm sowie zwischen 300 und 550nm ist in [Abbildung 5.8] dargestellt. Ebenso wird die Lebensdauerinformation von Tryptophan und HSA bei verschiedenen GnHCl-Konzentrationen ausgewertet. Die Messwerte von HSA sind jeweils auf die entsprechenden Tryptophan-Messungen normiert, um auf den Einfluss von GnHCl auf die Tryptophan-Fluoreszenz zu korrigieren. Dieses Verfahren stellt nur eine Näherung dar, denn Tryptophan ist eine freie Aminosäure und liegt nicht als Polypeptid vor. Die Fluoreszenzlebensdauer folgt auch hier zunächst der aus den Emissionsspektren berechneten stationären Gesamtintensität. Die Lebensdauer nimmt von ca. 3,0ns auf 2,2ns ab. Verglichen mit der Intensität ist jedoch ab 4M GnHCl kein erneuter Anstieg zu beobachten. Wie bereits erwähnt, ist der Fluoreszenzanstieg auf die Zunahme der Tyrosin-Fluoreszenz zurückzuführen. Tyrosin weist aber eine andere

Lebensdauer auf, die sich bei der Berechnung der mittleren Lebensdauer nicht auswirkt.



**Abbildung 5.8:** Mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T \rangle$  von HSA (grün) und Tryptophan (rot) sowie die stationäre Fluoreszenzintensität von HSA im Bereich zwischen 300 und 375nm (blau) bzw. 550nm (türkis).

### 5.3.1 Bestimmung der freien Entfaltungsenergie

Zur quantitativen Auswertung und Berechnung der freien Entfaltungsenergie  $\Delta G$  nimmt man im einfachsten Fall ein sog. Zwei-Zustandsmodell an, in dem das Protein entweder im nativen (N) oder denaturierten (D) Zustand vorliegt:



$f_N$  und  $f_D$  geben die Anteile an, zu denen die Proteine in dem jeweiligen Zustand vorliegen und es gilt:  $f_N + f_D = 1$ . Seien nun  $\langle T_N \rangle$  und  $\langle T_D \rangle$  die mittleren Fluoreszenzlebensdauern des Proteins im nativen bzw. denaturierten Zustand, die in Abwesenheit bzw. bei sehr hoher Konzentration von GnHCl gemessen werden, so ergibt sich für die Mischung beider Zustände eine mittlere Lebensdauer von:

$$\langle T \rangle = f_N \cdot \langle T_N \rangle + f_D \cdot \langle T_D \rangle \quad 5.2$$

Dadurch lassen sich nun die Anteile der jeweiligen Zustände direkt aus den gemessenen mittleren Lebensdauern  $\langle T \rangle$  ermitteln:

$$f_N = (\langle T \rangle - \langle T_D \rangle) / (\langle T_N \rangle - \langle T_D \rangle) \quad 5.3$$

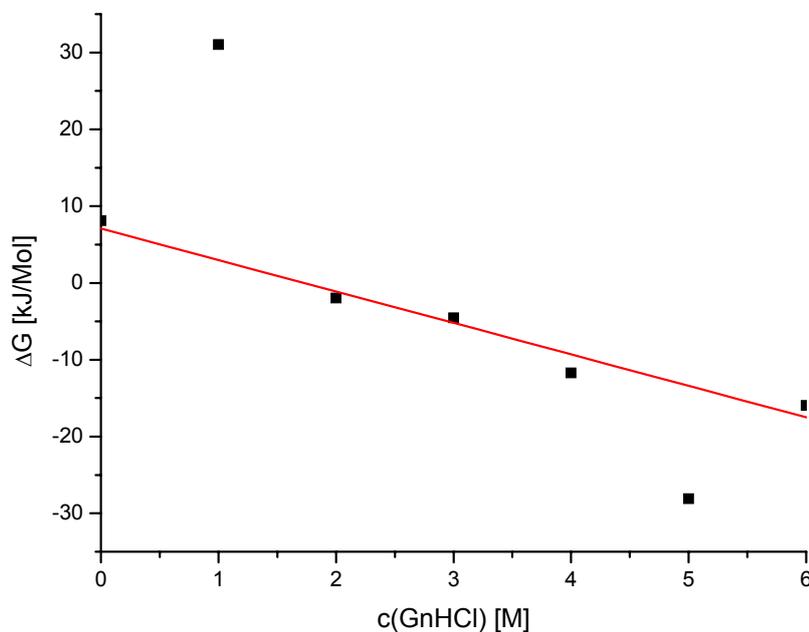
$$f_D = (\langle T_N \rangle - \langle T \rangle) / (\langle T_N \rangle - \langle T_D \rangle)$$

Hieraus kann sowohl die Gleichgewichtskonstante  $K$  wie auch die freie Entfaltungsenergie  $\Delta G$  berechnet werden:

$$K = e^{-\Delta G/RT} = f_D / f_N = (\langle T_N \rangle - \langle T \rangle) / (\langle T \rangle - \langle T_D \rangle) \quad 5.4$$

Die Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturanten lässt sich durch einen linearen Zusammenhang darstellen [110, 111]:

$$\Delta G = \Delta G^0 - m(\text{Denaturant}) \quad 5.5$$



**Abbildung 5.9:** Die freie Entfaltungsenergie  $\Delta G$  in Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturanten GnHCl.

In [Abbildung 5.9] sind berechneten freien Entfaltungsenergien  $\Delta G$  dargestellt. Die „Ausreißer“ bei 1M und 5M GnHCl sind für die lineare Regression nicht berücksichtigt worden, weil die Daten nicht für die Pre- und Post-Transition-Baseline korrigiert sind. Die restlichen Messpunkte liegen aber recht gut auf der Geraden. Für das Entfalten der Tryptophan-beinhaltenen Domäne IIA lässt sich ein  $\Delta G^0=7,1$  kJ/Mol und  $m=-4,1$  kJ/M bestimmen. Die freie Entfaltungsenergie für die Domäne IIA liegt unterhalb der Energie für das gesamte Protein [112], was zumindest qualitativ darauf hindeutet, dass dieser Teil des Proteins eher entfaltet wird als der gesamte Komplex.

#### **5.4 Nachweis von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen auf Nitrocellulose**

Die vorgestellte Technik zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern ermöglicht es, Änderungen der Tertiärstruktur von Proteinen aufzudecken. Änderungen der spektralen Eigenschaften von Proteinen können aber auch durch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Es ist möglich, dass freie Proteine vor einer Wechselwirkung in Form einer Komplexbildung mit anderen Proteinen eine andere Fluoreszenzlebensdauer haben als danach. Im Folgenden soll nun eine Möglichkeit des Nachweises von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen aufgezeigt werden. Der Nachweis und – wenn möglich – sogar die Quantifizierung der Proteinmenge, die von einem Organismus, Gewebe oder von einer Zelle exprimiert werden, ist ein großes Ziel der Systembiologie und Proteomics [113, 114]. Beiden Disziplinen misst man große Bedeutung zu und erhofft sich von ihnen die Erforschung neuer Bereiche der Life Sciences. Insbesondere von der medizinischen Proteomics verspricht man sich Fortschritte auf dem Gebiet der Entwicklung neuer Medikamente, weil sie das so genannte Screening biologischer Zielsubstanzen – so genannten Targets – ermöglicht. Darüber hinaus lassen sich molekulare Marker in der *in vitro*-Diagnostik einsetzen [115].

Die Anzahl der Proteine in einer Zelle kann über einen sehr großen Bereich variieren und dennoch eine physiologische Relevanz haben. Dabei sind Mengen von  $10^0$  bis  $10^6$  Proteinen pro Zelle möglich. Da es für Proteine keine Möglichkeit der Vervielfältigung kleinster Mengen *in vitro* gibt, wie z.B. die PCR (Polymerase Chain Reaction) für Nukleinsäuren, wird für den Nachweis von kleinsten Proteinmengen ein sensitives

Nachweisverfahren gesucht. Als Standardverfahren auf dem Gebiet der Proteomics wird derzeit die Massenspektrometrie eingesetzt, um Proteine, die vorher in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie, Farbstoffen oder Silberfärbung angefärbt wurden, exakter bestimmen und quantifizieren zu können [116-119]. Die Auftrennung und Detektion eines Zelllysats kann aber auch elektrophoretisch auf einem Microfluidik-Chip erfolgen [120-122]. Eine andere Methode ist der Einsatz von so genannten Microarrays, also regelmäßig auf einer Oberfläche angeordnete Testfelder von DNA, Peptiden oder Proteinen (so genannte Spots), die zur Erkennung von Protein-Wechselwirkungen genutzt werden können. Dazu werden die Fängermoleküle in möglichst kleinen Spots auf einer Oberfläche immobilisiert, die in der Lage sind, die entsprechenden Bindungspartner aus einer zu untersuchenden Probe zu binden. Nach Entfernen der Probe bleiben dann nur die gebundenen Bindungspartner zurück. Zusätzlich lassen sich die Analyse-Vorgänge parallelisieren, da auf einem Microarray Tausende Parameter – entsprechend der Anzahl der Spots in einem Experiment – untersucht werden können. Technisch möglich sind derzeit unter Anwendung photolithographischer Verfahren oder Sprühverfahren ca. 5000 Spots pro  $\text{cm}^2$ . Werden die zu untersuchenden Proben mit Farbstoffen versehen, so kann eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit erreicht werden [123-128]. Die Möglichkeit, mehrere Bindungspartner parallel identifizieren und quantifizieren zu können, findet Anwendung in der biologischen Grundlagenforschung, Diagnose von Krankheiten, Entdeckung therapeutischer Marker und Substanzen und bei der Untersuchung möglicher Nebenwirkungen von Arzneimitteln [129]. Langfristig soll es auch möglich sein, Microarrays in der Einzelzell-Analytik einzusetzen, um Tumor-relevante Proteine identifizieren und diese Informationen für diagnostische Zwecke im Sinne eines Screening-Verfahrens einsetzen zu können.

Bei den heutigen Verfahren müssen die Bindungsproteine jedoch zunächst mit Farbstoffen markiert werden. Dadurch werden unweigerlich chemische Veränderungen an den Proteinen vorgenommen, und es sind zusätzliche Wasch- und Aufkonzentrationsschritte notwendig, die die Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung zusätzlich stören können. Darüber hinaus ist das Anfärben kleinster Proteinmengen in einem geringen Volumen – wie z.B. in einer Zelle – sehr aufwendig und mühsam oder sogar unmöglich. Um Probleme beim Anfärben in Gelen oder in der Microchip-Elektrophorese zu vermeiden, nutzt man die UV-Absorption oder die native Fluoreszenz von unmarkierten Proteinen [24, 130-137]. Das Verfahren zeigt eine mit Farbstoffen markierten Proben vergleichbare Empfindlichkeit. So lassen sich z.B. in

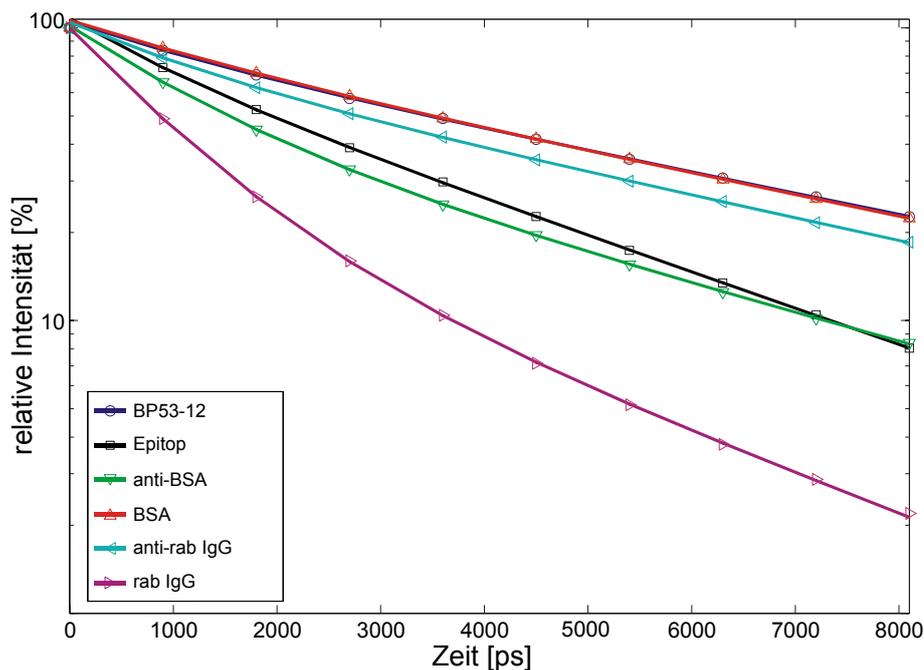
Polyacrylamidgelen durch direkte Anregung mit 280nm unmarkierte Proteinbanden von 1-5ng noch nachweisen [24]. Dieses Verfahren soll nun dadurch ergänzt werden, dass die native Proteinfluoreszenz zeitaufgelöst detektiert und in Protein-Microarrays ausgelesen wird. Dabei wird angenommen, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer des Rezeptors bei der Bindung eines Liganden ändert. Dieses Verfahren wird z.B. von Striebel et al. in Verbindung mit dem zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen eingesetzt, bei dem Protein-Spots auf einem Agarosesubstrat schrittweise durch einen Laserfokus bewegt werden, um Informationen über jeden einzelnen Spot zu erlangen [135]. Die Fluoreszenzabklingkurven des Rezeptors werden jeweils mit und ohne Liganden mit einem bi-exponentiellen Modell angefitet, wodurch eine Empfindlichkeit im nanomolaren Konzentrationsbereich des Liganden erreicht wird [135].

Im Folgenden wird ein neues markierungsfreies Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen entwickelt und vorgestellt. Dabei werden Intensitäts- und Lebensdauerinformationen der nativen UV-Fluoreszenz von markierungsfreien Proben herangezogen, um die Bindung eines Liganden zu detektieren und gegebenenfalls zu quantifizieren. Dazu wird beispielhaft die Bindung von p53-Antikörpern an lineare Peptidpitope, die vom menschlichen p53-Protein abgeleitet sind, untersucht. p53-Antikörper sind unabhängige und hochspezifische Tumor-Marker, auf denen große Erwartungen in der Krebsfrüherkennung ruhen [29]. Diese Peptidpitope, die Tryptophan beinhalten, werden auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und als Rezeptormoleküle benutzt, um eine Bindung des monoklonalen Modellantikörpers (BP53-12) als Liganden nachzuweisen und zu quantifizieren. Dadurch soll gezeigt werden, dass UV-FLIM für die Entwicklung von heterogenen Assays geeignet ist. Zunächst muss aber geklärt werden, inwiefern unterschiedliche Proteine überhaupt einen messbaren Unterschied in der Fluoreszenzlebensdauer aufweisen. Darüber hinaus muss ein robustes Verfahren zur Immobilisierung von Rezeptormolekülen auf einer Oberfläche und zur spezifischen Anbindung von Liganden entwickelt werden.

#### **5.4.1 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer von Proteinen**

Es werden die folgenden kommerziell erhältlichen Proteine (Sigma) untersucht: Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin, A2153) und der monoklonale

Antikörper mouse anti-BSA (BSA-33, B2901); rabbit IgG (I5006) sowie das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von anti-rabbit IgG (R9130). Es werden monoklonale Antikörper gegen menschliches p53 (BP53-12, Dianova) eingesetzt. Anstelle des gesamten p53-Proteins wird lediglich ein kurzes Peptidepitop verwendet. Die Aminosäuren Sequenz SQETFSDLW~~K~~LLPEN (W=Tryptophan) wurde durch Festphasensynthese am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg hergestellt. Sämtliche Proteine sind in PBS-Puffer (pH 7,4, Sigma) mit 0,25% Tween20 (Sigma) gelöst und verdünnt. Die verschiedenen Proteine und das p53-Epitop werden mit einer Konzentration von 100µg/ml in PBS gelöst. Es werden ca. 2,5µl auf das Glassubstrat aufgebracht und mit UV-FLIM vermessen. Aus den 10 aufgenommenen Bildern werden nach der Hintergrundkorrektur für jeden Bildpunkt die Fluoreszenzintensität und die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  berechnet und in einem Falschfarbenbild dargestellt. Die Fluoreszenzinformation in jedem Spot wird gemittelt. Aus diesen Daten kann die Fluoreszenzlebensdauerinformation entweder durch ein bi-exponentielles Modell oder durch die Modell-freie mittlere Lebensdauer  $\langle T \rangle$  berechnet werden.



**Abbildung 5.10: Zeitaufgelöste Messungen des Fluoreszenzabklingverhaltens verschiedener Proteine und Peptide. Die Gatebreite  $t_g$  beträgt 300ps und der Gateabstand 900ps. Es wird eine Serie bestehend aus 10 Bildern mit einem Delay zwischen 0 to 8100ps aufgenommen. Die Belichtungszeit für jedes Bild beträgt 100ms. Die Messpunkte können mit einem bi-exponentiellen Modell angefitet werden.**

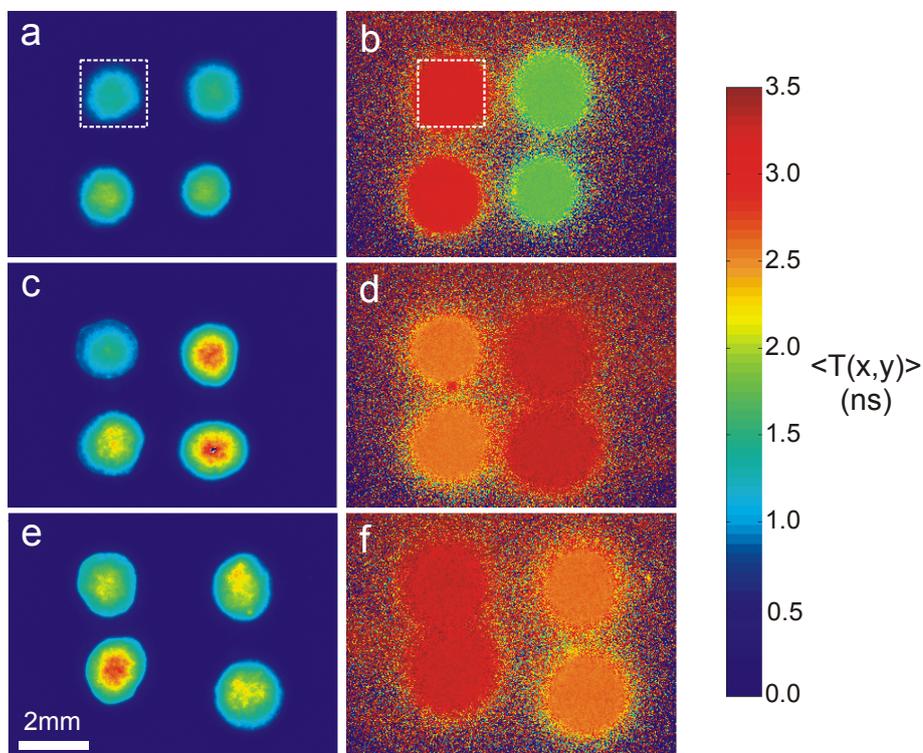
[Abbildung 5.10] zeigt die Fluoreszenzabklingkurven, die aus einem zuvor ausgewählten Bereich der Größe 0,2cm x 0,2cm, der den gesamten Spot abdeckt, gewonnen werden. Die entsprechenden Zeiten sind in [Tabelle 3] dargestellt: Der Fit-Algorithmus liefert Lebensdauern zwischen 1 und 6ns, die eine gute Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen für Proteine darstellen [135]. Obwohl man davon ausgehen muss, dass die Fluoreszenz von Proteinen im Allgemeinen ein multi-exponentielles Verhalten aufweist [57], liefert ein bi-exponentieller Fit ein zufrieden stellendes Ergebnis für Fluoreszenzabklingkurven, die durch die zeitaufgelösten Intensitätsbilder gewonnen werden. Zusätzliche Exponenten führen auch bei diesen Proteinen nicht zu einem besseren Fit, sondern – wie bereits zuvor beobachtet – zu numerischen Instabilitäten. In der Übersicht ist aber ersichtlich, dass sich die Fluoreszenzlebensdauern von bestimmten Antikörpern und Antigenen erheblich unterscheiden. So weist z.B. das rabbit IgG eine mittlere Lebensdauer von 1,77ns auf, während der entsprechende Antikörper anti-rabbit IgG eine Fluoreszenzlebensdauer von 3,16ns hat. Daher könnten diese Proteine für eine eindeutige Identifikation und für Lebensdauermessungen von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen verwendet werden.

	$\tau_1$ [ns]	$A_1$	$\tau_2$ [ns]	$A_2$	$\langle T \rangle$ [ns]
<b>anti-rabbit IgG</b>	5,69	0,73	1,27	0,27	3,16
<b>rabbit IgG</b>	3,20	0,27	0,97	0,73	1,77
<b>anti-BSA</b>	4,53	0,49	1,21	0,51	2,56
<b>BSA</b>	5,98	0,81	1,54	0,19	3,26
<b>BP53-12</b>	6,07	0,82	1,33	0,18	3,28
<b>p53-Epitop</b>	3,51	0,75	0,97	0,25	2,60

**Tabelle 3: Über einen Spot gemittelte UV-Fluoreszenzlebensdauer und die entsprechenden Anteile unter der Annahme eines bi-exponentiellen Modells  $\tau_1, A_1, \tau_2, A_2$  sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T \rangle$  von unterschiedlichen Proteinen und dem p53-Peptid epitop in PBST-Lösung.**

Der Vergleich mit den Fluoreszenzintensitäten [Abbildung 5.11 a, c, e] zeigt deutlich die Vorteile von UV-FLIM [Abbildung 5.11 b, d, f]: Geringe Intensitätsänderungen lassen sich nicht auflösen, weil sie z.B. Schwankungen in der Ausgangskonzentration der Proteinlösung unterliegen, während Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer von nur wenigen Picosekunden signifikant aufgelöst werden können. Auch sieht man in diesem Vergleich, dass Konzentrationsschwankungen keinen wesentlichen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer haben. Die Lebensdauern von Proteinen

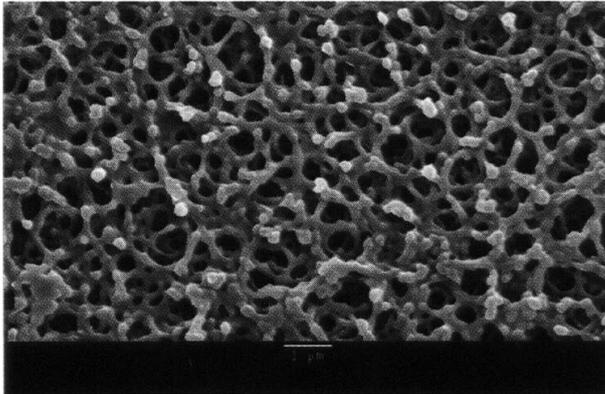
unterscheiden sich hinreichend, um signifikante Unterschiede nach Anbindung eines Liganden detektieren zu können. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzlebensdauer deutlich zuverlässiger und aussagekräftiger, weil sie zusätzliche Messungenauigkeiten durch Intensitätsschwankungen a priori ausschließt. So lässt sich z.B. ein Hintergrundsignal eindeutig von einem Messsignal unterscheiden, sofern dieses nicht zufällig die gleiche Lebensdauer hat. Darüber hinaus lassen sich bei einer Messung Hintergrundsignale mit deutlich kürzerer Lebensdauer als die der zu untersuchenden Proben dadurch ausblenden, dass man die Messung auf den Abschnitt limitiert, in dem die Hintergrundfluoreszenz nicht vorhanden ist.



**Abbildung 5.11:** Hintergrundkorrigierte Falschfarbendarstellung der stationären nativen UV-Fluoreszenz (a, c, e) sowie die entsprechenden mittleren Lebensdauern  $\langle T(x,y) \rangle$  mittels UV-FLIM (b, d, f) verschiedener Proteine und Peptide in wässriger Lösung auf einem Glassubstrat. Anti-rabbit IgG (a, b), anti-BSA (c, d) und der Modellantikörper BP53-12 (e, f) sind jeweils auf der linken Seite der Intensitäts- bzw. Fluoreszenzlebensdauerbilder zu sehen; rabbit IgG, BSA und das p53-Peptid epitop auf der rechten Seiten.

## 5.4.2 Untersuchung spezifischer Bindungen auf Nitrocellulosemembranen

Im Folgenden wird die Entwicklung eines Assays zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen vorgestellt. Das Rezeptormolekül wird auf einer Nitrocellulosemembran (BioTrace NT; Pall) [Abbildung 5.12] immobilisiert. In einem weiteren Schritt wird der Ligand spezifisch an den immobilisierten Rezeptor gebunden. Nitrocellulosemembranen sind weit verbreitete Zellstoffe für das Proteinblotting. Sie weisen gleichzeitig eine vergleichbar geringe Hintergrundfluoreszenz in dem hier verwendeten ultravioletten Wellenlängenbereich auf, was nur bei wenigen der zur Verfügung



**Abbildung 5.12: 10000-fache Vergrößerung einer Nitrocellulosemembran, bei der die poröse Struktur der Oberfläche deutlich erkennbar ist.**

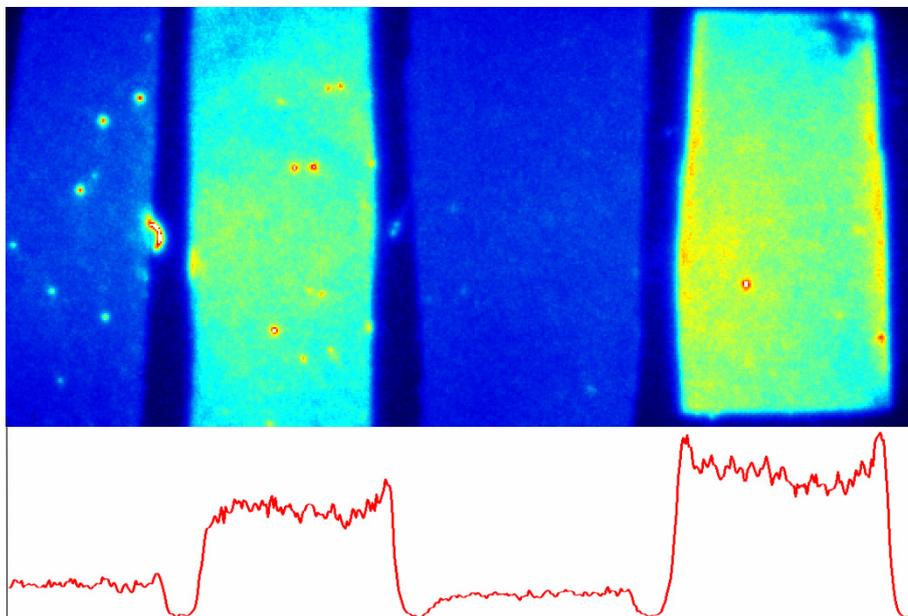
stehenden Materialien der Fall ist. Ähnlich geringe Eigenfluoreszenz haben Substrate aus hochreinem Quarzglas oder Goldoberflächen. Der Vorteil von Nitrocellulosemembranen liegt in der porösen Oberfläche: Auf Grund ihrer Anwendung für das Proteinblotting hat sie eine ausgezeichnete Proteinbindungskapazität von bis zu  $\sim 200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , die durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu Stande kommt.

stehenden Materialien der Fall ist. Ähnlich geringe Eigenfluoreszenz haben Substrate aus hochreinem Quarzglas oder Goldoberflächen. Der Vorteil von Nitrocellulosemembranen liegt in der porösen Oberfläche: Auf Grund ihrer Anwendung für das Proteinblotting hat sie eine ausgezeichnete Proteinbindungskapazität von bis zu  $\sim 200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , die durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu Stande kommt.

### 5.4.2.1 Wahl eines geeigneten Blockers

Die Nitrocellulosemembran muss nach der Immobilisierung des Rezeptormoleküls passiviert werden. Unter Passivierung versteht man das Absättigen freier Bindungsstellen auf der Membran, so dass keine unspezifische Bindung möglich ist. Trotzdem darf die biologische Funktion des Rezeptors dadurch nicht gestört werden. Die häufig als so genannte Blocker verwendeten Proteine wie BSA, das Milcheiweiß

Kasein oder eine Proteinmischung aus fettfreier Milch sind für Untersuchungen mittels nativer UV-Fluoreszenz nicht geeignet, weil sie selber durch Anregung mit UV-Licht fluoreszieren und somit die Messung stören. Es kommen daher nur die ebenfalls weit verbreiteten Blocker Polyvinylalkohol (PVA), Tween20 oder  $\lambda$ -DNA in Frage. Um die Effizienz der Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen der Nitrocellulose mit Proteinen abzuschätzen, werden Nitrocelluloseschnipsel zunächst mit dem Blocker behandelt, mit PBS gewaschen und anschließend mit BSA (100 $\mu$ g/ml) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wird die stationäre UV-Fluoreszenzintensität als Maß für die Menge der gebundenen Proteine vermessen. Zusätzlich wird ein Nitrocellulosestreifen ohne Blocker behandelt und lediglich mit BSA inkubiert.



**Abbildung 5.13: Verschiedene Blocker auf Nitrocellulosemembran nach Inkubation mit 100 $\mu$ g/ml BSA: PVA, ohne Blocker, Tween20,  $\lambda$ -DNA. Stationäre Fluoreszenz (oben) und horizontales Intensitätsprofil (unten).**

[Abbildung 5.13] zeigt die stationäre UV-Fluoreszenz mit PVA, ohne Blocker, Tween20 und  $\lambda$ -DNA. PVA und Tween20 geblockte Nitrocellulose zeigt geringe Fluoreszenz, die ungeblockte und die mit  $\lambda$ -DNA geblockte hingegen ein sehr hohes Fluoreszenzsignal. Auffällig ist, dass die Fluoreszenz der mit  $\lambda$ -DNA geblockten Nitrocellulose stärker ist als bei ungeblockter Nitrocellulose. Dies ist auf eine sehr starke Eigenfluoreszenz von  $\lambda$ -DNA zurückzuführen, die daher für das Blocken der Nitrocellulose nicht weiter in Betracht kommt. Die Blockeffizienz von Tween20 ist wegen des geringeren

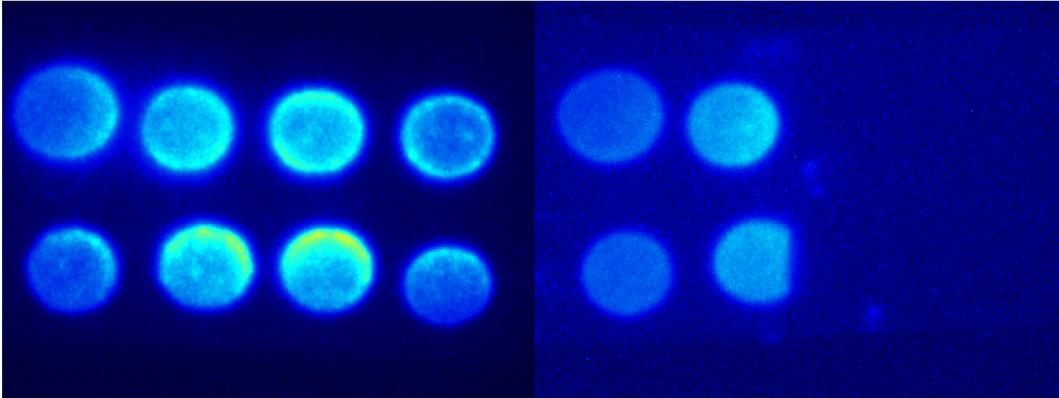
Fluoreszenzsignals besser als PVA. Deshalb werden die folgenden Versuche mit dem hier verwendeten 0,25% Tween20 in PBS durchgeführt.

#### **5.4.2.2 Überprüfung der Spezifität der Bindung**

Zur Überprüfung der Spezifität werden Farbstoff-markierte Liganden an immobilisierte Rezeptormoleküle gebunden. Die zusätzliche Markierung mit einem Farbstoff ist notwendig, um die spezifische Bindung an den Rezeptor über einen weiteren Fluoreszenzparameter nachzuweisen. Daher werden Cy3-markierte anti-rabbit IgG-Antikörper (C2306; Sigma) an immobilisierte rabbit IgG-Antikörper gebunden. Dazu werden zunächst die rabbit IgG-Antikörper (1mg/ml) in 8 Spots à 1µl auf die Nitrocellulose aufgebracht und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Nitrocellulose in PBS unter Zugabe von 0,25% Tween20 (PBST) gewaschen, um den Überstand zu entfernen und die freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Von der so präparierten Probe wird ein Bild der stationären UV-Fluoreszenzintensität aufgenommen. Um später weitere Vergleiche anstellen zu können, wird die Probe in der Mitte durchgeschnitten und nur die Hälfte mit dem Liganden (100µg/ml) für 4 Stunden inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen zu unterbinden, sind die Proteine ebenfalls in PBST gelöst. Nach einem weiteren Waschschrift wird die stationäre Fluoreszenzintensität des Cy3-Farbstoffes vermessen, weil das Anbinden eines Farbstoff-markierten Liganden an einen unmarkierten Rezeptor am besten durch die Farbstoffemission nachzuweisen ist. Um die Bindung der Cy3-markierten Antikörper nachzuweisen, wird als Anregungsquelle ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat) mit einer Wellenlänge von 532nm verwendet. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines speziellen Emissionsfilters für den Farbstoff Cy3 im Bereich von 550 bis 600nm.

An der stationären UV-Fluoreszenz [Abbildung 5.14 links] lässt sich erkennen, dass die aufgebrachten Spots auch nach dem Waschschrift noch immobilisiert auf der Nitrocellulose vorhanden sind und somit prinzipiell für eine Ligandenbindung zur Verfügung stehen. Die Spots sind homogen und die Autofluoreszenz der Nitrocellulose im Vergleich zu der Fluoreszenz der Spots vernachlässigbar. Der linke Teil der Nitrocellulose wird mit den Farbstoff-markierten Liganden inkubiert. Eine Bindung ist in [Abbildung 5.14 rechts] deutlich an dem Fluoreszenzsignal des Farbstoffes Cy3 zu

erkennen. Die immobilisierten Fängeroleküle sind also noch biologisch aktiv, d.h. sie stehen für die Anbindung eines Liganden zur Verfügung. Es fällt auf, dass die beiden rechten Spots eine höhere Intensität aufweisen als die beiden linken. Es müssen also mehr Liganden gebunden haben.



**Abbildung 5.14: Stationäre UV-Fluoreszenzintensität von auf Nitrocellulosemembran immobilisierten rabbit IgG-Antikörpern nach dem Waschschrift mit PBST (links), sowie Farbstoffdetektion (Anregung: 532nm / Detektion: 550-600nm) von an rabbit IgG-Antikörpern gebundenen Cy3-markierten anti-rabbit IgG-Antikörpern (rechts).**

Ein Vergleich mit der nativen UV-Fluoreszenz vor dem Anbinden der Liganden zeigt ebenfalls eine höhere Intensität der rechten beiden Spots. Daher liegt es nahe, dass auch mehr Rezeptormoleküle vorhanden waren. Ursache dafür ist wahrscheinlich ein größeres Volumen an aufgebrachtener zu immobilisierender Rezeptorlösung. Da jeweils nur 1µl Lösung auf die Nitrocellulose gegeben wurden, um die Größe der Spots gering zu halten, können dort geringe Schwankungen auftreten. Zwischen den Spots ist jedoch kein Fluoreszenzsignal, sondern lediglich ein schwacher Hintergrund der Nitrocellulose zu sehen. Dadurch kann erneut gezeigt werden, dass die Passivierung mit PBST sehr gut funktioniert. In der rechten Hälfte, die als Negativkontrolle fungiert, ist kein Cy3-Signal zu sehen.

### 5.4.3 Nachweis von p53-Peptidpitop-BP53-12-Wechselwirkungen

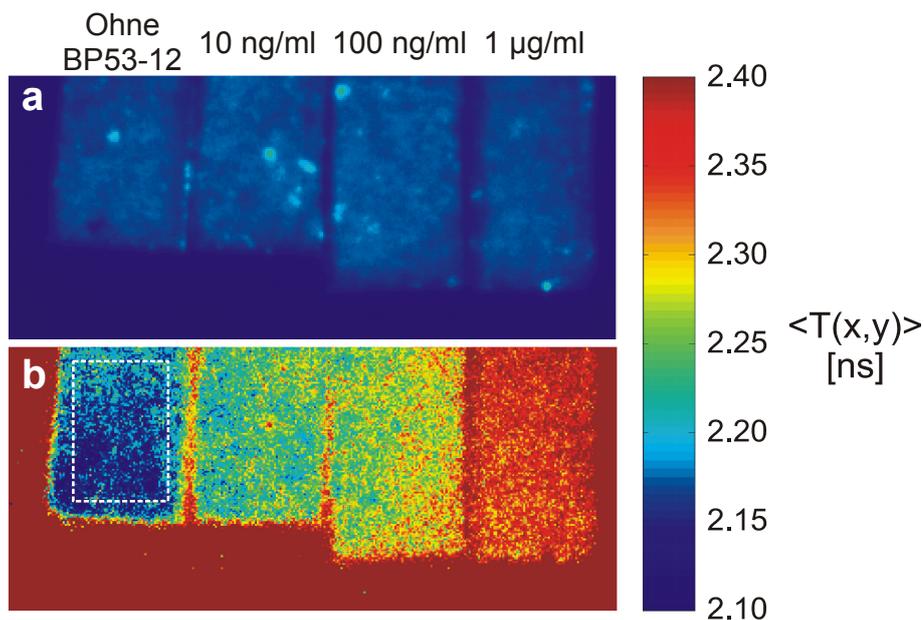
Die Untersuchungen konzentrieren sich im Folgenden auf Bindungsstudien vom p53-Peptidpitop an seinen entsprechenden monoklonalen Antikörper BP53-12 mit einer mittleren Lebensdauer  $\langle T \rangle$  von 2,60 bzw. 3,28ns. Mit diesem realen Antigen-

Antikörper-Modell soll das Potenzial für diagnostische Anwendungen von UV-FLIM untersucht werden.

Genmutationen in p53, dem „Wächter des Genoms“ [29], sind die häufigsten genetischen Veränderungen bei menschlichen Tumoren [30, 31] und führen oft zu einer Immunantwort des Körpers gegen das Zellkern-Tumorsuppressorprotein p53 – das DNA-Transkript des p53-Gens. Soussi hat bereits 1996 gezeigt, dass das Auftreten von p53-Autoantikörpern in menschlichen Seren mit nahezu 100%-iger Sicherheit auf eine maligne Erkrankung hindeutet, falls Autoimmunerkrankungen ausgeschlossen werden können [1]. Routinemäßig wird die nach einem heterogenen Verfahren arbeitende ELISA-Technik zur Detektion von p53-Autoantikörpern eingesetzt, deren Detektionslimit im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$ M liegt. Große Nachteile dieses Tests sind die Testdauer, die im Bereich von mehreren Stunden liegt, sowie die hohen Kosten, bedingt durch die Verwendung von rekombinantem p53-Protein. Es ist aber bekannt, dass die Immunantwort von Krebspatienten nicht gegen die mutierte zentrale Region in der p53-Sequenz gerichtet ist, sondern dass Antikörper hauptsächlich gegen zwei kurze, lineare Peptidepitope aus der N-terminalen Region (der Transaktivierungsdomäne) des Proteins gerichtet sind [34]. Die Nutzung dieser Peptide zur Entwicklung eines homogenen, auf Fluoreszenz basierenden Immunassays ist daher viel versprechend. Im Folgenden beschränken sich die Untersuchungen auf eines dieser Peptide und den monoklonalen Modellantikörper für menschliche p53-Autoantikörper, BP53-12.

Das p53-Peptidepitop mit der Aminosäuresequenz SQETFSDLWKLLPEN wird auf  $\sim 0,2\text{cm} \times 0,6\text{cm}$  großen Streifen der Nitrocellulosemembran immobilisiert. Dazu werden 1mg/ml p53-Peptidlösung für 30 Minuten inkubiert. Der Überstand und unspezifische Wechselwirkungen mit der Membran werden durch Waschen mit PBS und 0,25% Tween20 (PBST) entfernt. Danach werden die Membranen mit unterschiedlichen Konzentrationen zwischen  $6,6 \cdot 10^{-8}$  und  $6,6 \cdot 10^{-13}$  M (entsprechen 10 $\mu\text{g/ml}$  bis 100pg/ml) des monoklonalen p53-Antikörpers BP53-12 für 4 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Membranen werden erneut mit PBST gewaschen, um den Überstand und unspezifische Bindungen zu entfernen. Zusätzlich dazu wird eine Membran als Negativkontrolle lediglich mit PBST-Lösung inkubiert. Die UV-FLIM-Messungen werden direkt nach dem letzten Waschschrift durchgeführt, um die Nitrocellulose feucht zu halten und damit eine ungewünschte Denaturierung des Proteins, die unter Umständen eine Beeinträchtigung der Antikörperfunktionalität zu

Folge hätte, zu verhindern. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  wird mit dem üblichen Verfahren berechnet. Die Fluoreszenzintensitätsbilder erhält man durch Addition der zeitaufgelösten Bilder. Für eine quantitative Auswertung wird auf jeder Nitrocellulosemembran eine rechteckige Area of Interest mit der Größe  $\sim 0,15\text{cm} \times 0,25\text{cm}$  definiert. Über diesen Bereich wird dann ein Mittelwert gebildet und die mittlere Lebensdauer  $\langle T \rangle$  bestimmt.



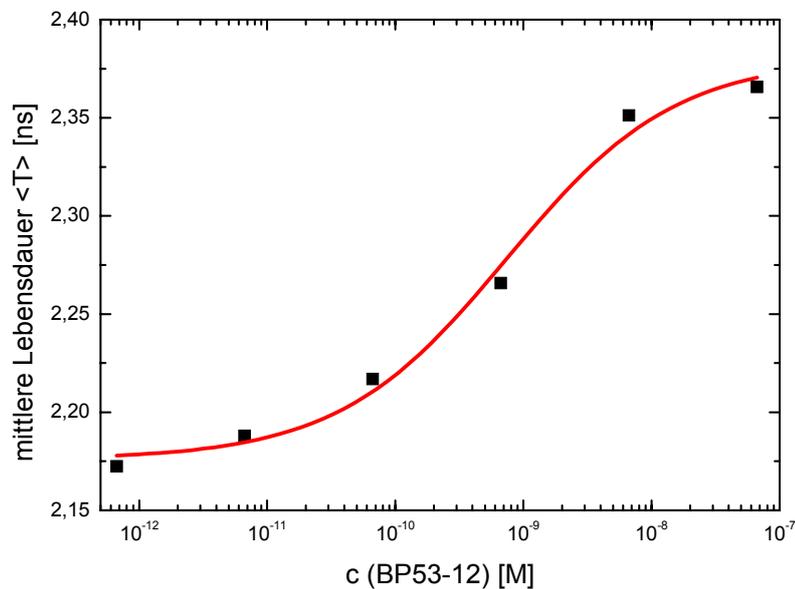
**Abbildung 5.15: Falschfarbendarstellung der stationären Fluoreszenzintensität (a) und der mittleren Lebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  mittels UV-FLIM (b) von unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers BP53-12, der gegen das auf Nitrocellulose immobilisierte p53-Peptid epitop gebunden hat. Links befindet sich eine Nitrocellulosemembran, auf der nur das Peptid epitop immobilisiert ist. Rechts daneben folgen Membranen, die mit 10ng/ml, 100ng/ml bzw. 1µg/ml Antikörper BP53-12 inkubiert wurden.**

[Abbildung 5.15] zeigt die Fluoreszenzintensitäts- und Fluoreszenzlebensdauerbilder  $\langle T(x,y) \rangle$  für unterschiedliche Antikörperkonzentrationen. Im Gegensatz zu den Intensitätsbildern zeigen die Lebensdauerbilder deutlich, dass die in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegenden Antikörper von dem Peptid epitop in unterschiedlicher Anzahl gebunden werden, was sich in einem Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer zeigt. Es fällt jedoch auf, dass die mittlere Lebensdauer des Epitops in PBS-Lösung

(vgl. [Tabelle 3]) deutlich kürzer als die Lebensdauer der auf Nitrocellulose immobilisierten Peptide ist. Die Lebensdauern des Peptidepitops gehen dabei von 2,60ns in PBS-Lösung auf 2,17ns auf Nitrocellulose zurück, während die Lebensdauern des Antikörpers von 3,28 auf 2,37ns zurückgehen. Die um 0,4ns kürzere Lebensdauer der Peptide lässt sich mit eventuellem Quenching des Tryptophans durch die Nitrocellulose erklären. Ein Rückgang der Lebensdauer des Antikörpers um fast 1ns ist jedoch weniger plausibel. Unter Umständen wird jedoch das Fluoreszenzsignal deutlich von dem Signal der Peptide dominiert, weil man annehmen kann, dass der überwiegende Anteil der Peptide nicht in der Lage ist, Antikörper zu binden. Der Grund dafür ist die Porosität der Nitrocelluloseoberfläche, auf der die Peptide zwar gebunden werden, jedoch sterisch so stark eingeschränkt sind, dass sie nicht mehr für die Antikörper zugänglich sind bzw. die Bindung nicht effizient genug erfolgen kann. Darüber hinaus ist festzustellen, dass die UV-Fluoreszenzlebensdauer von Proteinen und Peptiden sowie deren Komplexen in unterschiedlichen chemischen Umgebungen nahezu gar nicht vorhergesagt werden kann. Trotzdem ist es hier gelungen, eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer von ~200ps aufzulösen und somit zwischen ungebundenen und Peptid-Protein-Komplexen zu unterscheiden. Erschwerend kommt jedoch hinzu, dass auf der Nitrocellulosemembran immobilisierte Proteine und Peptide ein deutlich stärkeres Photobleaching zeigen als in wässriger Lösung. Dies gilt zumindest für die hier verwendete Anregung mit gepulstem 280nm-Laserlicht, trotz der Verwendung eines mechanischen Shutters.

In [Abbildung 5.16] ist die mittlere Lebensdauer logarithmisch für verschiedene Antikörperkonzentrationen dargestellt. Die Kurve variiert von 2,17 bis 2,37ns und folgt einer sigmoidalen Bindungsisotherme. Die Lebensdauer konvergiert gegen den oberen Grenzwert für Konzentrationen über  $10^{-6}$ M und gegen den unteren Grenzwert für Konzentrationen unter  $10^{-11}$ M. Die Titrationskurve zeigt eine spezifische Bindung des BP53-12 Antikörpers an das immobilisierte Peptid. Darüber hinaus lässt sich ein Detektionslimit im picomolaren Konzentrationsbereich bestimmen. Üblicherweise wird für den Nachweis von Tumor-relevanten Marker-Proteinen in einem heterogenen Assay die kommerziell erhältliche ELISA-Technik eingesetzt. Dazu sind jedoch ein immobilisiertes wild-Typ p53-Protein als Antigen und weitere Detektorantikörper notwendig. Obwohl die ELISA-Technik mit einer Nachweisgrenze für Antikörper zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-11}$ M recht sensitiv ist, ist der Test sehr langsam und teuer, weil rekombinantes p53-Protein verwendet wird. Die hier vorgestellte Methode der UV-Fluoreszenzlebensdauerermessung hingegen verwendet besondere Peptidepitope und

Modellantikörper und erreicht dabei eine mit ELISA vergleichbare Nachweisgrenze: An dem Wendepunkt der Titrationskurve in [Abbildung 5.16] kann eine Affinitätskonstante  $K_a$  von  $(1,4 \pm 0,6) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Dieser Wert ist etwas geringer als  $6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , der mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messungen in einer homogenen Lösung bestimmt wurde [138-140]. Der geringere Wert ist auf eine verminderte Bindungsaffinität durch Oberflächeneffekte zurückzuführen, wie sie in heterogenen Assays auftreten können [141]. Er liegt aber dennoch in einem üblichen Bereich für Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen und zeigt eine hohe Affinität für das untersuchte System.



**Abbildung 5.16:** Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von auf Nitrocellulosemembran immobilisierten p53-Epitopen bei unterschiedlicher Konzentration des Liganden (Antikörper BP53-12) zeigt eine sigmoidale Bindungsisotherme.

## **5.5 Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen**

Das Protein AtGRP7 ist Teil eines zirkadianen Regulationsmechanismus und reguliert die Oszillation der Konzentration seines eigenen RNA-Transkripts auf posttranskriptioneller Ebene. Es konnte gezeigt werden, dass AtGRP7 an zwei Regionen seiner mRNA binden kann [42]. In der vorliegenden Arbeit soll die Bindung des Proteins an seine mRNA mittels stationärer oder zeitaufgelöster UV- und Farbstofffluoreszenz und der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht und charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang werden neue Möglichkeiten der FCS-Methode aufgezeigt, mittels derer durch Bindung des Proteins AtGRP7 hervorgerufene Konformationsänderungen und Änderungen der Sekundärstruktur der RNA untersucht werden können. Auf diese Weise sollen Rückschlüsse auf die Struktur der vorliegenden Sequenz experimentell bestätigt werden. Basierend auf den Voruntersuchungen unserer Kooperationspartner im Sonderforschungsbereich 613 (Prof. Dr. Dorothee Staiger, Molekulare Zellphysiologie, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld) und neuer Erkenntnisse werden theoretische Modellierungen mittels MFOLD [142] und RNASHAPES [143] durchgeführt.

Im Folgenden werden zunächst das methodische Vorgehen und die Wahl einer geeigneten Methode zum Nachweis einer RNA-Protein-Bindung beschrieben. Mit dieser Methode werden weitere Untersuchungen hinsichtlich der Primär- und Sekundärstruktur der mRNA an der Bindestelle durchgeführt. Dabei wird geklärt, ob sie als Einzelstrang vorliegen muss, und die Bindestelle wird auf wenige Basen eingegrenzt. Danach wird untersucht, welche Struktur die Bindestelle innerhalb der gesamten mRNA haben könnte und inwiefern das Protein AtGRP7 in der Lage ist, diese zu beeinflussen. Abschließend sollen die Möglichkeiten der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie im Hinblick auf Untersuchungen einer RNA-Protein-Bindung aufgezeigt werden.

### **5.5.1 Modellierung der mRNA-Sekundärstruktur mittels MFOLD**

Das Genom der *Arabidopsis thaliana* ist sequenziert und kann im Internet abgerufen werden [144]. Dadurch ist auch die Sequenz des Genoms AT2G21660 zugänglich, das

für das Protein AtGRP7 kodiert. Von diesem Genom wird die entsprechende mRNA transkribiert. Somit findet man die folgende Sequenz für die Atgrp7-mRNA (5' → 3'):

```

1  ACAUCUCACU GCUCACUACU CUCACUGUAA UCCCUUAGAU CUUCUUUUCA
51  AAUUUCAAUG GCGUCCGGUG AUGUUGAGUA UCGGUGCUUC GUUGGAGGUC
101 UAGCAUGGGC CACUGAUGAC AGAGCUCUUG AGACUGCCUU CGCUCAAUAC
151 GGCGACGUUA UUGAUUCCAA GGUCUGUUAC ACGCCGAGAU CGGACUCCGA
201 GUGAUAUCA UGAUCUCAUC CUCGACGGAU CUGUUCGGAU CUUGUGUUUC
251 UCUGUUACU GUAUCGAUUA CUCUGUUACU AUUCUCGUUC UUUGUUACUA
301 CUACUACUAC UACUGUUACU UGUUUUUUCC CAAAUCGGUA CGUUAUCUU
351 CCUGCUUCUG UGAGCCCGGA GAUCGAUCGG AUUUUUUUUGU AUUUUGUAUA
401 UUUGUUGUAG AUCUAAAUGC UUUUGUUCAG UUUUGUUGGA UUGUUUUGCU
451 GAUCUGGUUU UUGUAUUAAU UGGUAACAG AUCAUUAACG AUCGUGAGAC
501 UGGAAGAUA AGGGGAUUCG GAUUCGUCAC CUUCAAGGAU GAGAAAGCCA
551 UGAAGGAUGC GAUUGAGGGA AUGAACGGAC AAGAUCUCGA UGGCCGUAGC
601 AUCACUGUUA ACGAGGCUCA GUCACGAGGA AGCGGUGGCG GCGGAGGCCA
651 CCGUGGAGGU GGUGGCGGUG GAUACCGCAG CGGCGGUGGU GGAGGUUACU
701 CCGGUGGAGG UGGUAGCUAC GGAGGUGGCG GCGGUAGACG CGAGGGUGGA
751 GGAGGAUACA GCGGCGGCGG CGGCGGUUAC UCCUCAAGAG GUGGUGGUGG
801 CGGAAGCUAC GGUGGUGGAA GACGUGAGGG AGGAGGAGGA UACGGUGGUG
851 GUGAAGGAGG AGGUUACGGA GGAAGCGGUG GUGGUGGAGG AUGGUAAUUC
901 CUUUAAUUAG GUUUGGGAUU ACCAAUGAAU GUUCUCUCUC UCGCUUGUUA
951 UGCUCUACU UGGUUUUGUG UGUUCUCUAU UUUGUUCUGG UUCUGCUUUA
1001 GAUUUGAUGU AACAGUUCGU GAUUAGGUAU UUUGGUAUCU GGAAACGUAA
1051 UGUUAAGUCA CUUGUCAUUC UCUAAAUAAC AAAUUUCUUC GGAGAUUAUA
1101 UCUCUGUUGA UUGAUUCUAU CAUCU

```

ACGU ... UTR

**ACGU ... Exon**

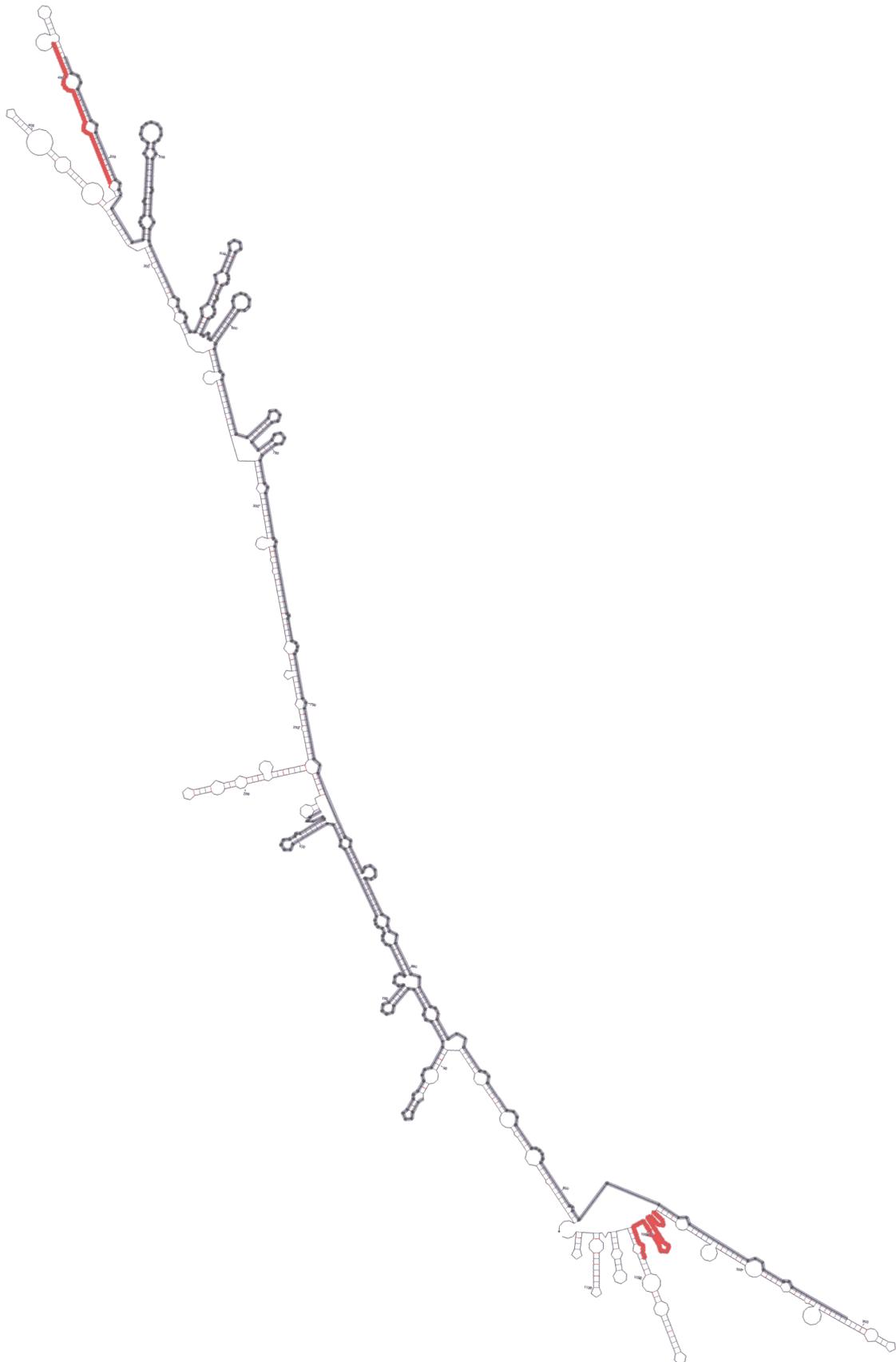
**ACGU** ... Intron (1. Hälfte / 2. Hälfte)

ACGU ... AtGRP7-bindende Sequenz

ACGU ... modellierte Teilsequenz

**Tabelle 4: Sequenz der Atgrp7-mRNA [144]. UTR, Exon, Intron sowie bislang bekannte AtGRP7-bindende Bindungsregionen sind entsprechend kenntlich gemacht.**

Die Sekundärstruktur der bekannten Sequenz wird mit MFOLD modelliert. Eine Berechnung mit RNAshapes ist nicht möglich, da RNAshapes nicht in der Lage ist, so lange RNA-Sequenzen zu berechnen. Diese bringen das Programm zum Absturz. Das Ergebnis ist in [Abbildung 5.17] grafisch dargestellt. Die Exons sind zusätzlich schwarz und die bereits bekannten – noch nicht weiter eingegrenzten – AtGRP7-Bindestellen rot unterlegt.



**Abbildung 5.17:** Die mittels MFOLD modellierte Sekundärstruktur der Atgrp7-mRNA. Die Exons sind schwarz und die bereits bekannten AtGRP7-Binderegionen rot unterlegt.

Es fällt auf, dass sich das zweite Exon ausschließlich auf einer Seite eines stabförmigen Doppelstrangs befindet. Die Basen, die die Informationen für den Bau des Proteins tragen, sind somit durch Bindung des entsprechenden Gegenstrangs stabilisiert. An den Enden des länglichen Doppelstrangs befindet sich eine Vielzahl von „Fingern“, an denen sich jeweils eine AtGRP7-Bindestelle befindet. Die Sequenz liegt in diesem Bereich teilweise doppelsträngig, teilweise aber auch als offene Struktur in Form einer Schleife vor. Daher ist diese Region deutlich instabiler. Eine Wechselwirkung des Proteins mit seiner mRNA könnte zu einer strukturellen Veränderung der Sekundärstruktur in diesem Bereich führen. Da viele molekulare Erkennungsmechanismen nicht nur sequenz- sondern auch strukturspezifisch sind, könnten dadurch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ausgelöst werden. Dies könnte dann zu dem bereits bekannten alternativen Spleißen führen. Die Bindestelle ist in bisherigen Arbeiten jedoch noch nicht exakt eingegrenzt worden. Darüber hinaus liegen auch keine Informationen über die mögliche Sekundärstruktur vor. Dies gibt Anlass dazu, die Bindestelle genauer einzugrenzen, um in einem weiteren Schritt Aussagen über eine mögliche Sekundärstruktur machen zu können.

### **5.5.2 Modellierung des Proteins AtGRP7**

Das Protein AtGRP7 (MW=16890Da) gehört zu der Klasse der RNA-bindenden Proteine. Die bisher bekannten und eingehender untersuchten RNA-Bindeproteine zeigen alle ähnliche Sekundärstrukturen, nämlich eine  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Struktur [41]. Alle RNA-Bindeproteine weisen zwei RNA-Erkennungsmotive, so genannte RRM (RNA Recognition Motif) auf, die sich auf  $\beta_1$  und auf  $\beta_3$  befinden. Ein RRM ist eine 6 bis 8 Aminosäuren lange Sequenz, durch die ein Nukleotid spezifisch gebunden werden kann. Die Struktur von AtGRP7 ist jedoch bislang nicht röntgenkristallographisch aufgeklärt worden. Eine dreidimensionale Struktur des Proteins liegt daher nicht vor. Da aber eine Vielzahl homologer Proteine bereits strukturaufgeklärt und in einer Datenbank hinterlegt ist, können die unbekanntes Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen unter Umständen theoretisch berechnet werden. Mittels der bekannten Aminosäuresequenz des Proteins und so genannter Homologiebetrachtungen, d.h. durch Vergleiche mit den in der Datenbank bereits vorhandenen Strukturen, kann eine mögliche Struktur vorhergesagt werden [145].

```

1 MASGDVEYRC FVGGLAWATD DRALETAFQA YGDVIDSKII NDRETGRSRG
51 FGFVTFKDEK AMKDAIEGMN GQDLDRSIT VNEAQRSGSG GGGGHRGGGG
101 GGYRSGGGGG YSGGGGSYGG GGRRREGGGG YSGGGGGYSS RGGGGGSYGG
151 GRREGGGGYG GEGGGGYGGS GGGGGW

```

**Tabelle 5: Komplette Aminosäuresequenz von AtGRP7: Der gelb unterlegte Bereich kann mittels Homologiebetrachtungen strukturaufgeklärt werden, die für eine Bindung relevanten Bereiche (RRM) sind rot dargestellt.**

Somit kann die Struktur von AtGRP7 zwischen Aminosäure 9 und 89 [Tabelle 5] vorhergesagt werden [Abbildung 5.17]. Für den darauf folgenden Glycin-reichen Bereich liegen jedoch keine Informationen vor. Die theoretisch berechnete Sekundärstruktur der Aminosäuresequenz weist die bereits von anderen RNA-Bindeproteinen bekannte  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Struktur auf. Die Tertiärstruktur, d.h. die räumliche Anordnung der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter, zeigt, dass die vier  $\beta$ -Faltblätter in der Reihenfolge  $\beta_4\beta_1\beta_3\beta_2$  nebeneinander liegen. Sie bilden dadurch eine Bindetasche, in der die RNA gebunden werden kann. Zur Unterstützung der Bindungstasche wird sie von zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) flankiert. Die für die Bindung wichtigen Faltblätter  $\beta_1$  (RRM 2) und  $\beta_3$  (RRM 1) liegen in der Mitte der Bindungstasche direkt nebeneinander, so dass sie für eine Bindung gut zugänglich sind.

Bei der Bindung einer RNA oder einer DNA an das entsprechende RRM können vier charakteristische zur Bindung beitragende Wechselwirkungspunkte vorhanden sein, von denen einer auf  $\beta_1$  und drei auf  $\beta_3$  liegen: Zwei benachbarte Nucleinsäuren wechselwirken mit jeweils einem aromatischen Rest des Proteins auf  $\beta_1$  und auf  $\beta_3$ . Weitere aromatische Reste auf  $\beta_1$  und drei auf  $\beta_3$  binden hydrophob mit den beiden Zuckerringen der Nucleinsäuren, während eine positiv geladene Seitenkette eine ionische Bindung mit dem Phosphat zwischen den Basen ausbildet. Des Weiteren bilden die Seitenketten und das Rückgrat des Proteins, die sich an der Oberfläche der  $\beta$ -Faltblätter befinden, Wasserstoffbrücken mit den an der Bildung beteiligten Nucleotiden der RNA bzw. DNA aus. Die Erkennung, also die basenspezifische, selektive Bindung, erfolgt durch die Wasserstoffbrückenbindungen. Die vier charakteristischen Wechselwirkungspunkte rufen eine starke aber nicht basenspezifische Bindung zwischen Protein und Nucleinsäure hervor, wobei nicht alle vier gleichzeitig bei einer Bindung auftreten müssen.

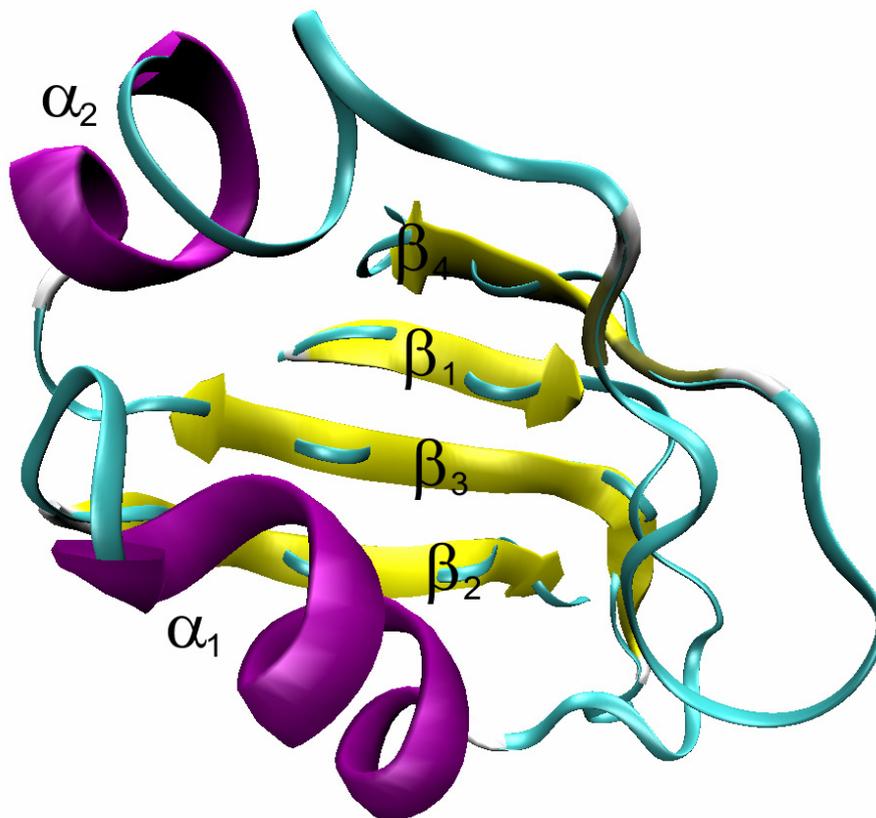


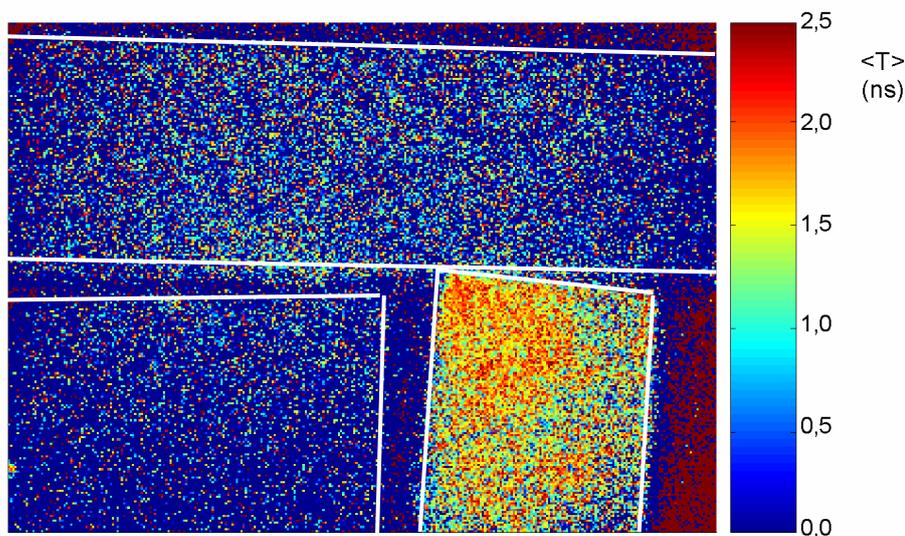
Abbildung 5.18: Die durch Homologiebetrachtungen theoretisch vorhergesagte Teilstruktur  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  des Proteins AtGRP7, visualisiert mit VMD [100].

## 5.6 Methoden zum Nachweis von Protein-RNA-Wechselwirkungen

Da die mögliche Bindestelle des Protein AtGRP7 auf der mRNA bislang nur auf 31 bzw. 32 Basen eingegrenzt werden konnte [42], soll sie durch Messungen *in vitro* auf nur wenige Basen reduziert werden. Für Messungen von Protein-Nukleinsäure-Bindungen stehen drei Techniken zur Verfügung, deren Vor- und Nachteile diskutiert werden sollen. Mit einer geeigneten Methode sollen danach die entsprechenden Messungen durchgeführt. Die im Folgenden erläuterten Techniken stehen zur Verfügung: die bereits zuvor beschriebene Messung der zeitaufgelösten UV-Fluoreszenzlebensdauer (UV-FLIM), die Gelelektrophorese und die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS).

### 5.6.1 UV-FLIM

In [Kapitel 5.4.3] ist bereits gezeigt worden, dass sich UV-Fluoreszenzlebensdauern für den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf einer Nitrocellulosemembran eignen. Sofern das Protein jedoch auch an Oligonukleotide bindet, ermöglicht UV-FLIM auch den Nachweis einer Wechselwirkung zwischen Oligonukleotiden und Proteinen. Oligonukleotide absorbieren ebenfalls bei einer Wellenlänge von 280nm; zeigen aber eine geringere Fluoreszenz als Proteine. Weil der Anteil des konstant vorhandenen Signals der Oligonukleotide geringer ist als bei den bisher vorgestellten Messungen der Protein-Protein-Wechselwirkung, erscheint es sogar einfacher, Lebensdauerunterschiede nachweisen zu können. Daher soll nun am Beispiel des Proteins AtGRP7 gezeigt werden, dass auch der Nachweis von Protein-RNA-Wechselwirkungen möglich ist.



**Abbildung 5.19:** Falschfarbendarstellung der mittleren UV-Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  des auf Nitrocellulosemembran immobilisierten RNA-Oligonukleotids aus dem 3' UTR (links). Diese wird mit dem bindenden Protein AtGRP7 inkubiert (rechts). Als Negativkontrolle wird sie ebenfalls mit HSA inkubiert (oben).

Dazu wird das RNA-Oligonukleotid aus dem 3' UTR der mRNA des Proteins AtGRP7 in einer Konzentration von 100 $\mu$ M auf der Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die Membran wird mit PBST gewaschen und in drei Teile geschnitten. Ein Teil der

Membran wird mit dem RNA-bindenden und in PBST gelösten Protein 10µg/ml AtGRP7 inkubiert, ein weiterer wird mit 10µg/ml HSA inkubiert und dient als Negativkontrolle. Zum Vergleich wird eine Membran lediglich in PBST gelegt. Nach einer Stunde Inkubationszeit werden dann alle Nitrocellulosemembranen erneut mit PBST gewaschen. Die Messung und die Berechnung der mittleren Lebensdauer erfolgt nach dem üblichen Verfahren.

[Abbildung 5.19] zeigt ein Falschfarbenbild der mittleren Lebensdauer  $\langle T(x,y) \rangle$  der zuvor beschriebenen drei Nitrocellulosemembranen auf einer Zeitskala von 0 bis 2,5ns. Es ist klar zu erkennen, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer  $\langle T \rangle$  der Membran mit dem inkubierten AtGRP7-Protein (rechts) mit ungefähr 1,63ns signifikant von der Lebensdauer der Membran, auf der sich lediglich das RNA-Oligonukleotid befindet (links), mit einer Lebensdauer von 0,25ns unterscheidet. Dieser Unterschied ist auf das Protein AtGRP7 zurückzuführen und zeigt, dass eine Bindung des Proteins an die RNA stattgefunden hat. HSA dient als Negativkontrolle, das nicht spezifisch an die immobilisierte RNA bindet. Daher zeigt die Nitrocellulosemembran, die mit HSA inkubiert wurde (oben), keinen signifikanten Unterschied zur Lebensdauer der RNA. Es kann also mittels UV-FLIM gezeigt werden, dass das Protein AtGRP7 an die immobilisierte RNA gebunden hat. Die Bindung des Proteins führt zu einer deutlichen Änderung der Lebensdauer.

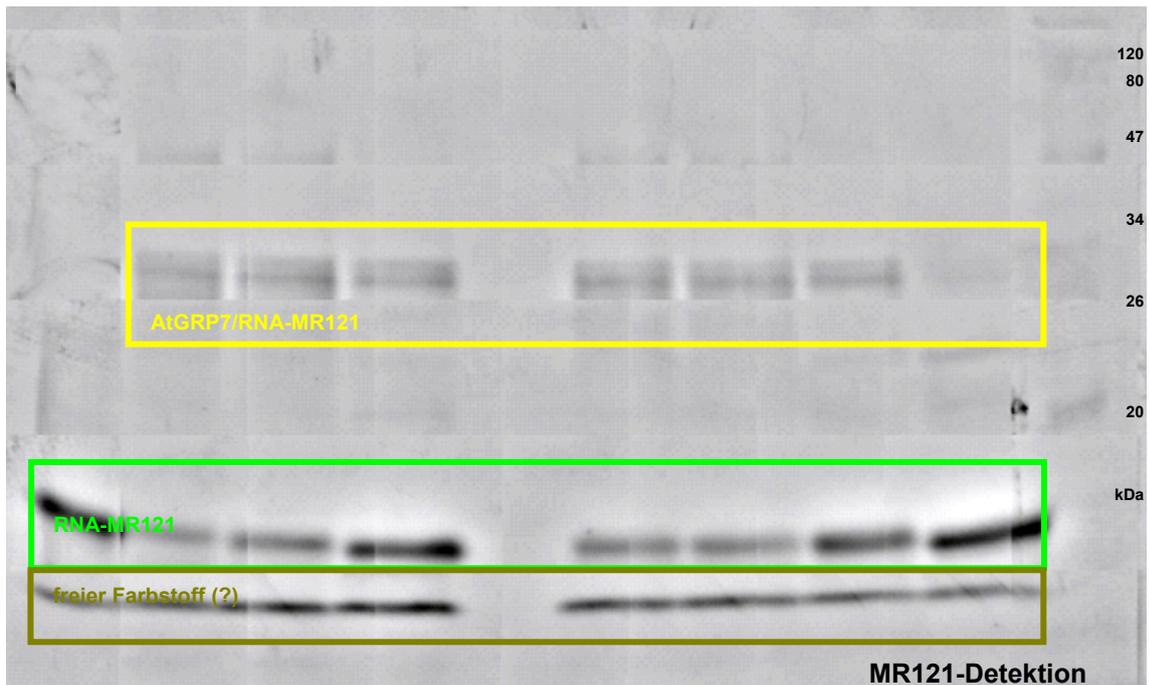
### 5.6.2 Gelelektrophorese

Eine weitere Nachweismethode einer RNA-Protein-Bindung stellt die Gelelektrophorese dar. Die Elektrophorese ist ein analytisches Standardverfahren in der Chemie und Molekularbiologie. In den hier vorgestellten Experimenten wird ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel verwendet. Die Diskontinuität bezieht sich dabei auf unterschiedliche pH-Werte der benutzten Puffer, wodurch eine höhere Bandenschärfe erreicht wird. Als Analyten werden farbstoffmarkierte RNA-Oligonukleotide und das Protein AtGRP7 eingesetzt. Zur Stabilisierung einer Protein-RNA-Komplexierung werden die Ansätze durch UV-Crosslinking vernetzt. Die Gele werden von unseren Kooperationspartnern im SFB 613 hergestellt. Das entsprechende Protokoll befindet sich im Anhang.

Durch Detektion von Farbstoff- und nativer Fluoreszenz ist es möglich, ungebundene Moleküle und Molekülkomplexe bestehend aus RNA und AtGRP7 zu identifizieren. Dazu wird das bereits etablierte Verfahren zur UV-Detektion der nativen Fluoreszenz [24] um die Möglichkeit der Farbstoffanregung und -detektion erweitert. Der experimentelle Aufbau für UV-Fluoreszenzlebensdaueremessungen wird dazu dahingehend modifiziert, dass der zeitaufgelöste Bildverstärker und die CCD-Kamera durch eine UV-sensitive CCD-Kamera (DU434-BU2; Andor Technology) ersetzt werden. Darüber hinaus werden zwei Verschiebetische zur Probenpositionierung genutzt, die die Positionierung einzelner Segmente des ca. 10cm x 10cm großen Gels im 1cm x 1cm großen Detektionsbereich erlauben. Es wird eine Serie von Einzelbildern mit einer Belichtungszeit von je 1s aufgenommen, bei der das gesamte Gel schrittweise durch den Detektionsbereich bewegt wird. Die Einzelbilder werden anschließend zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Wie bei den Lebensdaueremessungen beträgt die UV-Anregungswellenlänge 280nm. Die Fluoreszenz wird im Bereich von 300 bis 375nm detektiert. Für die Farbstoffdetektion wird ein frequenz-stabilisierter Helium-Neon-Laser mit 1mW Leistung (05-STP-903; Melles Griot) verwendet. Die Detektion der Farbstofffluoreszenz erfolgt mit derselben Optik unter Verwendung eines geeigneten Emissionsfilters für den Bereich zwischen 655 und 695nm.

[Abbildung 5.20] zeigt die Fluoreszenz des MR121-Farbstoffes (oben) und die native UV-Fluoreszenz (unten). Das Gel enthält 10 so genannte Spuren, die von oben nach unten gelaufen sind. Das bedeutet, dass die Probe am oberen Bildrand des Gels aufgegeben wurde und sich die Moleküle auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität in Richtung des unteren Bildrandes bewegt haben. Moleküle mit geringer Mobilität, d.h. schwerere Moleküle, befinden sich daher im oberen Teil des Gels, während sich die leichteren Moleküle im unteren Teil des Gels befinden. Zur Quantifizierung der Massen befindet sich in Spur 10 ein Proteinmarker (#SM0441; Fermentas), dessen Banden einer entsprechenden Masse zuzuordnen sind und somit als Orientierung dienen.

In Spur 1 und 5 sind die mit dem Farbstoff MR121-markierte RNA bzw. das Protein AtGRP7 aufgegeben worden. In den Spuren 2 bis 4 befinden sich die RNA, AtGRP7 und eine unspezifische tRNA in ansteigender Konzentration. Analog dazu enthalten die Spuren 6 bis 9 zusätzlich zur Farbstoff-markierten RNA und zum Protein AtGRP7 die unmarkierte RNA ohne Farbstoff – ebenfalls mit ansteigender Konzentration.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nur RNA Oligo	AtGRP7 + 100ng tRNA	AtGRP7 + 1µg tRNA	AtGRP7 + 10µg tRNA	nur AtGRP7	AtGRP7 + 10ng Oligo o.F.	AtGRP7 + 100ng Oligo o.F.	AtGRP7 + 1µg Oligo o.F.	AtGRP7 + 10µg Oligo o.F.	Proteinmarker
	tRNA-Konzentration				Oligo-Konzentration				

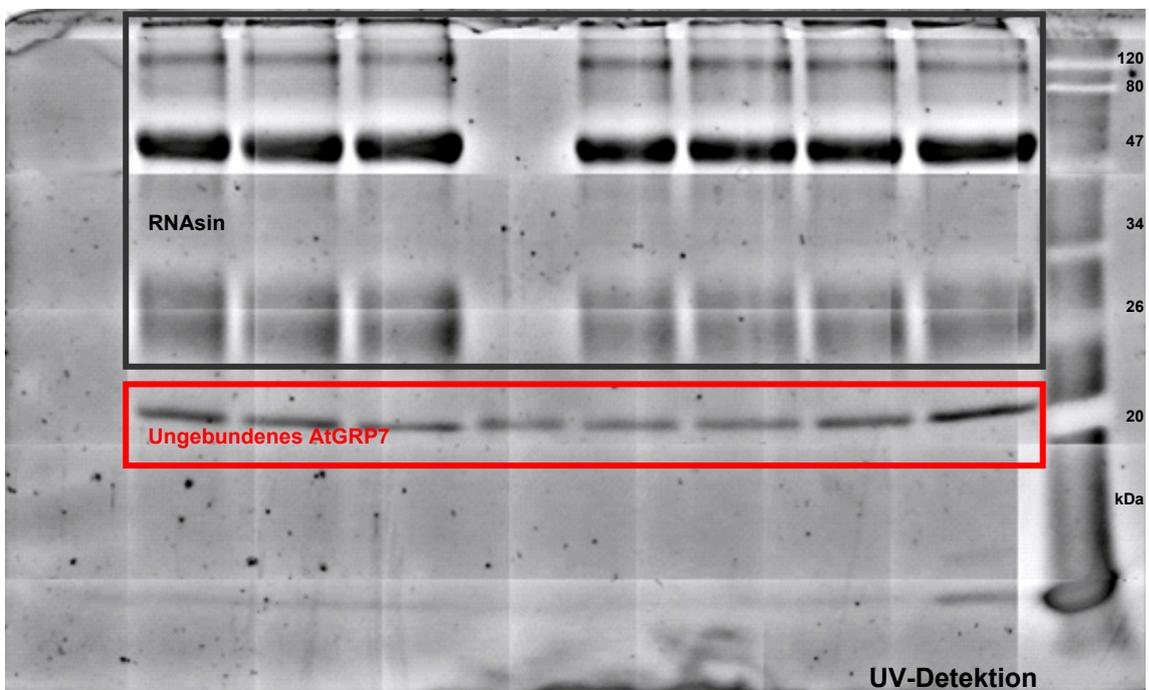


Abbildung 5.20: MR121- (oben) und native UV-Detektion (unten) von MR121-Farbstoffmarkierter RNA und dem Protein AtGRP7 in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel.

Spur 1 zeigt eine deutliche, schmale Bande der Farbstoff-markierten RNA durch die MR121-Detektion (grün). Zusätzlich ist noch eine weitere Bande vorhanden (braun), die eventuell auf freien Farbstoff, der durch RNase-Aktivität entstanden ist, zurückzuführen ist. Spur 5 zeigt eine ebenfalls deutliche Bande des Proteins AtGRP7 durch die UV-Detektion (rot). Andererseits sind die RNA bei der UV-Detektion und das Protein bei der Farbstoff-Detektion nicht zu erkennen. In den Spuren 2 bis 4 bzw. 6 bis 9 ist zur Vermeidung von RNase-Aktivität der RNase Inhibitor RNasin (Eppendorf) hinzugegeben. Diese Proteinmischung führt zu einem deutlichen Signal bei der UV-Detektion (schwarz). Auf Grund der größeren Masse der Moleküle befindet sich das RNasin im oberen Teil des Gels, die Banden des AtGRP7 sind dadurch ungestört zu beobachten (rot). Der RNA-AtGRP7-Komplex lässt sich durch die Farbstoff-Detektion gut erkennen (gelb). Bei diesen Versuchen werden Verdrängungsexperimente mit einer unspezifischen tRNA (heterologer Kompetitor) und mit der vermeintlich spezifisch bindenden RNA – jedoch ohne Farbstoff-Markierung – (homologer Kompetitor) durchgeführt. Bei der MR121-Detektion kann man zusätzlich zur ungebundenen RNA eine Bande bei ca. 28kDa erkennen. Die Fluoreszenz des Proteins ist leider nicht ausreichend, um dieses durch UV-Detektion nachzuweisen. Die Masse deutet auf einen AtGRP7-RNA-Komplex hin, wodurch eine Bindung der RNA an das Protein AtGRP7 gezeigt wird. Diese RNA im Komplex lässt sich durch 10µg RNA-Oligo ohne Farbstoff verdrängen, so dass in der Farbstoff-Detektion in Spur 9 kein Komplex mehr zu erkennen ist. Entsprechend findet man in der UV-Detektion mehr ungebundenes AtGRP7, d.h. eine dunklere Bande. Bei den Verdrängungsexperimenten mit tRNA in den Spuren 2 bis 4 findet jedoch keine Verdrängung des AtGRP7-RNA-Komplexes statt. Selbst bei hohen Konzentrationen des heterologen Kompetitors findet noch eine Bindung zwischen RNA und AtGRP7 statt. Das bedeutet, dass es sich um eine spezifische Bindung mit deutlich höherer Affinität als bei einer unspezifischen tRNA-AtGRP7-Wechselwirkung handelt.

Das vorgestellte Verfahren der Zweifarbandetektion von Farbstoff-markierter RNA und nativer Fluoreszenz von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel führt zu dem Ergebnis, dass die RNA spezifisch an das Protein AtGRP7 bindet. Die Gelelektrophorese benötigt aber wie das UV-FLIM sehr große Probenmengen – sowohl von der RNA als auch vom Protein. Diese stehen jedoch für die Vielzahl der angestrebten Versuche nicht zur Verfügung. Die in diesen Versuchen eingesetzten Proteinmengen von mehreren Mikrogramm pro Spur zeigen die Nachweisgrenze für einen AtGRP7-RNA-Komplex auf. Darüber hinaus ist das Verfahren zeitaufwendig. Während der langen

Durchführungsdauer von ca. 1 Stunde kann die RNA bereits durch eine eventuelle RNase-Aktivität degeneriert sein. Nichtsdestotrotz stellt die Gelelektrophorese ein wichtiges und anerkanntes Verfahren in der Biologie dar. In diesem Experiment kann aber mit einem Standardverfahren der Nachweis erbracht werden, dass das AtGRP7 spezifisch RNA bindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bei den UV-FLIM-Messungen als auch bei den Elektrophoresegelelektrophorese eine große Menge der Probe – sowohl des Proteins AtGRP7 als auch des Oligonukleotids – eingesetzt werden muss. Da das Protein nicht kommerziell erhältlich ist, sondern von unserem Kooperationspartner im SFB 613 aufwendig hergestellt und aufgereinigt werden muss und somit nicht in großen Mengen, wie sie für eine ausführliche Versuchsreihe notwendig sind, zur Verfügung steht, muss auf empfindlichere Nachweismethoden zurückgegriffen werden. Die Anforderungen sind dabei, eine möglichst geringe Probenmenge sensitiv und selektiv nachzuweisen. Darüber hinaus ist der Zugang zu weiteren Parametern neben der Bindungsstärke anzustreben. Das Verfahren sollte möglichst robust sein und die Wechselwirkung zwischen Oligonukleotid und Protein nicht stören.

### ***5.7 Nachweis der Bindung von AtGRP7 an RNA-Oligonukleotide***

Da die Bindung des Proteins an seine mRNA basenspezifisch ist, konzentrieren sich die folgenden Untersuchungen nur auf eine der beiden Bindungsregionen. Dazu wird im ersten Schritt die Sequenz mit der höchsten Bindungsaffinität bestimmt. Dann wird untersucht, ob das Protein auch an die entsprechende DNA bindet, da die DNA gegenüber der RNA eine höhere Resistenz gegen enzymatischen Abbau aufweist. Die Eingrenzung der Bindesequenz wird mit DNA durchgeführt. Abschließend wird die 13 Basen lange RNA-Sequenz, welche die vollständige Bindesequenz enthält, auf Konformationsänderungen hin untersucht.

Die beiden Sequenzen, an die das Protein AtGRP7 bindet, sind in [Tabelle 6] aufgeführt. Die Sequenz aus dem 3' UTR ist um eine Base länger und mit einem Molekulargewicht von 10892Da auch schwerer als die aus der 2. Hälfte des Introns mit

einem Molekulargewicht von 10575Da. An die RNA-Oligonukleotide ist der Farbstoff MR121 über einen C3-Aminolink am 5'-Ende kovalent gekoppelt.

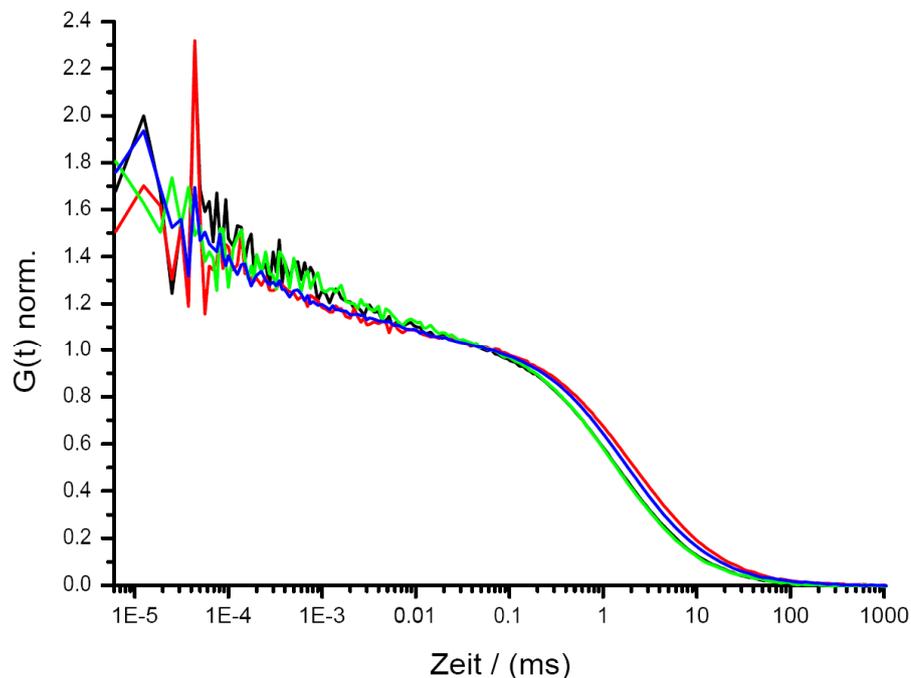
Position	Sequenz
<b>2. Hälfte des Introns</b> (Rest 426 bis 456)	5' -UUC AGU UUU GUU GGA UUG UUU UGC UGA UCU G-3'
<b>3' UTR</b> (Rest 979 bis 1010)	5' -AUU UUG UUC UGG UUC UGC UUU AGA UUU GAU GU-3'

**Tabelle 6: Bindestellen des Proteins AtGRP7 an seine RNA mit den entsprechenden Sequenzen**

Die Bindung des Proteins AtGRP7 an die RNA-Oligonukleotide wird durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht. Die dabei gemessene Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen, die proportional zum hydrodynamischen Radius ist, ist unter der Annahme einer homogenen Massenverteilung proportional zur dritten Wurzel der Masse des Moleküls. Geringe Massenunterschiede lassen sich daher nicht signifikant nachweisen. Betrachtet man jedoch die Bindung der RNA an AtGRP7, so nimmt die Masse des Komplexes um den Faktor 2,6 im Vergleich zur RNA zu. Daraus ergibt sich eine theoretisch vorhergesagte Zunahme der Diffusionszeit um den Faktor 1,3 bis 1,4, die mittels FCS-Messungen auflösbar ist. Eine genauere Abschätzung ist gerade bei biologischen Makromolekülen, die auf Grund ihrer Tertiärstruktur eine individuelle Form haben, nicht möglich. Darüber hinaus lässt sich der absolute hydrodynamische Radius nur schwer theoretisch vorhersagen.

[Abbildung 5.21] zeigt die Korrelationsfunktionen der beiden farbstoffmarkierten RNA-Oligonukleotide mit und ohne Protein AtGRP7. Die Korrelationskurven der beiden RNA-Oligonukleotide aus dem 3' UTR (schwarz) bzw. der 2. Hälfte des Introns (grün) zeigen keinen Diffusionszeitunterschied. Die Massendifferenz reicht nicht aus, um mit der FCS nachgewiesen zu werden. Wird zu der Lösung der RNA-Oligonukleotide AtGRP7 hinzu gegeben, so führt dies zu einem Anstieg der Diffusionszeit des Komplexes bestehend aus der RNA aus dem 3' UTR und AtGRP7 (rot) sowie RNA aus der 2. Hälfte des Introns und AtGRP7 (blau). Dies ist auf eine Bindung des Proteins an die RNA zurückzuführen. Die Komplexbildung führt zu einer Massenzunahme, die wiederum die Zunahme der Diffusionszeit verursacht. Obwohl die beiden RNA-Oligonukleotide vor der Zugabe von AtGRP7 fast identische Diffusionszeiten aufweisen, unterscheiden sich die Diffusionszeiten nach der Zugabe der gleichen

Menge AtGRP7 deutlich. Entweder werden die in der Lösung vorhandenen Oligonukleotide unterschiedlich stark gebunden oder die entstandenen Komplexe weisen unterschiedliche hydrodynamische Radien auf.



**Abbildung 5.21: Korrelationsfunktion der Farbstoff-markierten RNA aus dem 3' UTR (schwarz) mit AtGRP7 (rot), sowie aus der 2. Hälfte des Introns (grün) – ebenfalls mit AtGRP7 (blau). AtGRP7 bindet an beide untersuchten Sequenzen, erkennbar an der Zunahme der Diffusionszeit und einer geringfügigen Konformationsänderung.**

Bei der Bindung wechselwirken das Protein AtGRP7 und die Nukleinsäureketten miteinander, so dass es zu Konformationsänderungen der RNA kommen kann. Der Vergleich der Korrelationskurven zeigt, dass sich die Konformationsdynamik durch die Bindung nur geringfügig ändert (siehe FCS-Kurve im Bereich  $< 100\mu\text{s}$ ). Es sind drei Erklärungen möglich: Beide Sequenzen bilden Sekundärstrukturen mit hohen Bindungsenergien  $\Delta G$  aus. Bindet das Protein an die Sequenzen, übt es eine Kraft auf die Nukleinsäurekette aus. Diese reicht aber unter Umständen nicht aus, um signifikante Änderungen in der Farbstoffumgebung hervorzurufen. Auch kann die Sequenz bereits in der für eine Bindung beinahe optimalen Konformation vorliegen. Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass der Farbstoff von der eigentlichen Bindungsstelle sehr weit entfernt ist und eine Bindung somit keinen Einfluss auf dessen Umgebung hat.

### 5.7.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_d$

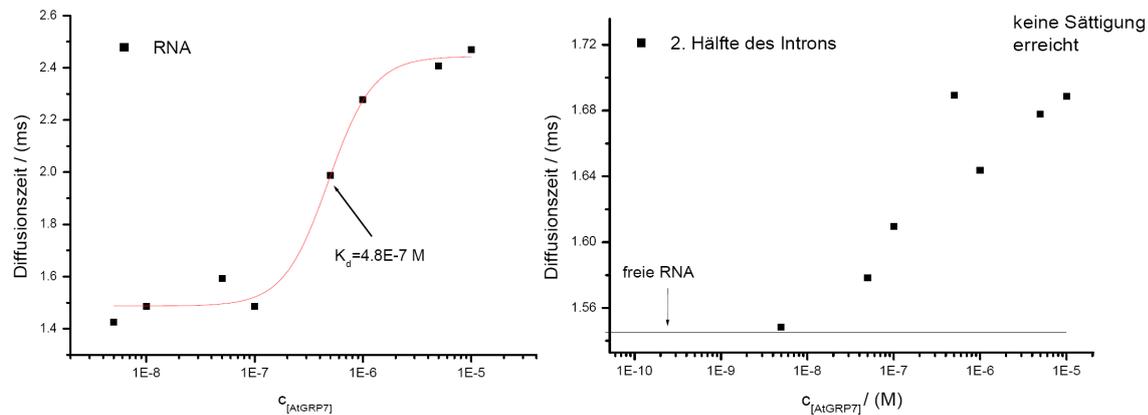
Im Folgenden wird die Bindung des Proteins AtGRP7 an seine bislang bekannten RNA-Bindungsregionen genauer untersucht. Um die Bindung des Proteins an die Sequenzen zu quantifizieren, wird die Bindungsstärke (Affinität) in Form der Dissoziationskonstante  $K_d$  im Gleichgewicht bestimmt.

Um die Dissoziationskonstante zu bestimmen, wird eine Titration des Proteins AtGRP7 durchgeführt. Dazu werden  $10^{-9}$ M Farbstoff-markierte RNA-Oligonukleotide zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteins AtGRP7 vermessen. Im Allgemeinen wird dabei ein Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-8}$  und  $10^{-5}$ M verwendet. Ein Bindungsparameter, wie z.B. die Diffusionszeit, wird gegen den Logarithmus der Proteinkonzentration aufgetragen. Dieser Parameter zeigt einen sigmoidalen Verlauf mit zwei Sättigungsniveaus. Das eine Niveau entspricht dem Zustand, dass fast alle RNA-Oligonukleotide auf Grund einer zu geringen AtGRP7-Konzentration ungebunden sind. Das andere Niveau bedeutet, dass fast alle Oligonukleotide vom Protein gebunden sind. Die so genannte Bindungsisotherme (auch Titrationskurve genannt) geht von einem Niveau zum anderen über, aus dessen Wendepunkt die Dissoziationskonstante unmittelbar abgelesen werden kann.

Zum Fitten der Daten wird ein zweidimensionales Diffusionsmodell [Gleichung 4.10] angenommen. Im realen System hat diese zweidimensionale Ebene trotz des konfokalen Prinzips eine endliche Dicke. Daher müsste eigentlich ein dreidimensionales Diffusionsmodell beim Anfiten der Fluoreszenzkorrelationsfunktion angenommen werden. [Abbildung 4.7] zeigt aber, dass sich die Daten sehr gut mit einem zweidimensionalen Modell beschreiben lassen. Außerdem wird der so genannte „stretched exponential“-Fit verwendet, auf dessen besondere Bedeutung später genauer eingegangen wird.

Die Diffusionszeiten der Komplexe sind in Abhängigkeit vom Logarithmus der Konzentration von AtGRP7 in [Abbildung 5.22] dargestellt. Die Kurve zeigt für die RNA aus dem 3' UTR einen sigmoidalen Verlauf mit einem unteren Niveau von ungefähr 1,5ms für das freie RNA-Oligonukleotid und einem oberen Niveau von ungefähr 2,5ms für den RNA-AtGRP7-Komplex. Aus dem Wendepunkt der sigmoidalen Fitfunktion lässt sich für die 3' UTR-Sequenz die Dissoziationskonstante  $K_d=(4,89\pm 0,56)\cdot 10^{-7}$ M bestimmen. Für das RNA-Oligonukleotid aus der 2. Hälfte des Introns kann aus der

Titrationen keine Dissoziationskonstante bestimmt werden, weil die Kurve keine Sättigung erreicht. Inwiefern eine Sättigung mit geringfügig höheren Proteinkonzentrationen erreicht werden kann, kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeschätzt werden.



**Abbildung 5.22: Titrationen des RNA-Oligonukleotids aus dem 3' UTR, das an das Protein AtGRP7 bindet (links) und aus der 2. Hälfte des Introns, die keine Sättigung erreicht (rechts).**

Auffällig ist jedoch, dass die Diffusionszeit maximale Werte mit 1,7ms erreicht, während der Komplex aus 3' UTR-RNA und AtGRP7 eine Diffusionszeit von ~2,4ms aufweist. Da man aber davon ausgehen kann, dass die untersuchten RNA-AtGRP7-Komplexe vergleichbare Diffusionszeiten haben, scheint man bei der Titration der RNA aus der 2. Hälfte des Introns noch eine Größenordnung von einer Sättigung entfernt zu sein. Diese könnte vor dem Hintergrund dieser Überlegung bei einer  $10^{-4}M$  AtGRP7-Konzentration erreicht werden.

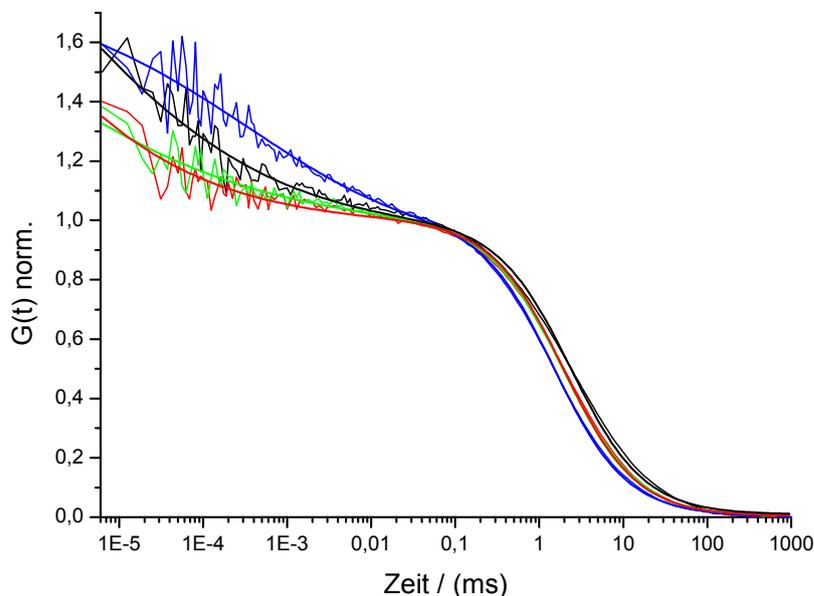
Auf Grund dieser Ergebnisse beschränken sich die weiteren Arbeiten auf die besser bindende RNA-Sequenz aus dem 3' UTR-Bereich.

### 5.7.2 Untersuchung der Bindung einer doppelsträngigen RNA

Zunächst soll mit Hilfe der Diffusionszeit der Moleküle durch das Beobachtungsvolumen die Frage beantwortet werden, ob die mRNA als einzelsträngiges oder doppelsträngiges Oligonukleotid vorliegen, damit es vom Protein AtGRP7 erkannt und gebunden werden kann. Dabei geht man davon aus, dass sich die

Diffusionszeiten der Molekül(-komplexe) ausreichend unterscheidend, um signifikante Aussagen über die Zusammensetzung machen zu können.

Dazu werden verschiedene FCS-Messungen mit dem RNA-Oligonukleotid aus dem 3' UTR und dem komplementären Strang, der als DNA vorliegt, durchgeführt. Das RNA-Oligonukleotid liegt in der Konzentration  $10^{-9}\text{M}$ , die komplementäre Sequenz im 10-fachen Überschuss, also  $10^{-8}\text{M}$ , und das Protein AtGRP7 in der Konzentration  $10^{-6}\text{M}$  vor. Es werden die RNA alleine und zusammen mit der komplementären DNA jeweils mit und ohne Zugabe von AtGRP7 gemessen und die Korrelationsfunktionen berechnet.



**Abbildung 5.23:** Korrelationsfunktionen der 3' UTR-RNA (blau), RNA-DNA (grün), RNA-AtGRP7 (schwarz), sowie RNA-DNA+AtGRP7 (rot).

In [Abbildung 5.23] sind die Korrelationsfunktionen der 4 Messungen zusammen mit der jeweiligen Fitfunktion dargestellt. Die Diffusionszeit der Moleküle bzw. Molekülkomplexe ist auf Grund ihrer hydrodynamischen Radien unterschiedlich. Für die RNA alleine (blau) misst man eine Diffusionszeit von  $1,49 \pm 0,07\text{ms}$ , die mit der zuvor durchgeführten Messung [Kapitel 5.7.1] übereinstimmt. Die Messung der RNA mit komplementärer DNA (grün) ergibt eine Diffusionszeit von  $1,92 \pm 0,07\text{ms}$ , die sich deutlich von der der RNA unterscheidet. Damit kann gezeigt werden, dass RNA und DNA tatsächlich zu einem Doppelstrang hybridisiert sind. Für das RNA-Oligonukleotid

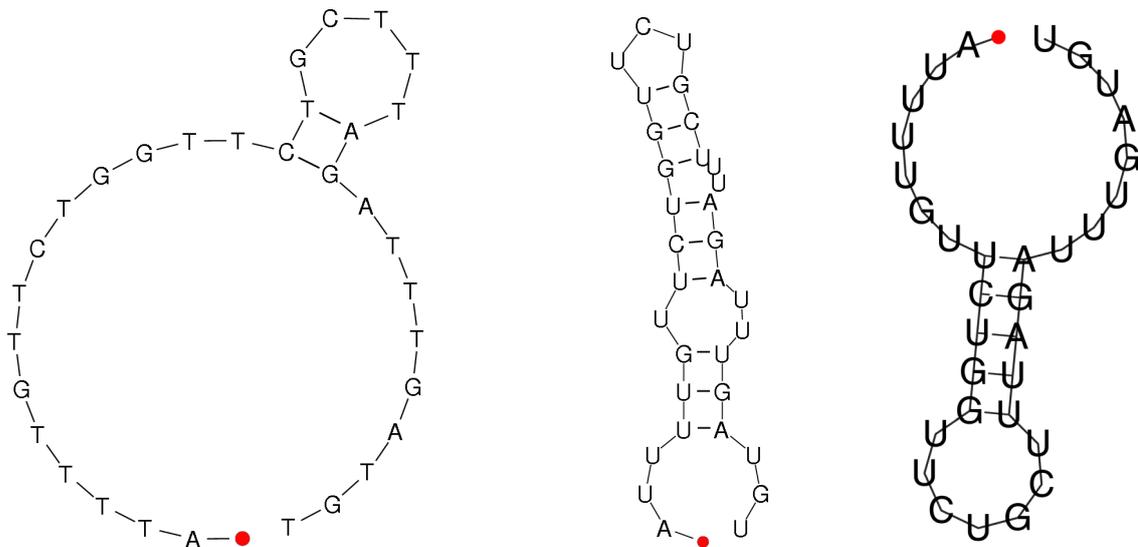
mit dem Protein AtGRP7 (schwarz) erhält man eine Diffusionszeit von  $2,39 \pm 0,1$ ms, was ebenfalls in guter Übereinstimmung mit der vorherigen Messung ist.

Für die Diffusionszeit der Messung der RNA mit komplementärer DNA sowie dem Protein AtGRP7 kann man sich im Wesentlichen die folgenden Ergebnisse vorstellen: Eine Möglichkeit ist, dass die Diffusionszeit noch größer ist als die des RNA-AtGRP7-Komplexes. Dies würde bedeuten, dass das Protein an das RNA-DNA-Hybrid gebunden hat ohne es zu zerstören. Darüber hinaus kann das Hybrid aber durch Bindung des Proteins getrennt werden, so dass die gleiche Diffusionszeit wie bei einem RNA-AtGRP7-Komplex zu erwarten wäre. Eine Möglichkeit besteht aber auch darin, dass das Protein keine doppelsträngig vorliegende RNA bindet. Somit wäre die gemessene Diffusionszeit die gleiche wie beim RNA-DNA-Komplex. Tatsächlich misst man  $1,94 \pm 0,06$ ms, also keine Veränderung der Diffusionszeit gegenüber dem RNA-DNA-Komplex. Dadurch kann gezeigt werden, dass das Protein AtGRP7 nur einzelsträngige Oligonukleotide bindet.

Ein weiterer Parameter für diese Untersuchungen kann die Konformationsdynamik der RNA sein. Diese Konformationsdynamik geht im Wesentlichen aus der Löschkinetik des Farbstoffs MR121 hervor, der – je nach Konformation des Oligonukleotids – stärker oder schwächer durch die Guanosin-Basen gelöscht wird. Besonders deutlich wird dieser Effekt, wenn die freie RNA durch die komplementäre DNA zu einem steifen Doppelstrang hybridisiert wird: Die freie RNA weist eine starke Fluoreszenzlöschkinetik des Farbstoffs auf (blau), während beim RNA-DNA-Doppelstrang fast gar keine Fluoreszenzfluktuationen auf der kurzen Zeitskala zu beobachten sind (grün bzw. rot). Der RNA-AtGRP7-Komplex zeigt neben der längeren Diffusionszeit auch eine deutlich andere Konformationsdynamik als die freie RNA. Diese Änderung ist sogar noch deutlicher zu sehen als der Unterschied in der Diffusionszeit.

## 5.8 Nachweis der Bindung von AtGRP7 an DNA-Oligonukleotide

Das Arbeiten mit RNA bedarf einer besonderen Sorgfalt, und bei der Auswertung der Daten ist zu beachten, dass es zu jeder Zeit der Probenvorbereitung zu einer RNase-Kontamination kommen kann. RNase zerlegt die RNA durch Verdau in ihre Monomere – also einzelne Nukleotide – und verkürzt damit die Sequenz. Das führt zu einer Verkürzung der Diffusionszeit, Verringerung der Bindungsaffinität und kann fälschlicherweise z.B. als schwach oder nicht bindend interpretiert werden. Ob eine RNase-Kontamination vorliegt wird daher durch Kontrollmessungen während und am Ende der verschiedenen Messungen der Titration überprüft. Dazu wird die Diffusionszeit der RNA mit der zu Beginn der Messung ermittelten verglichen. So kann sichergestellt werden, dass eine schwache oder gar keine Bindung nicht auf den Verdau des RNA-Oligonukleotids durch RNase zurückzuführen ist.



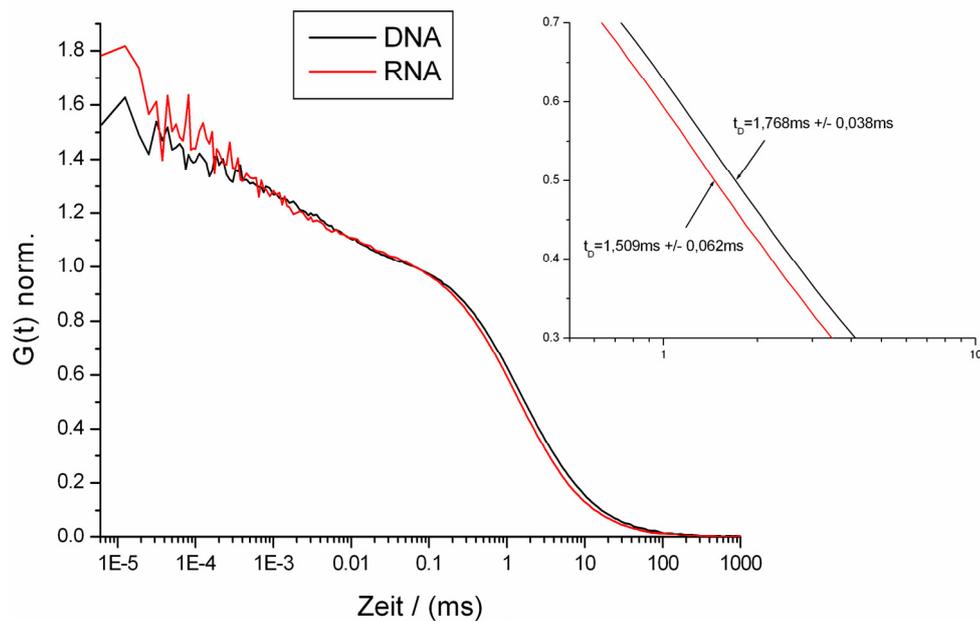
**Abbildung 5.24:** Mit MFOLD modellierte Sekundärstrukturen der Bindungsregion aus dem 3' UTR: Sequenz als DNA-Oligonukleotid (links) und als RNA-Oligonukleotid (Mitte). Zusätzlich die mit RNashapes modellierte Struktur des RNA-Oligonukleotids (rechts).

Um solche Probleme zu umgehen, bietet es sich an, die Messungen anstatt mit RNA-Oligonukleotiden mit DNA-Oligonukleotiden durchzuführen. DNA und RNA sind chemisch sehr ähnlich. Es gibt lediglich geringe Unterschiede in einer Base und im Zucker. Sollte aber das Protein AtGRP7 ebenfalls DNA binden, so könnte der

enzymatische Verdau durch RNasen ausgeschlossen werden. Außerdem lassen sich diese Untersuchungen kostengünstiger durchführen, da DNA-Oligonukleotide wesentlich günstiger synthetisiert werden können.

Molekulare Unterschiede zwischen RNA und einzelsträngiger DNA führen zu unterschiedlichen Sekundärstrukturen. Um die Sekundärstruktur der RNA und der entsprechenden DNA aufzuzeigen, werden Strukturmodelle mittels MFOLD und RNASHAPES erstellt. Die Ergebnisse sind in [Abbildung 5.24] dargestellt, wobei die Position des Farbstoffes MR121 durch einen roten Punkt markiert ist. Ein eventueller Einfluss des Farbstoffes kann bei den verwendeten Modellen jedoch nicht berücksichtigt werden. Die Modelle spiegeln die stärkere Faltung von RNA gegenüber DNA wider. So werden von MFOLD für die DNA lediglich 2 Basenpaarungen vorhergesagt, während es bei der RNA 9 sind. Daraus resultiert ein großer Unterschied in der Sekundärstruktur: Die DNA ist weitestgehend – bis auf einen kleinen Loop (ein so genanntes Hairpin) – unstrukturiert. Die RNA zeigt dahingegen eine längliche stabähnliche Form. Die Modellierung mittels RNASHAPES liefert ebenfalls mehr Basenpaare als die DNA. Die Form ist aber nicht so länglich wie bei der MFOLD-Vorhersage. Die Unterschiede sind auf die verwendeten Algorithmen zurückzuführen, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden soll. Es bleibt aber festzuhalten, dass die DNA eher zu einer unstrukturierten Sekundärstruktur tendiert, während die RNA eher zu ausgebildeten Sekundärstrukturen neigt. Die unterschiedlichen Sekundärstrukturen des Oligonukleotide können zu verschiedenen hydrodynamischen Radien führen.

Um den Einfluss der Strukturunterschiede auf die Korrelationskurven zu untersuchen, werden die RNA- und DNA-Oligonukleotide in  $10^{-9}$ M Konzentration mittels FCS vermessen. Die entsprechenden Korrelationsfunktionen der Fluoreszenzfluktuationen sind als Vergleich in [Abbildung 5.25] dargestellt. Diese zeigen einen geringen Diffusionszeitunterschied von  $1,51 \pm 0,06$ ms für die RNA zu  $1,77 \pm 0,04$ ms für die DNA. Die DNA ist mit einem Molekulargewicht von 10578Da um 314Da leichter als die entsprechende RNA. Daher müsste die Diffusionszeit der DNA kürzer als die der RNA sein. Die experimentellen Daten zeigen aber eine Diffusionszeitzunahme. Die Ursache dafür liegt jedoch nicht in dem Massenunterschied der Moleküle, weil sich der Diffusionszeitunterschied nicht durch die Massendifferenz erklären lässt.

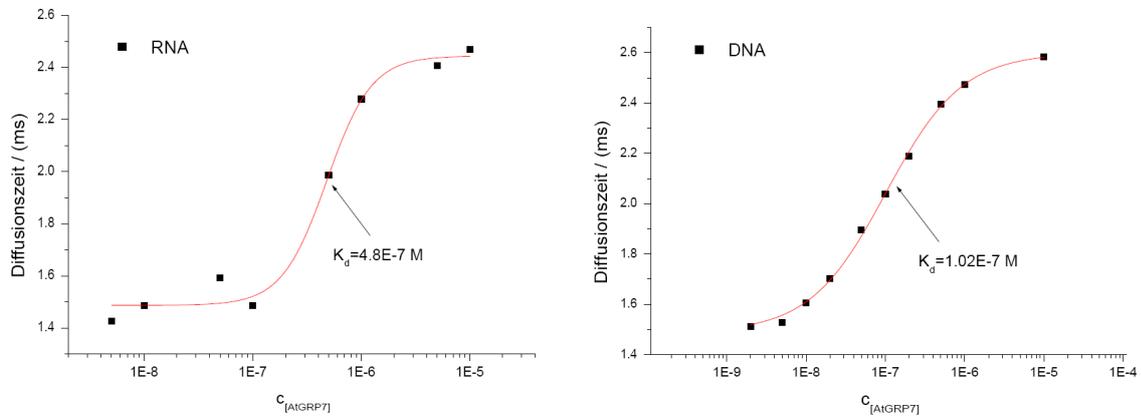


**Abbildung 5.25: Korrelationsfunktionen des RNA- und des entsprechenden DNA-Oligonukleotids. Eine Vergrößerung macht die Diffusionszeitunterschiede deutlich.**

Die Diffusionszeit ist direkt proportional zum hydrodynamischen Radius  $\tau_D \sim R$ . Aus der experimentellen Beobachtung lässt sich schließen, dass die geometrische Approximation einer Nukleinsäurekette durch eine homogene Kugel, wie man sie a priori theoretisch annehmen kann, hier nicht zulässig ist. Der hydrodynamische Radius kann also nicht immer durch die einfache Näherung, d.h. durch eine Funktion der Masse des Moleküls, beschrieben werden. Vielmehr ist die räumliche Ausdehnung der Moleküle zu berücksichtigen. Da sich die Sekundärstruktur der RNA wesentlich von der Struktur der DNA unterscheidet, weisen sie verschiedene hydrodynamische Radien  $R$  auf. Dieser Unterschied führt dann wiederum zwangsläufig zu unterschiedlichen Diffusionszeiten. Aus den Modellen der DNA- und RNA-Oligonukleotide kann gefolgert werden, dass die Diffusion der DNA durch ihre größere räumliche Ausdehnung langsamer ist als die der RNA, die eine kompakte stabähnliche Struktur aufweist.

Um zu untersuchen, ob AtGRP7 auch das DNA-Oligonukleotid bindet und wie sich Strukturunterschiede auf die Bindungsaffinität des DNA- bzw. RNA-Oligonukleotids auswirken, wird die AtGRP7-Konzentration variiert. Dazu wird die Korrelationsfunktion des DNA-Oligonukleotids bei unterschiedlichen AtGRP7-Konzentrationen gemessen. Aus den Korrelationsfunktionen wird wie bereits zuvor für das (3' UTR-)RNA-Oligonukleotid die Diffusionszeit bestimmt und gegen den Logarithmus der Konzentration des Proteins aufgetragen [Abbildung 5.26]. Analog zur Bestimmung der

Affinität beim RNA-Oligonukleotid findet man hier für das DNA-Oligonukleotid  $K_d=(1,02\pm 0,07)\cdot 10^{-7}M$ .



**Abbildung 5.26: Titrationskurve und Bindungsisotherme des RNA- (links) und DNA-Oligonukleotids (rechts).**

Trotz der molekularen Unterschiede, die zu unterschiedlichen Sekundärstrukturen führen, bindet AtGRP7 auch an eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Die spezifische Erkennung erfolgt daher nicht durch das Zucker-Phosphat-„Rückgrat“ sondern durch die Basen. Bei Strukturbildungen der RNA bindet Uracil basenspezifisch an Adenin und bildet, analog zu Thymin, zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die zusätzliche Methylgruppe des Thymins spielt für die Erkennung somit keine Rolle. Die RNA bildet eine relativ kompakte Struktur mit 9 Basenpaaren aus. Dabei weist die Struktur der DNA lediglich 2 Basenpaare auf. Der größte Teil des DNA-Oligonukleotids liegt als Einzelstrang vor. Das Protein bindet jedoch mit einer höheren Affinität an die DNA als an die RNA, die mit  $K_d=(4,89 \pm 0,56)\cdot 10^{-7}M$  gebunden wird. Dies stützt das vorherige Ergebnis, dass die exakte Bindesequenz zumindest teilweise als Einzelstrang vorliegen muss, wodurch die Basen zugänglich sind.

Darüber hinaus wird bei einer kompakten Struktur zusätzliche Energie benötigt, um diese Struktur in die für eine Bindung optimale Form zu überführen. Es bleibt also im Folgenden zu untersuchen, welcher Teil der bereits auf 32 Basen eingegrenzten Sequenz tatsächlich für eine spezifische Bindung verantwortlich ist. Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, mit welcher Sekundärstruktur diese Sequenz vorliegen muss.

## 5.9 Eingrenzung der AtGRP7-bindenden Sequenz

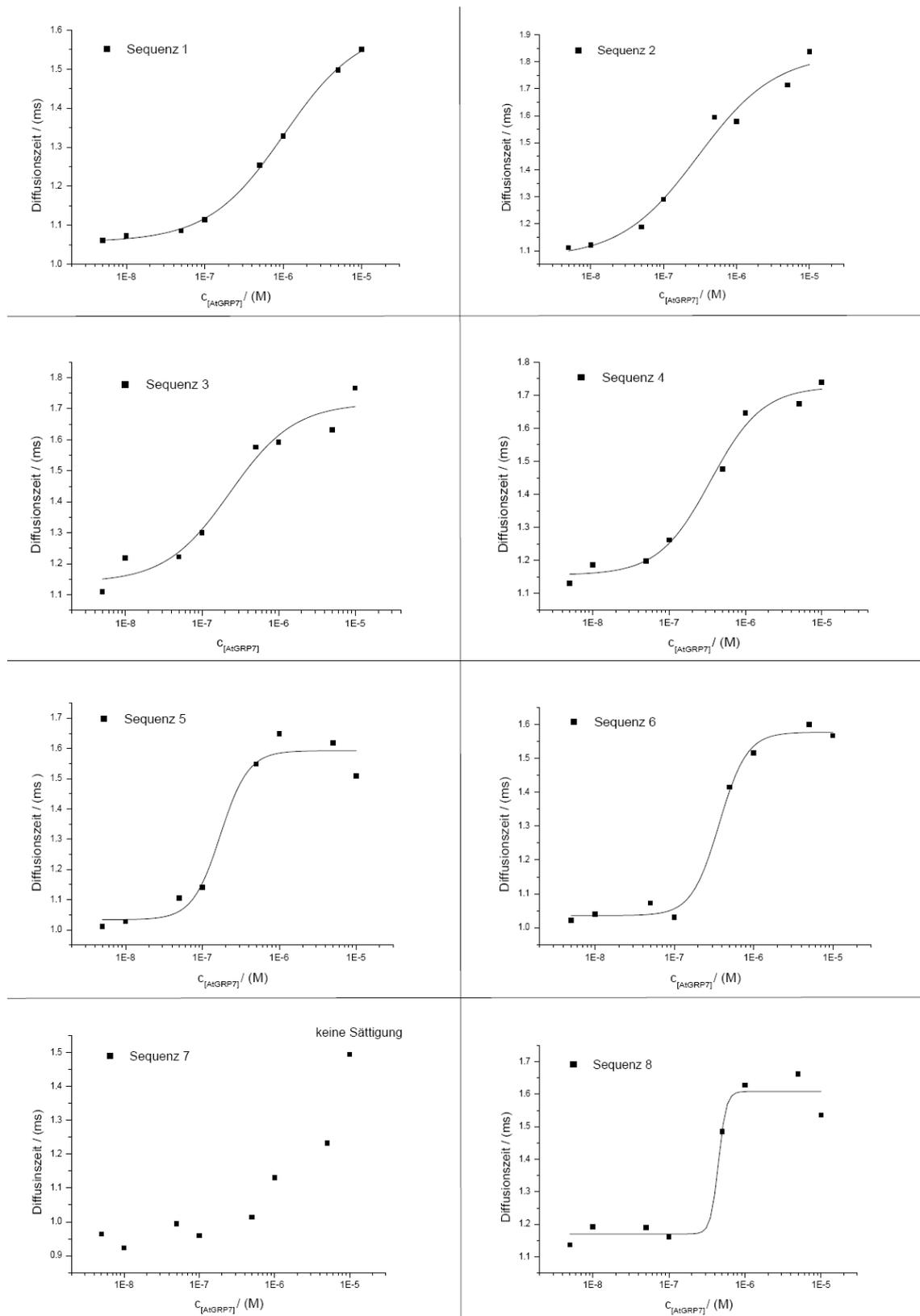
Um eine grobe Einschätzung darüber zu erhalten, wo sich die exakte Bindesequenz auf dem 32mer DNA-Oligonukleotid befindet, wird die Sequenz zunächst in zwei Teile geteilt und die Bindung des Proteins an die erste und zweite Hälfte untersucht. Bei jeweils gleicher Konzentration der Oligonukleotide und gleicher Proteinkonzentration kann festgestellt werden, dass das Protein an die erste Hälfte deutlich stärker bindet als an die zweite. Das zeigt, dass sich die Bindestelle hauptsächlich in der ersten Hälfte der Sequenz befindet. Aus diesem Teil der Sequenz werden nun 12 Basen lange Ausschnitte auf ihre Bindung hin untersucht. Diese Teile sind so gewählt, dass sie jeweils die folgenden zwei Basen der Sequenz enthalten, während die ersten beiden der vorhergehenden Teilsequenz weggelassen werden. Nach dem üblichen Verfahren werden dann Titrationskurven gemessen, aus denen die Bindungskonstanten bestimmt werden können. Alle untersuchten 12 Basen langen DNA-Oligonukleotide sind als Vergleich zu der bereits bekannten Sequenz aus dem 3' UTR in [Tabelle 7] dargestellt. Der Farbstoff MR121 befindet sich über einen C3-Linker am 5'-Ende.

Bezeichnung	Sequenz
3' UTR	5' - AUU UUG UUC UGG UUC UGC UUU AGA UUU GAU GU-3'
1	5' -CT ATT TTG TTC T-3'
2	5' -ATT TTG TTC TGG-3'
3	5' -T TTG TTC TGG TT-3'
4	5' -TG TTC TGG TTC T-3'
5	5' -TTC TGG TTC TGC-3'
6	5' -C TGG TTC TGC TT-3'
7	5' -GG TTC TGC TTT A-3'
8	5' -TTC TGC TTT AGA-3'

**Tabelle 7: Die zur Bestimmung der exakten Bindesequenz untersuchten DNA-Oligonukleotide sowie die Sequenz aus dem 3' UTR zum Vergleich mit der bereits bekannten Bindungsregion.**

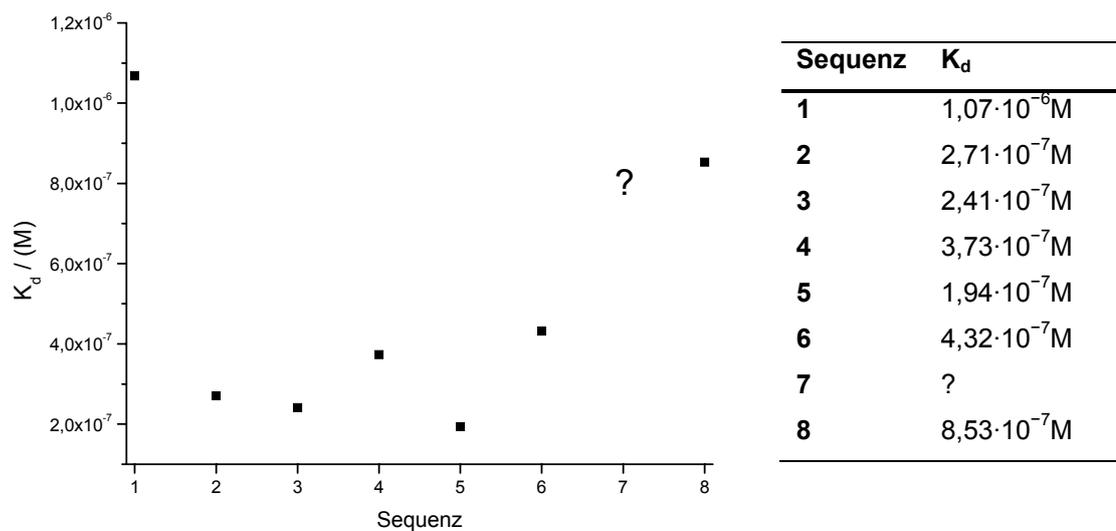
Die Korrelationsfunktionen werden mit dem „stretched exponential“-Modell angefitet. Daraus werden die Diffusionszeiten bestimmt, die in [Abbildung 5.27] gegen den Logarithmus der AtGRP7-Konzentration für die unterschiedlichen Sequenzen aufgetragen sind. Aus den Titrationskurven lässt sich direkt die Dissoziationskonstante

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 5.27: Diffusionszeit unterschiedlicher DNA-Oligonukleotide bei Titration der AtGRP7-Konzentration.**

$K_d$  bestimmen. Dabei ist die Bestimmung der Dissoziationskonstanten nur dann möglich, wenn die Diffusionszeit für hohe AtGRP7-Konzentration in Sättigung läuft. Die entsprechende Diffusionszeit beträgt dann – abhängig vom Oligonukleotid – ungefähr 1,7ms. Bei der Sequenz 7 kann keine Sättigung beobachtet werden. Die Diffusionszeit für die höchste gemessene AtGRP7-Konzentration beträgt bei dieser Sequenz  $\sim 1,5$ ms und scheint somit auch noch nicht das Sättigungsniveau erreicht zu haben.



**Abbildung 5.28: Dissoziationskonstanten der DNA-Oligonukleotide bei Bindung an das Protein AtGRP7 aufgetragen gegen die entsprechende Sequenznummer.**

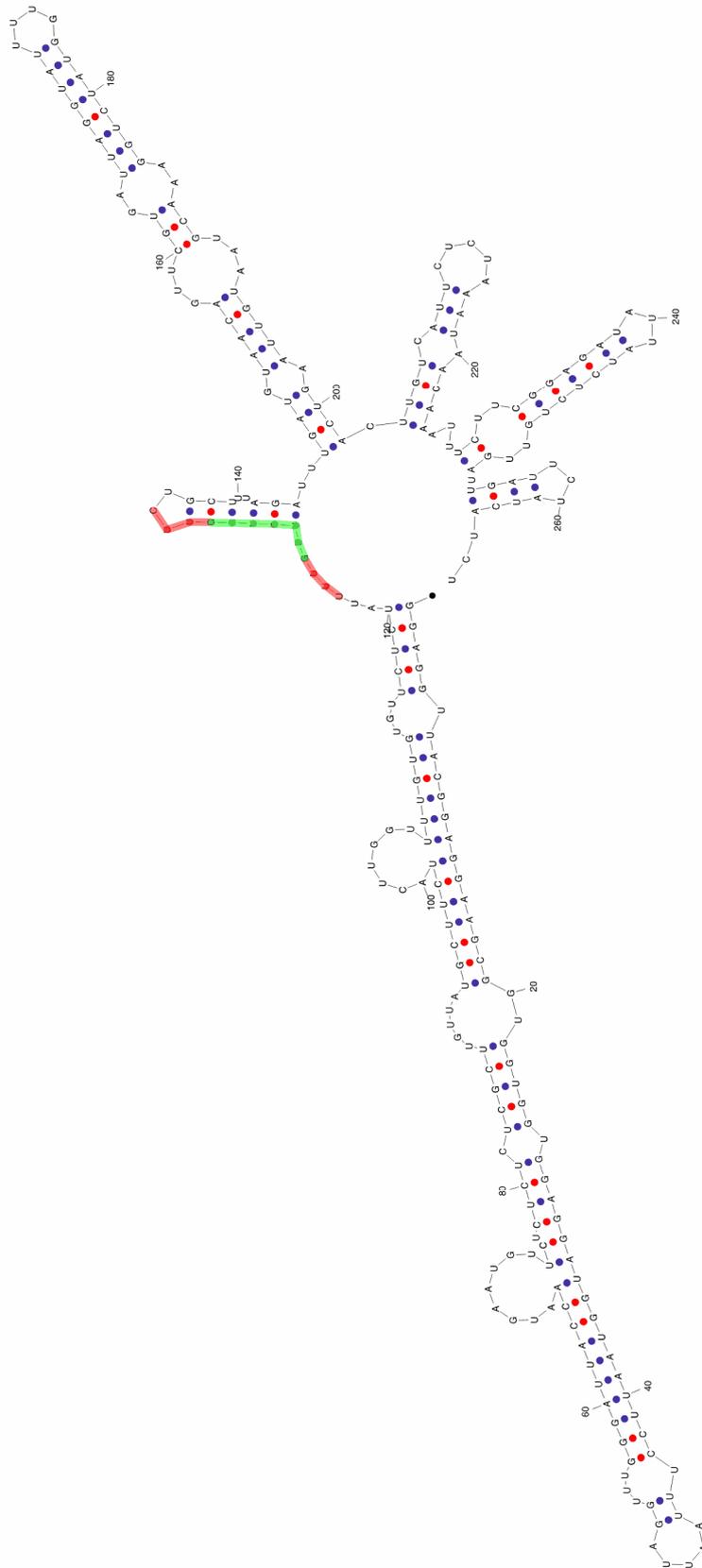
Die Dissoziationskonstanten sind in [Abbildung 5.28] gegen die Sequenznummer aufgetragen, um eine bessere Darstellung der am besten bindenden DNA-Oligonukleotide zu erhalten. Eine minimale Dissoziationskonstante  $K_d$  ist gleichbedeutend mit einer maximalen Bindungsaffinität. Es ist ersichtlich, dass bereits das Oligo mit der Sequenz 1 vom Protein AtGRP7 gebunden wird. Es hat aber nur eine geringe Bindungskonstante  $K_d=1,07 \cdot 10^{-6} \text{M}$ . Die folgenden fünf Oligonukleotide der Sequenzen 2 bis 6 weisen untereinander fast identische Bindungskonstanten auf, die im Bereich zwischen  $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$  und  $4 \cdot 10^{-7} \text{M}$  liegen. Diese binden bis zu fünfmal besser als das DNA-Oligonukleotid der Sequenz 1. Die DNA mit der Sequenz 7 führt zu gar keiner nachweisbaren Bindung, während Sequenz 8 erneut zu einer Bindung mit dem Protein AtGRP7 führt, die aber vergleichbar schwach wie die Bindungsaffinität der Sequenz 1 ist.

Da an der Bindung effektiv nur zwei Basen des Oligonukleotids beteiligt sind und weitere Basen der Stabilisierung der Bindung und der Erhöhung der Affinität dienen, ist anzunehmen, dass alle fünf Oligonukleotide der Sequenzen 2 bis 6 die vollständige Bindesequenz enthalten. Betrachtet man daher die kleinste gemeinsame Schnittmenge der fünf Oligonukleotide, erkennt man, dass die Basensequenz CTGG eine mögliche Bindestelle darstellt. Dadurch lässt sich auch erklären, dass das Oligonukleotid der Sequenz 7 nicht mehr bindet, da bei diesem die Basen CT weggefallen sind. Warum Sequenz 8 dennoch zu einer Bindung führt, bleibt jedoch ungeklärt und ist wegen der geringeren Bindungsstärke nicht relevant. Alle untersuchten Sequenzen bilden bei Raumtemperatur keine Sekundärstrukturen aus, d.h. sie liegen als Einzelstrang vor. Unterschiede in der Bindungsaffinität können also nicht durch die Zugänglichkeit der Bindesequenz erklärt werden. Einen stabilisierenden Einfluss auf die Bindung könnten die beiden Basen TT, die sich unmittelbar vor der Bindestelle befinden haben. Sind sie bei einem Oligonukleotid nicht mehr vorhanden, nimmt die Bindungsstärke leicht ab.

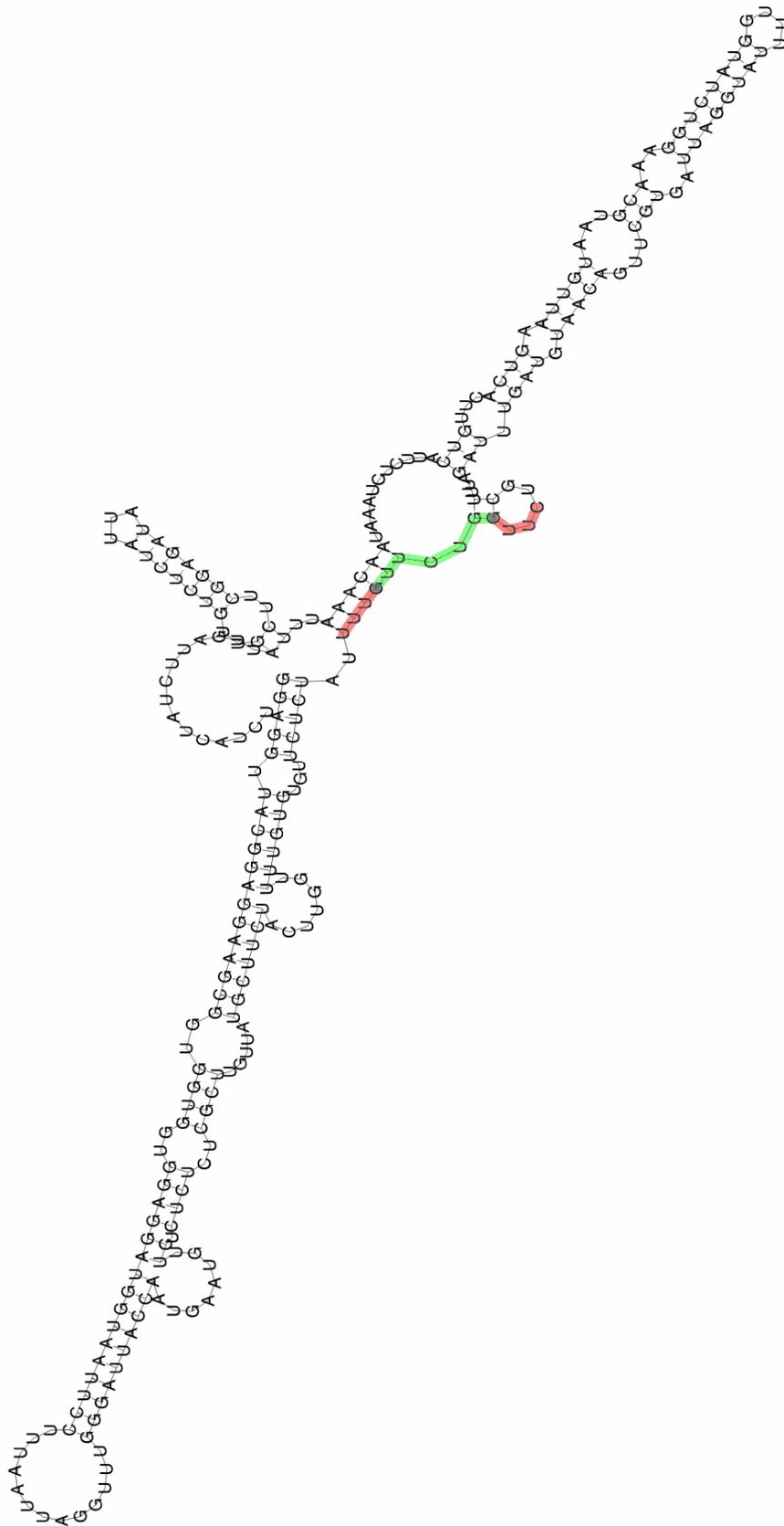
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindung im Wesentlichen durch die Basen (TT)CTGG hervorgerufen wird. Die Basen TT sind für eine spezifische Bindung nicht notwendig, tragen aber wohl zu einer Stabilisierung des Komplexes bei.

### ***5.10 Untersuchung der RNA auf Konformationsänderungen***

Die bislang untersuchten Oligonukleotide liegen als DNA vor. Man weiß aber, dass das Protein AtGRP7 im zellphysiologischen Kontext an seine RNA bindet. Es muss also noch gezeigt werden, dass eine Bindung auch dann erfolgt, wenn die Sequenz als RNA vorliegt. Darüber hinaus sollen Erkenntnisse über den molekularen Erkennungsprozess, durch den AtGRP7 an seine eigene mRNA bindet, gewonnen werden. Theoretische Vorhersagen des Erkennungsmechanismus liegen bislang nicht vor. Aus diesem Grund wird die Sekundärstruktur der mRNA ab Nukleotid 859 [Tabelle 4] mittels MFOLD und RNASHAPES modelliert. Da diese Programme unterschiedliche Algorithmen verwenden, weichen auch die Ergebnisse voneinander ab.



**Abbildung 5.29: Mit MFOLD modellierte Sekundärstruktur der mRNA (ab Nukleotid 859). Der für die Bindung relevante und im Folgenden untersuchte Teil ist farbig markiert.**



**Abbildung 5.30:** Mit RNAshapes modellierte Sekundärstruktur der mRNA (ab Nukleotid 859). Der für die Bindung relevante und im Folgenden untersuchte Teil ist farbig markiert.

Beim Vergleich des für die Bindung relevanten Bereichs fällt auf, dass MFOLD die Bindesequenz (grün) als Teil eines Doppelstrangs sieht. RNAshapes hingegen sagt für diesen Bereich eine einzelsträngige Schleife voraus. Es konnte aber in [Kapitel 5.7.2] gezeigt werden, dass das Protein ATGRP7 nur einen RNA-Einzelstrang binden kann. Da diese Modelle jedoch Berechnungen im thermodynamischen Gleichgewicht sind, kann trotzdem eine Kinetik vorliegen, bei der dieser Teil der Sequenz kurzzeitig als Einzelstrang vorliegt.

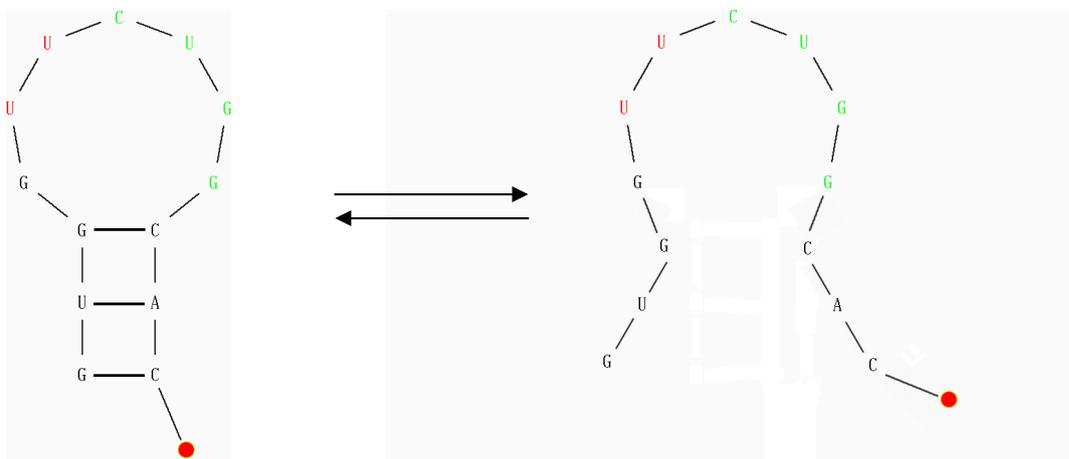
Darüber hinaus wird auch der Einfluss der Sekundärstruktur auf die Bindung und durch eine Bindung hervorgerufene Konformationsänderungen untersucht. Dabei dient der in diesen Experimenten verwendete Farbstoff MR121 als Indikator für die Sekundärstruktur der RNA. Der Farbstoff wird durch PET bei direktem Kontakt mit der Base Guanosin fluoreszenzgelöscht. Mittels der in diesen Versuchen verwendeten schnellen FCS können auch Fluoreszenzfluktuationen im Submikrosekundenbereich aufgelöst werden. So kann aus der Korrelationsfunktion die Kontaktformation des Farbstoffes mit Guanosin direkt ermittelt werden. Auf Grund der kurzen Fluoreszenzfluktuationen können zumindest qualitative Aussagen über den Abstand des Farbstoffes zu einem Guanosin gemacht werden.

### **5.10.1 Vergleich zwischen Hairpin und unstrukturierter Bindesequenz**

Durch gezielte Mutationen des 13 Basen langen Oligonukleotids, das die putative Bindesequenz enthält, wird ein so genanntes Hairpin synthetisiert. Hairpin sind strukturelle Elemente in DNA- und RNA-Oligonukleotide, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vorkommen. Ihnen wird eine Schlüsselrolle für biologische Funktionen wie beispielsweise der Regulation von Genexpression zugeschrieben [146, 147]. Darüber hinaus können sie als Modellsystem zur Beobachtung von Änderungen der Sekundärstruktur von Oligonukleotiden verwendet werden [148].

Das hier untersuchte Hairpin besteht aus einem drei Basenpaare langen Stamm und einer sieben Basen langen Schleife, die die Bindesequenz enthält. Die erste Base in der Sequenz ist ein Guanosin, am Ende der Sequenz ist der Farbstoff MR121 gekoppelt. Dadurch liegen beim geschlossenen Hairpin Guanosin und der Farbstoff

MR121 direkt gegenüber, und der Farbstoff kann vom Guanosin gelöscht werden. Auf Grund der Bewegung des Farbstoffes am C3-Linker findet jedoch keine permanente Löschung statt. Vielmehr unterliegt die Fluoreszenzlöschung gewissen Raten  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , d.h. einer Kinetik der Kontaktformation des Farbstoffes mit dem quencheden Guanosin. Öffnet sich der Stamm, so wird der Farbstoff nicht mehr so stark durch das gegenüber liegende Guanosin gequencht und kann mehr Fluoreszenzlicht emittieren. Dabei nimmt die Kontaktformationsrate ab, weil auf Grund des vergrößerten Abstandes die Wahrscheinlichkeit einer Kontaktformation zwischen Farbstoff und Guanosin herabgesetzt ist. Für einen qualitativen Vergleich zur Hairpin-Struktur dient die 13 Basen lange Originalsequenz, die bei Raumtemperatur keine Sekundärstruktur ausbildet.



**Abbildung 5.31:** Die RNA-Sequenz GUGGUUCUGGCAC-MR121 bildet die Struktur eines Hairpins (links), dessen Stamm durch Bindung geöffnet werden kann (rechts). Die für die Bindung relevanten Basen sind grün, die vermutlich zur Stabilisierung der Bindung wichtigen Basen rot markiert.

Durch Untersuchung der DNA-Oligonukleotide ist bekannt, dass die Sequenz CTGG besonders wichtig für die Bindung an das Protein AtGRP7 ist. Diese entspricht der Sequenz CUGG als RNA. Weitergehend scheinen die angrenzenden Thymine, bzw. Uracile bei der RNA, die Bindung zu stabilisieren. Auf Grund dieser Ergebnisse wird eine entsprechende Sequenz ausgewählt. Darüber hinaus soll noch die Möglichkeit einer Vergleichbarkeit der Bindungsaffinität von RNA und DNA gegen sein. Daher entspricht die ausgewählte RNA-Sequenz der zuvor untersuchten DNA-Sequenz 3, die jedoch um ein Cytosin verlängert wird. Diese Modifikation lässt sich nicht umgehen, da ein zum Cytosin komplementäres endständiges Guanosin eingebaut werden muss, durch das der Farbstoff MR121 fluoreszenzgelöscht werden kann. Um aus dieser

Originalsequenz eine Hairpin-Struktur zu formen, werden 4 Basen modifiziert, die wegen ihrer Komplementarität spezifisch miteinander wechselwirken. Dadurch bilden sie einen aus 3 Basenpaaren bestehenden Stamm, der eine 7 Basen lange Schleife formt [Abbildung 5.31]. Die freie Enthalpie des Hairpins beträgt nach Berechnungen mit MFOLD  $\Delta G = -1,75 \text{ kcal/mol}$ .

Bezeichnung	Sequenz
Hairpin	5' - <b>GUG</b> GUU CUG <b>GCA</b> C-3'
offene Struktur	5' -UUU GUU CUG GUU C-3'

**Tabelle 8: RNA-Sequenzen als Hairpin und als offene Struktur. Modifizierte Basen im Hairpin sind fettgedruckt dargestellt. Die offene Struktur entspricht der Originalsequenz.**

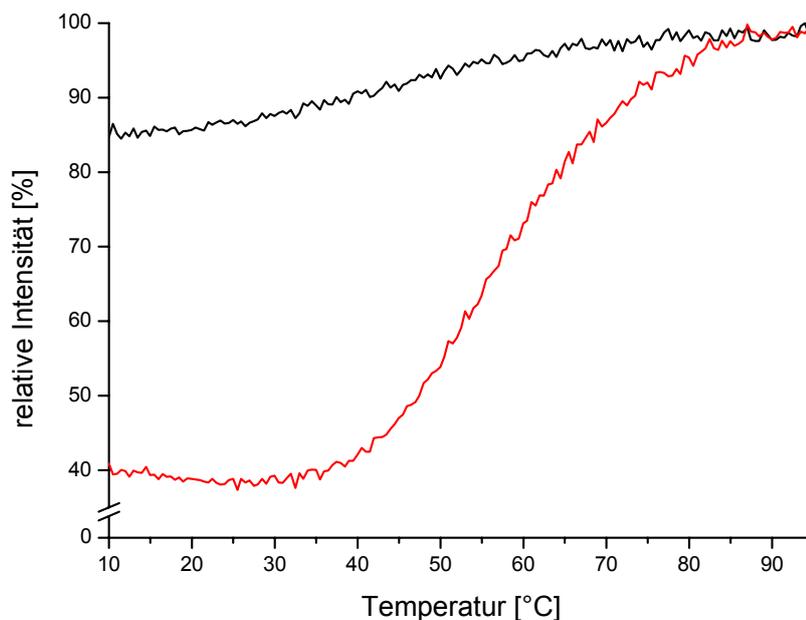
Die entsprechenden Sequenzen sind in [Tabelle 8] dargestellt. Die putative Bindesequenz ist in der Sequenz GUUCUGG in beiden zu untersuchenden Oligonukleotide enthalten. Der Farbstoff MR121 befindet sich bei beiden Sequenzen am 3'-Ende.

### 5.10.2 Überprüfung der Hairpin-Struktur

Um die Sekundärstruktur der beiden RNA-Oligonukleotide zu überprüfen, wird die Fluoreszenzemission des Farbstoffes MR121 in Abhängigkeit von der Temperatur in einem Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse; Varian) gemessen. Dazu werden Küvetten mit  $50 \mu\text{l}$   $10^{-5} \text{ M}$  Farbstoff-markierter RNA-Oligonukleotide befüllt. Durch einen heizbaren Küvettenblock wird die Temperatur zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $100^\circ\text{C}$  variiert. Als Anregungswellenlänge werden  $635 \text{ nm}$  mit einem  $5 \text{ nm}$  großen Fenster verwendet. Die Emission wird bei  $680 \text{ nm}$  mit einem ebenfalls  $5 \text{ nm}$  großen Fenster detektiert. Die Messung erfolgt in  $0,5^\circ\text{C}$ -Schritten. Da die Temperatur der Flüssigkeit in der Küvette der Temperatur des Heizblocks mit einer Verzögerung folgt, werden die realen Temperaturen mittels eines Temperaturfühlers in einer Referenzküvette ermittelt.

[Abbildung 5.32] zeigt den Verlauf der Intensität der offenen Struktur (schwarz) und der Hairpin-Struktur (rot) in Abhängigkeit von der Temperatur, eine so genannte Schmelzkurve. Im geschlossenen Hairpin befindet sich der Farbstoff am Ende des

Stamms in direkter Umgebung eines Guanosins, wodurch die Fluoreszenz gelöscht werden kann. Man kann erkennen, dass nur ungefähr 40% der maximalen Fluoreszenzintensität vorhanden sind. Durch Zufuhr von Energie in Form von Wärme gehen die Bindungen der Basenpaare im Stamm auf (vergleichbar mit [Abbildung 5.31]), so dass der Farbstoff nicht mehr effizient durch das Guanosin gelöscht werden kann. Es kommt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Einen geringeren Anstieg kann man ebenfalls bei der offenen Struktur erkennen, der mit einem Rückgang der intramolekularen Quenching-Prozesse zu erklären ist. Ebenso wie beim Hairpin-Stamm kann es auch zwischen einzelnen Basen der Sequenz zu Bindungen kommen, die jedoch energetisch nicht stabil sind. Bei höherer Temperatur nimmt die Stabilität weiter ab, so dass eine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes durch Kontakt mit einem Guanosinrest unwahrscheinlicher wird.

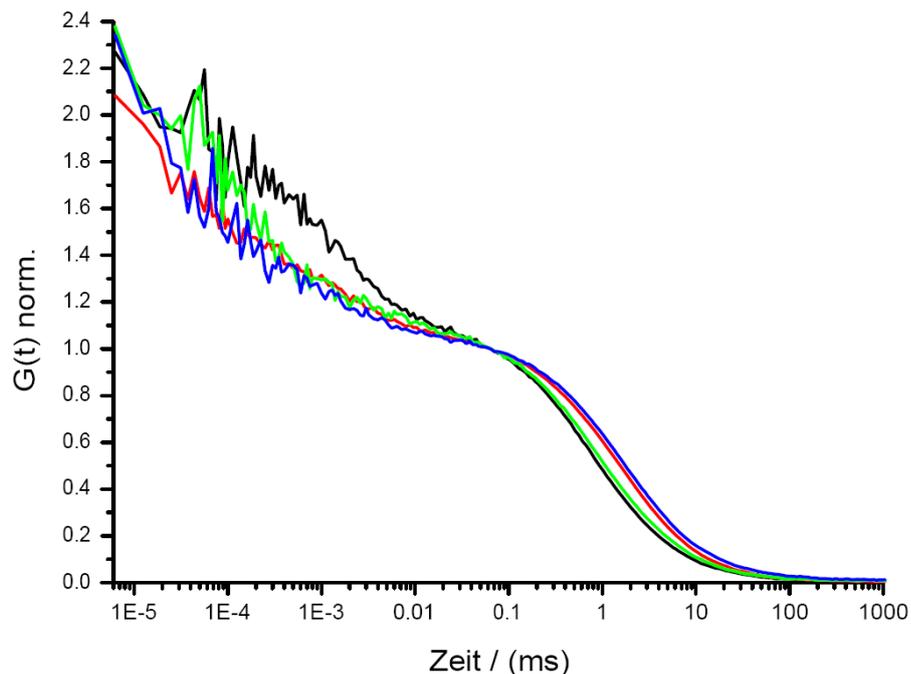


**Abbildung 5.32: Relative Fluoreszenzintensität der offenen RNA-Struktur (schwarz) und des RNA-Hairpins (rot) in Abhängigkeit von der Temperatur.**

Auf Grund der deutlichen Unterschiede der Schmelzkurve zeigt sich, dass es sich tatsächlich um eine Hairpin handelt, bei dem der Stamm bei hoher Temperatur aufgeht. Die so genannte Schmelztemperatur kann aus dem Wendepunkt bestimmt werden. Man erhält  $\sim 58^{\circ}\text{C}$ , so dass das Hairpin bei Zimmertemperatur im geschlossenen Zustand vorliegt.

### 5.10.3 Untersuchung der Bindung von AtGRP7

Im Folgenden wird die Bindung des Protein AtGRP7 an die offene Struktur und an das Hairpin untersucht. Dazu werden in Voruntersuchungen die Korrelationskurven von  $10^{-9}$ M RNA-Oligonukleotid mit und ohne Zugabe von  $10^{-6}$ M AtGRP7 untersucht. Die Korrelationskurven des Hairpins und der offenen Struktur sind in [Abbildung 5.33] dargestellt. Sie zeigen sowohl Diffusionszeitunterschiede als auch Unterschiede in der Lösckinetik des Farbstoffes. Die unterschiedlichen Diffusionszeiten der beiden Oligonukleotide mit fast identischem Molekulargewicht lassen sich auf unterschiedliche Sekundärstrukturen zurückführen. Auf Grund der kompakteren Struktur des Hairpins erwartet man eine leicht geringere Diffusionszeit als bei dem unstrukturierten Oligonukleotid. Der gleiche Effekt konnte bereits zuvor beim direkten Vergleich zwischen DNA und RNA beobachtet werden [Kapitel 5.8].



**Abbildung 5.33:** Korrelationsfunktion des Hairpins ( $10^{-9}$ M) ohne (schwarz) und mit  $10^{-6}$ M AtGRP7 (rot) sowie der offenen Struktur ohne (grün) und mit AtGRP7 (blau).

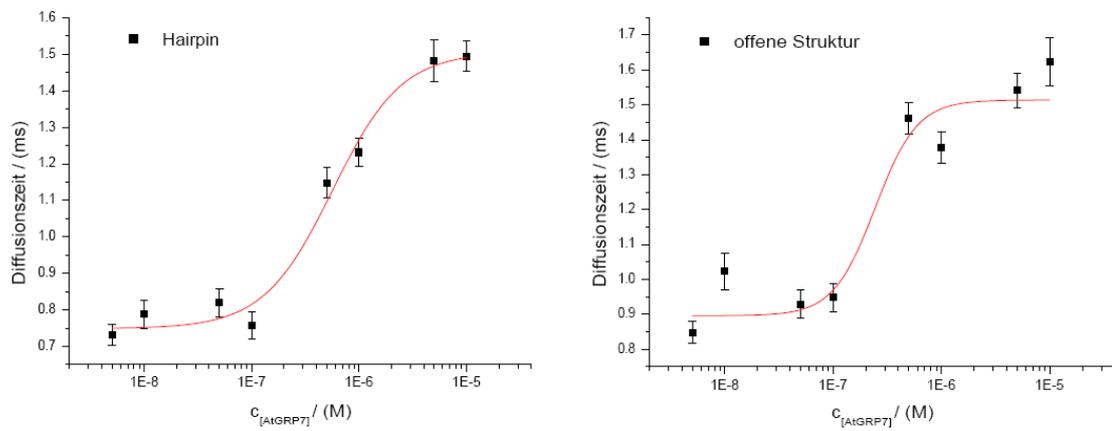
Die schnelle Kinetik der Fluoreszenzfluktuation des Farbstoffes ist beim Hairpin auf Kontakt mit dem fluoreszenzlöschenden Guanosin am Ende des Stammes sowie auf mit anderen Guanosin-Resten, die sich im Stamm bzw. in der Schleife befinden, zurückzuführen. Obwohl der Stamm des Hairpins bei thermodynamischer Betrachtungsweise geschlossen ist, kann es zu einer Kinetik des Öffnens und

Schließens kommen. Im kurzzeitig geöffneten Zustand sind dann auch anderen Guanosine zugänglich. Dieser Prozess spielt bei der offenen Struktur jedoch keine Rolle, weil die Löschkinetik ausschließlich durch intramolekulare räumliche Fluktuationen des Moleküls verursacht wird.

Durch Zugabe der Proteins AtGRP7 nimmt die Diffusionszeit sowohl der offenen Struktur (blau) als auch des Hairpins (rot) zu, was eine Bindung des Proteins an das entsprechende Oligonukleotid bedeutet. Dadurch lässt sich zeigen, dass beide Strukturen vom Protein erkannt und gebunden werden. Darüber hinaus hat die Bindung Einfluss auf die Löschkinetik des Farbstoffes MR121, was auf eine andere Konformationsdynamik des Oligonukleotids zurückzuführen ist. Während sich diese bei der offenen Struktur durch Wechselwirkung mit dem Protein kaum ändert, findet beim Hairpin eine signifikante Änderung vom ungebundenen zum gebundenen Zustand statt. Insbesondere ist bemerkenswert, dass nach der Bindung des Proteins an die entsprechenden Sequenzen die Löschkinetik nahezu identisch ist. Daher ist davon auszugehen, dass die beiden Oligonukleotide nach einer Bindung in Bezug auf ihre Flexibilität und Struktur fast identisch sind und die durch Mutation verursachten Unterschiede in der Sequenz nach der Bindung keinen Einfluss auf das Löscherhalten haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Hairpin bei der Bindung eine deutliche Strukturänderung erfährt. Die Löschkinetik des Farbstoffes wird im Wesentlichen durch das benachbarte Guanosin beeinflusst. Eine Änderung der Löschkinetik durch Bindung des Proteins bedeutet dann aber keine Änderung der Struktur der Hairpin-Schleife, sondern ist vielmehr auf eine Änderung der Struktur des Hairpin-Stamms zurückzuführen.

Bei der Bindung übt das Protein AtGRP7 also eine Kraft auf die Nukleinsäurekette aus, die zu einem Auseinanderreißen der 3 komplementären Basenpaare im Stamm des Hairpins führt. Dieser Prozess wird durch eine Bindung an AtGRP7 ausgelöst, der zunächst lediglich durch eine basenspezifische Erkennung der Sequenz erfolgt. Das Protein ist also in der Lage, Arbeit an der RNA zu verrichten. Dies lässt sich vor dem zellphysiologischen Hintergrund dahingehend interpretieren, dass das Protein AtGRP7 nicht nur an seine eigene mRNA bindet, sondern dadurch eine strukturelle Änderung seiner mRNA hervorrufen kann. Auf Grund struktureller Erkennungsmechanismen von Proteinen könnte nun eine Kaskade von weiteren Wechselwirkungen, die schließlich zum alternativen Spleißen führen, ausgelöst werden.

Auf Grund der nahezu identischen Konformationsdynamik kann angenommen werden, dass die beiden Komplexe – nämlich AtGRP7 gebunden an das Hairpin und AtGRP7 gebunden an die offene Struktur – nach der Bindung identische hydrodynamische Radien aufweisen. Die Korrelationsfunktionen zeigen aber unterschiedliche Diffusionszeiten. Das unterstützt die Vermutung, dass die Bindungsaffinitäten des Proteins an die beiden Sequenzen unterschiedlich sind. Um die Bindung zu quantifizieren, werden daher die Dissoziationskonstanten durch Titration ebenso wie zuvor bei den DNA-Oligonukleotiden bestimmt.



**Abbildung 5.34: Titrationskurve des Hairpins und der offenen Struktur mit unterschiedlichen Konzentrationen von AtGRP7.**

Aus dem Wendepunkt einer sigmoidalen Fit-Funktion der Titrationskurven lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_d$  abgelesen [Abbildung 5.34]. Für die offene Struktur erhält man  $K_d=(2,44\pm 0,55)\cdot 10^{-7}\text{M}$ , für das Hairpin  $K_d=(5,65\pm 0,91)\cdot 10^{-7}\text{M}$ . Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten lassen sich auf die unterschiedliche Sekundärstrukturen zurückführen. Insbesondere bei der Bindung des Proteins an das Hairpin liegt dieses nicht in der optimalen Sekundärstruktur vor, sondern muss unter Aufwendung von Arbeit an die Bindungstasche angepasst werden. Das führt zu einer geringen Bindungsaffinität. Für die offene RNA-Struktur, die wie bereits beschrieben im Wesentlichen der DNA-Sequenz 3 entspricht, ergibt sich ein nahezu identischer  $K_d$ -Wert wie bei der entsprechenden DNA-Sequenz. Einen Unterschied in der Bindungsstärke zwischen einem Oligonukleotid, das als DNA oder RNA vorliegt, scheint es nicht zu geben. Dies rechtfertigt die zuvor durchgeführten Messungen mit DNA-Oligonukleotiden. Dass das Protein AtGRP7 DNA-Oligonukleotide genauso stark bindet wie die physiologisch relevante RNA, basiert lediglich auf einer chemischen

Ähnlichkeit der Nukleotide. Eine mögliche Bindung der DNA bekommt erst dann eine biologische Relevanz, wenn die Bindungspartner in der Zelle tatsächlich vorliegen.

Es kann also gezeigt werden, dass das Protein AtGRP7 an DNA- und RNA-Oligonukleotide bindet. Bei der Bindung erfährt die synthetische Hairpin-Struktur eine Änderung der Sekundärstruktur, in dem der Stamm destabilisiert wird. Man kann daher sagen, dass das Protein durch Bindung den Stamm auseinander reißt.

### ***5.11 Untersuchung der Konformationsdynamik von Oligonukleotiden***

Bislang konnte der Nachweis für eine Bindung eines farbstoffmarkierten DNA- oder RNA-Oligonukleotids an das Protein AtGRP7 nur durch die Beobachtung der Diffusionszeit mittels FCS erbracht werden. Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau einer schnellen FCS ist jedoch in der Lage, schnelle Fluoreszenzfluktuationen bis 6,25ns in einer Korrelationsfunktion aufzulösen. Diese Fluoreszenzfluktuationen werden durch photoinduzierten Elektronentransfer bei Kontakt des Farbstoffes MR121 mit der quenchenden Base Guanosin des Oligonukleotids hervorgerufen. Bei einer Bindung des Oligonukleotids an AtGRP7 kann es zu einer Änderung seiner Sekundärstruktur oder Einschränkung der freien Weglänge des Farbstoffes kommen. Dies kann dann zu veränderten Kontaktformationsraten zwischen Farbstoff und dem Quencher Guanosin führen und sich in der Korrelationsfunktion widerspiegeln. Eine Änderung der schnellen Fluoreszenzfluktuationen ist in dieser Arbeit bislang aber nur qualitativ beschrieben und ausgewertet worden, weil für viele der durchgeführten Experimente die Betrachtung der Diffusionszeit ausreichend war. Für eine genauere und vor allem quantitative Auswertung der schnellen Fluoreszenzkinetik gibt es bislang kein vollständiges Modell. Die Ursache dafür liegt in der Komplexität der Kinetik begründet, so dass es lediglich Approximationen gibt. Diese Näherungen liefern gute Fit-Ergebnisse, häufig aber fehlt der Bezug zu einem realen physikalischen Parameter. Eine Abhängigkeit vom Abstand des Farbstoffes zum Guanosin ist bislang an einem Modellsystem beobachtet worden [149]. Dabei wurden unterschiedlich lange Oligonukleotide, bei denen sich zwischen Farbstoff und Guanosin eine unterschiedliche Anzahl an Thyminen befindet, und verschieden lange Stämme eines Hairpins untersucht.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wird im Folgenden eine reale Sequenz untersucht. Es soll versucht werden, die berechneten Parameter auf das reale biologische System zu beziehen. Exemplarisch wird dazu das Farbstoff-markierte DNA-Oligonukleotid der Sequenz 3 der vorhergehenden Versuche verwendet (MR121-**TTT**TTCT**GGTT**). Insbesondere soll auf die Wechselwirkung zwischen DNA-Oligonukleotid und dem Protein AtGRP7 vor dem Hintergrund einer Bindung nach dem bislang theoretisch vorhergesagten Modell eingegangen werden.

In diesem realen System befinden sich mehrere Guanosine im Oligonukleotid, so dass es nicht nur einen Quencher mit einer charakteristischen Zeit und einer Kontaktformationswahrscheinlichkeit gibt. Vielmehr sind entsprechend der Anzahl der Quencher mehrere charakteristische Kontaktformationszeiten möglich. Zusätzlich besteht die Möglichkeit vielfältiger intramolekularer Interaktionen, weil es zu Wechselwirkungen der verschiedenen Basen untereinander kommen kann. Dadurch werden nicht nur diskrete charakteristische Zeiten erwartet, sondern eine kontinuierliche Verteilung über einen großen Bereich. Auf Grund einer Vielzahl intramolekularer Wechselwirkungen sind die Wahrscheinlichkeiten einer Kontaktformation zwischen MR121 und Guanosin ebenfalls vielfältig. Korrelationskurven mit nur einer charakteristischen Konformationskinetik zwischen Farbstoff und Guanosin lassen sich entsprechend zuvor angeführter theoretischer Überlegungen durch:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + K \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_K}} \right) \quad 5.6$$

beschreiben, wobei  $N$  die durchschnittliche Gesamtanzahl der Moleküle und  $\tau_D$  die charakteristische Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen ist. Die Konformationsdynamik wird durch  $K$  und  $\tau_K$  beschrieben, wobei  $K = k_{AB}/k_{BA}$  die Gleichgewichtskonstante und  $\tau_K = 1/(k_{AB} + k_{BA})$  die Relaxationszeit der Konformationsdynamik ist.  $k_{AB}$  und  $k_{BA}$  sind die entsprechenden Übergangsraten zwischen den Zuständen A und B.

Wird das System jedoch im Hinblick auf mögliche Konformationskinetiken komplexer, so bleibt häufig nur die Verwendung eines „stretched exponential“-Ansatz mit dem zusätzlichen „stretch“-Parameter  $\beta$ :

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + K \cdot e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_K}\right)^\beta} \right) \quad 5.7$$

Durch den Parameter  $\beta$ , der Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, wird für die Fluoreszenzfluktuation keine einzelne charakteristische Zeit angenommen, sondern eine Verteilung, die umso breiter ist, je kleiner der Parameter ist. Mit diesem Ansatz lässt sich eine reale unbekannte Kinetik  $\phi(t)$  annähern. Diese wiederum kann jedoch auch als eine Superposition einzelner Exponentialfunktionen verstanden werden. Zusammenfassend folgt also:

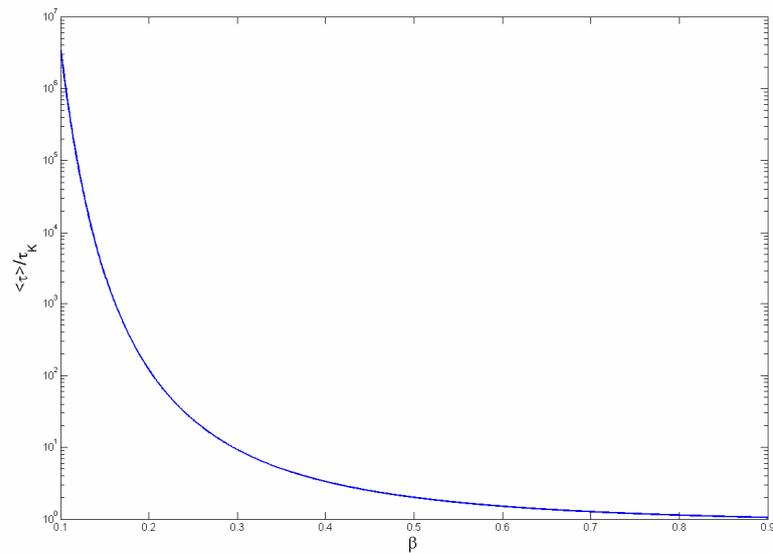
$$\phi(t) \approx e^{-\left(\frac{t}{\tau_K}\right)^\beta} = \int_0^\infty e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)} \rho(\tau) d\tau \quad 5.8$$

wobei  $\tau_K$  die charakteristische Zeit für die Approximation durch einen „stretched exponential“-Ansatz,  $\tau$  eine reale charakteristische Zeit mit einer entsprechenden Verteilung  $\rho(\tau)$  ist. Auf Grund der rechten Seite des Ausdrucks lässt sich die reale mittlere Zeit  $\langle \tau \rangle$  ohne Kenntnis der eigentlichen Verteilung aus dem „stretched exponential“-Ansatz berechnen [82]:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\tau_K}{\beta} \cdot \Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right) \quad 5.9$$

wobei  $\Gamma$  die Gamma-Funktion ist. Das Verhältnis der realen mittleren Zeit  $\langle \tau \rangle$  zu  $\tau_K$  ist in [Abbildung 5.35] dargestellt.

Das Verhältnis konvergiert gegen 1, wenn  $\beta$  gegen 1 strebt und somit aus dem Exponenten „verschwindet“. Für kleine  $\beta$  strebt  $\langle \tau \rangle$  gegen unendlich und führt zu unrealistischen Werten. Sinnvolle Werte für  $\beta$  liegen im Bereich zwischen 0,2 und 1 und ergeben eine mittlere Zeit, die um bis zu zwei Größenordnungen größer als  $\tau_K$  ist.

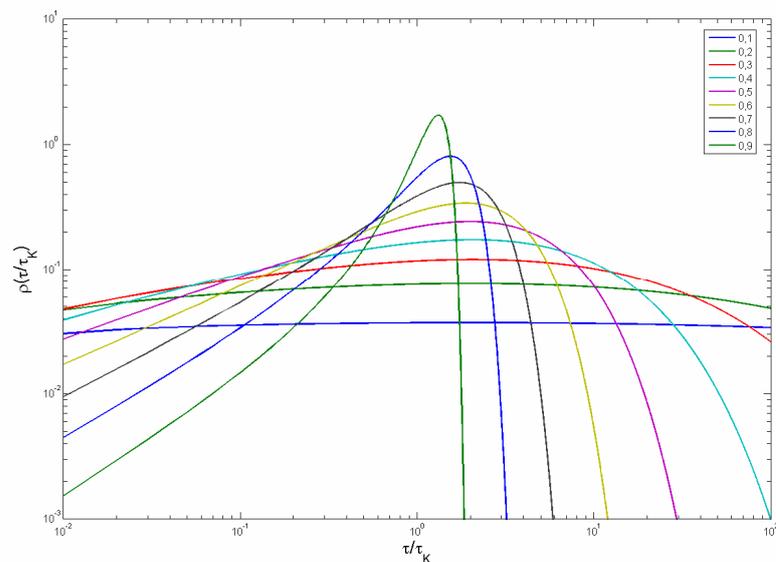


**Abbildung 5.35:** Das Verhältnis der realen mittleren Zeit  $\langle \tau \rangle$  zu  $\tau_K$  in Abhängigkeit von  $\beta$ .

Durch Substitution lässt sich [Gleichung 5.8] in ein Laplace-Integral umschreiben und daraus die gesuchte Verteilung  $\rho(\tau)$  berechnen:

$$\rho(\tau) = \frac{\tau_K}{\pi \cdot \tau^2} \cdot \int_0^{\infty} e^{-\frac{\tau_K}{\tau} \cdot u} e^{-u^\beta \cdot \cos(\pi\beta)} \sin(u^\beta \cdot \sin(\pi\beta)) du \quad 5.10$$

Die Verteilung ist für verschiedene Werte von  $\beta$  in [Abbildung 5.36] dargestellt.



**Abbildung 5.36:** Die Verteilung  $\rho(\tau)$  für verschiedene Werte des „stretch“-Parameters  $\beta$ .

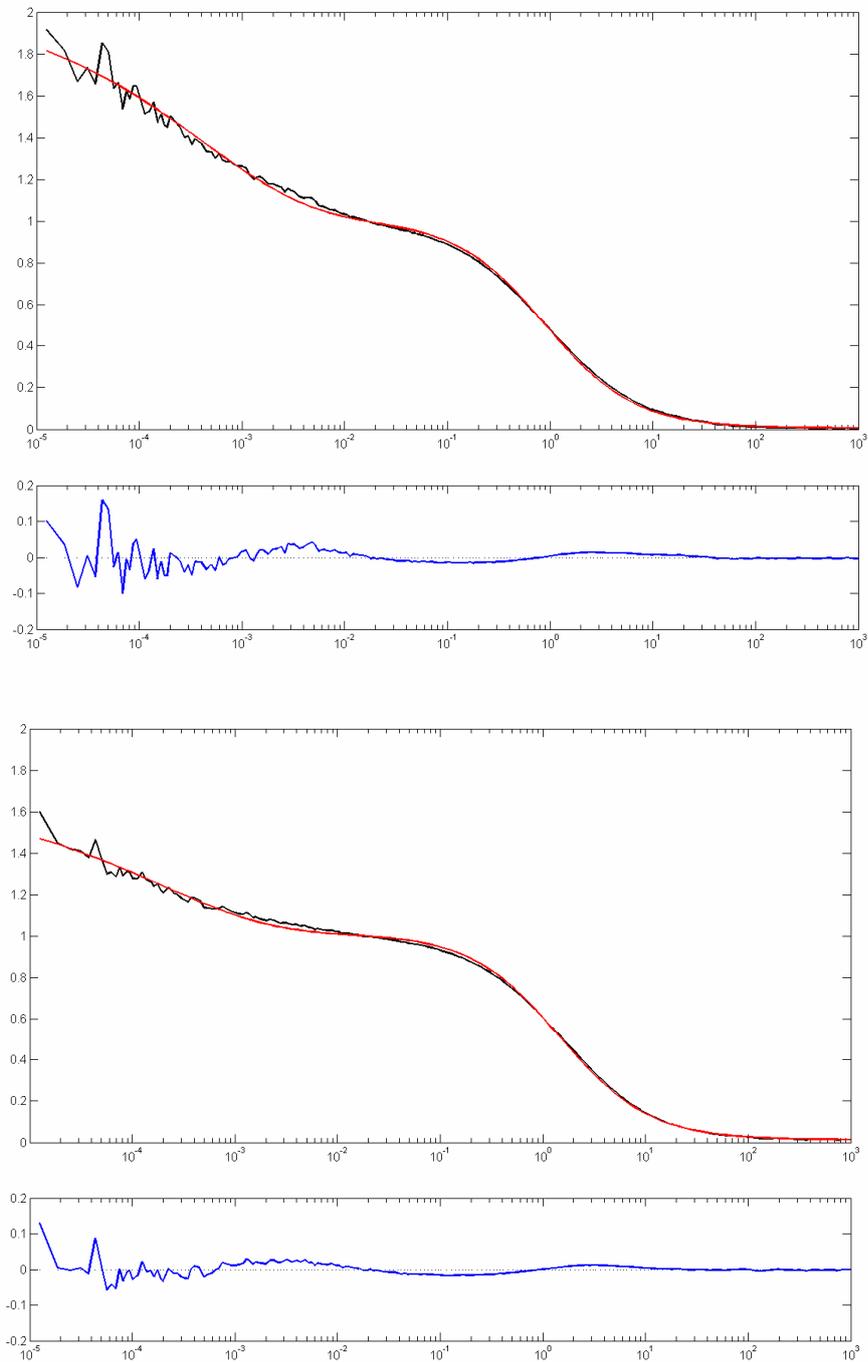
Die Verteilung wird für  $\beta$  gegen 1 immer schmaler und konvergiert gegen eine Deltafunktion, was dem Übergang von einem „stretched exponential“ zu einer Konformationsdynamik mit nur einer charakteristischen Zeit entspricht. Für kleinere Werte von  $\beta$  wird die Verteilung immer breiter und strebt gegen eine Gleichverteilung über mehrere Größenordnungen. Bereits für  $\beta=0,4$  sind charakteristische Zeiten, die um den Faktor 100 größer als das berechnete  $\tau_K$  sind, möglich.

Für ein besseres Verständnis muss aber erwähnt werden, dass sich diese Berechnungen auf den rechten Teil von [Gleichung 5.8] beziehen. Die tatsächliche Verteilung der Kinetik  $\phi(t)$  bleibt unbekannt. Sie lässt sich unter Umständen durch diesen Ansatz annähern. Erst wenn die Näherung die tatsächliche Verteilung  $\phi(t)$  ausreichend gut beschreibt, gelten die zuvor dargestellten Ergebnisse.

Diese theoretischen Überlegungen werden im Folgenden genutzt, um experimentelle Ergebnisse zu interpretieren. Die Korrelationsfunktion des DNA-Oligonukleotids mit der Sequenz 3 wird bei unterschiedlichen Konzentrationen zwischen  $8 \cdot 10^{-10}$  und  $1 \cdot 10^{-5}$  M des Proteins AtGRP7 gemessen. Diese wird mit einem „stretched exponential“-Ansatz gefittet. Dabei wird  $\beta=0,4$  festgesetzt, um einen numerisch möglichst stabilen Fit zu erzielen. Dieser Wert für  $\beta$  konnte bereits bei dem zuvor erwähnten Modellsystem für DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 8 bis 13 Basen ermittelt werden [149]. Daher sollte er für das hier untersuchte Oligonukleotid eine reale Annahme sein. Aus dem Fit [Gleichung 4.10] werden die Parameter  $\tau_D$ ,  $K$ ,  $\tau_K$  gegen den Logarithmus der Konzentration des Proteins AtGRP7 aufgetragen.

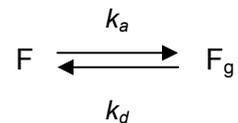
[Abbildung 5.37] zeigt die Korrelationsfunktion, den Fit und den Fehler für das DNA-Oligonukleotid mit der Sequenz 3 und dem Protein AtGRP7 in den Konzentrationen  $8 \cdot 10^{-10}$  M und  $1 \cdot 10^{-5}$  M, d.h. in der geringsten und höchsten gemessenen Konzentration. Die Korrelationsfunktion lässt sich für beide dargestellten Protein-Konzentrationen gut durch einen „stretched exponential“ anfitzen. Der Fehler im Bereich  $10^0$  ms liegt an der Verwendung eines zwei-dimensionalen anstelle des realen drei-dimensionalen Diffusionsmodells. Zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  ms können zusätzliche Fluoreszenzfluktuationen auf Grund von Tripletzuständen des Farbstoffs beobachtet werden, die ebenfalls zu einem geringen Fehler führen. Für sehr kurze Korrelationszeiten wird das Signal verrauschter, so dass auf die kürzeste Zeit (6,25 ns) für einen Fit verzichtet

werden muss. Bereits qualitativ lässt sich jedoch eine Änderung der kurzen Kinetik beobachten, die nun genauer betrachtet werden.



**Abbildung 5.37: Korrelationsfunktion (schwarz), Fit (rot) und Fehler (blau) des DNA-Oligonukletids mit der Sequenz 3 und dem Protein AtGRP7 in den Konzentrationen  $8 \cdot 10^{-10} \text{ M}$  (oben) und  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (unten).**

Während  $\tau_D$  die Diffusionszeit des Farbstoff-markierten Moleküls angibt, beschreibt die Amplitude  $K$  das Verhältnis der Raten der Assoziation  $k_a$  und Dissoziation  $k_d$  des Farbstoffs und einem fluoreszenzlöschenden Guanosin, die zum fluoreszierenden Zustand F bzw. zum fluoreszenzgelöschten Zustand  $F_g$  führen:



$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad 5.11$$

Sie entspricht somit dem Gleichgewichtszustand  $K = k_a/k_d = [Fg]/[F]$ , wobei  $[Fg]$  und  $[F]$  die Konzentrationen der fluoreszenzgelöschten bzw. fluoreszierenden Moleküle sind. In diesem Fall erhält man dann für die charakteristische Zeit  $\tau_K = 1/(k_a + k_d)$ .

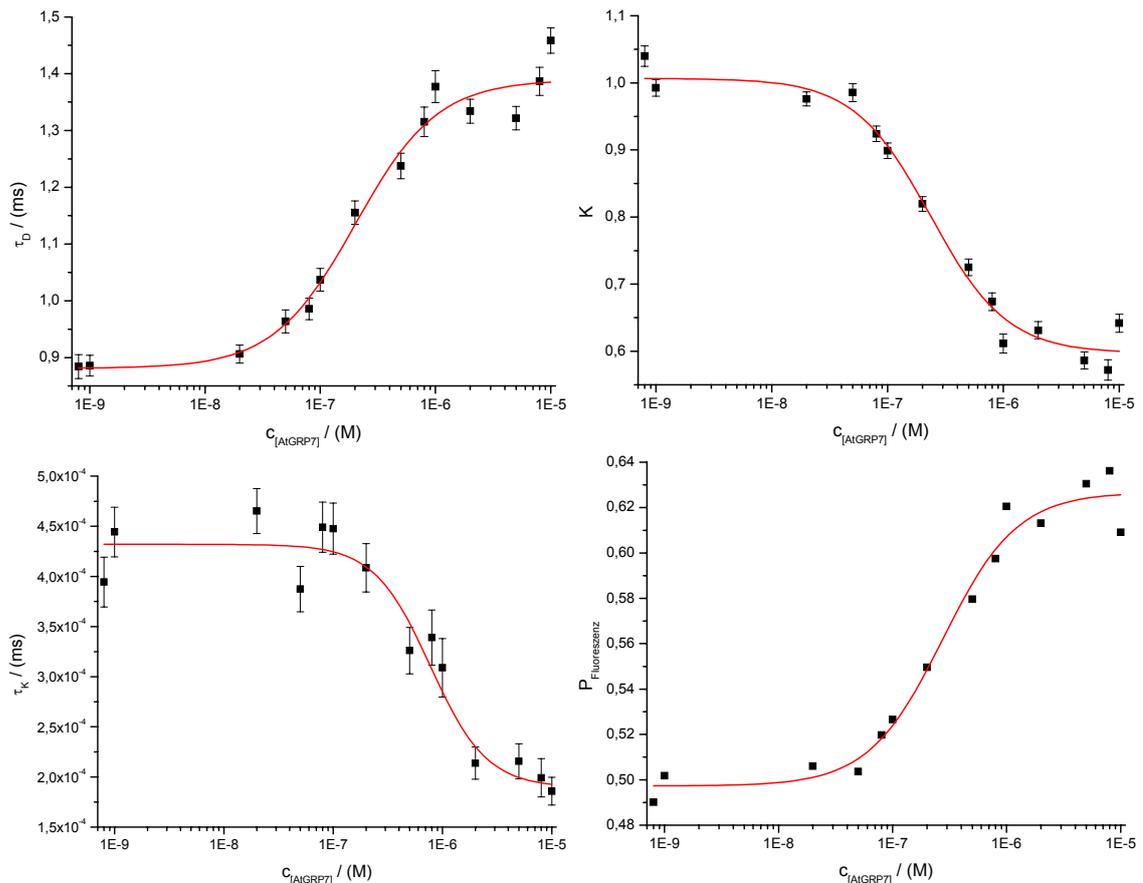
Die Parameter  $\tau_D$ ,  $K$ ,  $\tau_K$  in [Abbildung 5.38] zeigen einen sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteins AtGRP7. Aus dem sigmoidalen Verlauf lässt sich am Wendepunkt die entsprechende Dissoziationskonstante ablesen:

Parameter	$K_d$
$\tau_D$	$(2,02 \pm 0,22) \cdot 10^{-7} \text{M}$
$K$	$(2,25 \pm 0,18) \cdot 10^{-7} \text{M}$
$\tau_K$	$(7,73 \pm 1,34) \cdot 10^{-7} \text{M}$
$P_{\text{Fluoreszenz}}$	$(2,75 \pm 0,49) \cdot 10^{-7} \text{M}$

**Tabelle 9: Die aus den Parametern  $\tau_D$ ,  $K$ ,  $\tau_K$  und  $P_{\text{Fluoreszenz}}$  berechnete Dissoziationskonstante.**

Bis auf die charakteristische Zeit  $\tau_K$  stimmen alle ermittelten Dissoziationskonstanten im Rahmen des Fehlers untereinander und mit dem zuvor ermittelten Wert für die Sequenz 3 überein. Neben der bislang verwendeten Diffusionszeit können auch die anderen Parameter zum Nachweis einer Bindung herangezogen werden. Daher dienen sie als alleiniger Bindungsparameter oder als weiterer neben der Diffusionszeit. Die Abweichung der charakteristischen Zeit  $\tau_K$  lässt sich durch den festgesetzten

Parameter  $\beta$  erklären, der direkten Einfluss auf  $\tau_K$  hat. Wenn sich nun  $\beta$  geringfügig ändert – wovon im realen System auszugehen ist – führt dies auch zu anderen Werten für die charakteristische Zeit  $\tau_K$ . Andersherum gesagt: Da hier  $\beta$  ein fester Wert ist, ist  $\tau_K$  mit einem größeren Fehler behaftet, der sich bereits in größeren Fehlerbalken widerspiegelt. Dieser Fehler ist systematisch und führt zu einer abweichenden Dissoziationskonstante.



**Abbildung 5.38:** Darstellung der Parameter  $\tau_D$ ,  $K$ ,  $\tau_K$  und  $P_{Fluoreszenz}$  (schwarz) sowie der entsprechenden sigmoidalen Bindungsisotherme gegen den Logarithmus der Konzentration des Proteins AtGRP7. Die Fehlerbalken geben ein 95%-Konfidenzintervall der Fitfunktion an.

Die Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen hat bereits in vorherigen Experimenten als Parameter für eine Bindung zwischen Oligonukleotid und Protein gedient. Findet eine Bindung statt, so ist der beobachtete Komplex schwerer und hat somit einen größeren hydrodynamischen Radius, der wiederum zu einer längeren Diffusionszeit führt. Die charakteristische Zeit  $\tau_K$  wird mit Zunahme der AtGRP7-Konzentration kürzer. Dies könnte an einer Konformationsänderung des

Oligonukleotids – insbesondere des Farbstoffs bzw. der Guanosin-Basen – und einer damit verbundenen sterischen Abschirmung langer Faltungsdynamiken liegen. Ebenfalls mit einer Bindung des Proteins lässt sich die Abnahme der Amplitude mit steigender AtGRP7-Konzentration erklären. Durch Bindung verändert sich das Verhältnis der Kontaktformationsraten zwischen Farbstoff und Guanosin, die durch die folgende Auswertung genauer untersucht werden können:

Zunächst kann die Thermodynamik der Moleküle, deren Farbstoff MR121 Fluoreszenz zeigt, berechnet werden. Für die relative Population der fluoreszenzierenden Moleküle  $P_{\text{Fluoreszenz}}$  folgt aus der Amplitude der Korrelationsfunktion:

$$P_{\text{Fluoreszenz}} = \frac{[F]}{[F] + [Fg]} = \frac{1}{1 + K} \quad 5.12$$

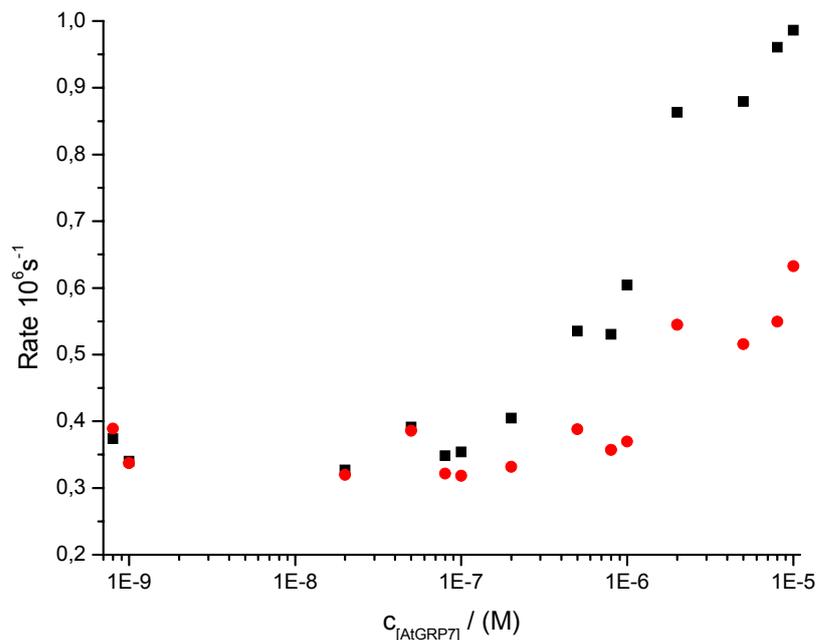
Auch diese Funktion zeigt einen sigmoidalen Verlauf. In [Abbildung 5.38] ist zu erkennen, dass die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle mit steigender AtGRP7-Konzentration ansteigt. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs MR121 durch Guanosin zurückgeht. Da diese Abnahme mit einem Anstieg der Konzentration des Proteins korreliert, wird die Fluoreszenzlöschung durch Bindung des Oligonukleotids an das Protein aufgehoben. Eine genauere Darstellung liefern die Kontaktformationsraten, die ebenfalls aus der Korrelationsfunktion berechnet werden können:

$$k_a = \frac{K}{\langle \tau \rangle \cdot (K + 1)} \quad \text{und} \quad k_d = \frac{1}{\langle \tau \rangle \cdot (K + 1)} \quad 5.13$$

Auf Grund von [Gleichung 5.9] ergibt sich  $\langle \tau \rangle = 3,32 \cdot \tau_K$ . Die entsprechenden Raten sind in [Abbildung 5.39] dargestellt. Für geringe Proteinkonzentrationen sind die Assoziationsraten  $k_a$  und Dissoziationsraten  $k_d$  nahezu identisch. Mit steigender Konzentration von AtGRP7 steigen die Raten ebenfalls an. Das bedeutet, dass es zu mehr Übergängen vom fluoreszierenden in den fluoreszenzgelöschten Zustand und umgekehrt pro Zeiteinheit kommt. Zunächst würde man vermuten, dass die Dissoziationsrate unabhängig von der Proteinkonzentration sein müsste, weil die Dissoziation des Farbstoff-Guanosin-Komplexes lediglich von der Wechselwirkung zwischen beiden Kontaktpartnern abhängt. Da die experimentellen Werte jedoch eine Zunahme ausdrücken, muss ein externer Parameter Einfluss auf die Dissoziation

haben. Dieser Einfluss kann jedoch nur vom Protein hervorgerufen werden. Es ist daher nahe liegend, dass das Protein „aktiv“ zu einer Dissoziation der Farbstoff-Guanosin-Komplexe beiträgt, indem es das Oligonukleotid durch Wechselwirkungskräfte in eine Konformation zwingt, in der Farbstoff und Guanosin räumlich getrennt sind.

Andererseits nehmen auch die Assoziationsraten zu – im Vergleich zu den Dissoziationsraten, die um den Faktor 2 zunehmen – sogar um den Faktor 3. Dass sich Farbstoff und Guanosin häufiger pro Zeiteinheit treffen, kann an der räumlichen Nähe beider Moleküle liegen. Diese kann ebenfalls durch Konformationsänderungen hergestellt werden; andererseits kann auch der zur Verfügung stehende Raum durch das Protein eingeschränkt werden. Betrachtet man die Kontaktformation als einen stochastischen Prozess, so erhöht sich die Rate der Kontaktformation mit einem Guanosin, wenn der Raum kleiner wird.



**Abbildung 5.39:** Die Assoziationsrate  $k_a$  (schwarz) und Dissoziationsrate  $k_d$  (rot) der Farbstoff-Guanosin-Kontaktformation in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteins AtGRP7.

Aus der Untersuchung der Assoziations- und Dissoziationsraten wird der Einfluss einer Bindung des Proteins AtGRP7 auf die Kontaktformation zwischen Farbstoff und

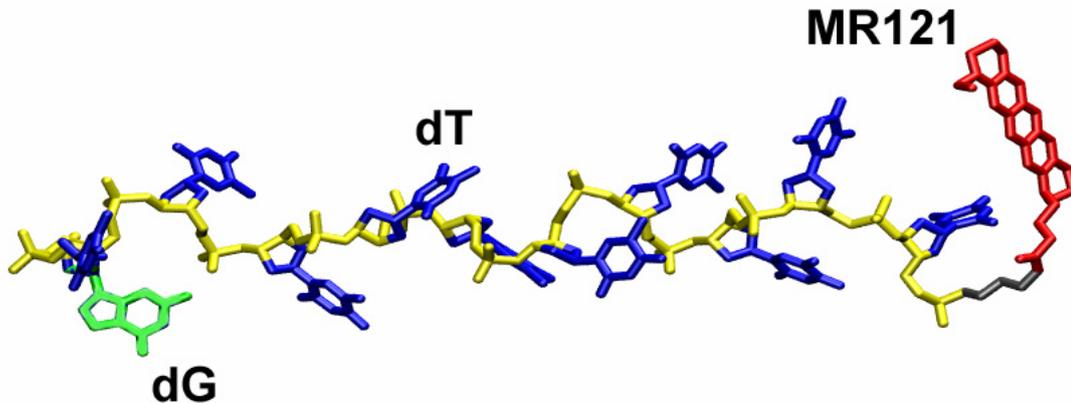
Guanosine ersichtlich. Wechselwirkungskräfte zwischen Oligonukleotid und Protein führen zu einer erhöhten Dissoziationsrate, während die Bindung den Farbstoff näher an quenchende Guanosine bringt, bzw. das Protein den zur Verfügung stehenden Raum einschränkt. Aus  $\tau=1/k$  kann man die entsprechenden Kontaktzeiten berechnen. Daraus folgt, dass die Kontaktzeit kürzer ist, je größer die Rate ist. Daher kann man sagen, dass sich der Farbstoff und die im Oligonukleotid enthaltenen Guanosine mit steigender Konzentration der Proteins AtGRP7 häufiger treffen, aber dafür kürzer in direkten Kontakt bleiben. Daraus lässt sich folgern, dass das Oligonukleotid in der Bindungstasche liegen muss. Der Farbstoff am Ende des Oligonukleotids befindet sich vermutlich ebenfalls in direkter Nachbarschaft der Bindungstasche. Diese Folgerungen sind konsistent mit der Position der Bindesequenz, die sich ebenfalls in der Sequenz 3 befindet und somit zu einer Bindung des Oligos mit dem Protein führt.

Allgemein kann man sagen, dass Untersuchungen, bei denen keine Kontaktformation zwischen Farbstoff und Guanosin auftritt, schwierig bzw. unmöglich sind. Es ist für solche Experimente auf die geeignete Wahl der Positionen – sowohl des Farbstoffs als auch der quenchenden Guanosine – zu achten. Bei einer entsprechenden Änderung kann die Löschkinetik des Farbstoffs für die Untersuchung einer Bindung herangezogen werden. Es ist möglich, die gleichen Dissoziationskonstanten aus diesen Parametern zu berechnen wie aus der Diffusionszeit. Darüber hinaus geben die Parameter der Löschkinetik unter Umständen zusätzliche Informationen über die Konformation des Oligonukleotids.

### ***5.12 Flexibilität des Rückgrats von DNA und RNA***

Mit der schnellen FCS lässt sich die Kinetik der Kontaktformation zwischen dem Farbstoff MR121 und quenchenden Guanosin-Basen eines Oligonukleotids auflösen. Zum Schluss dieser Untersuchungen folgen nun prinzipielle Untersuchungen der so genannten „end-to-end“-Kontaktformation, die Kontaktformation zwischen dem 3'- und 5'-Ende, von flexiblen DNA- und RNA-Oligonukleotiden unterschiedlicher Länge. Damit soll geklärt werden, inwiefern sich DNA und RNA in ihrer Flexibilität unterscheiden, d.h. wie sich die (fehlende) OH-Gruppe am Zucker auf die Flexibilität des Rückgrats auswirkt. Ein wesentlich flexibleres oder starrereres Zucker-Phosphat-Rückgrat könnte die deutlichen Unterschiede der Sekundärstruktur der in [Kapitel 5.8] untersuchten

DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide erklären. Andernfalls sind strukturelle Unterschiede auf unterschiedlich starke Basenpaarungen zurückzuführen.



**Abbildung 5.40:** Modell eines der auf „end-to-end“-Kontaktformationen untersuchten Oligonukleotide, an dessen Ende sich der Farbstoff MR121 (rot) bzw. das fluoreszenzlöschende Guanosin (grün) befinden (MR121-dT<sub>10</sub>-G).

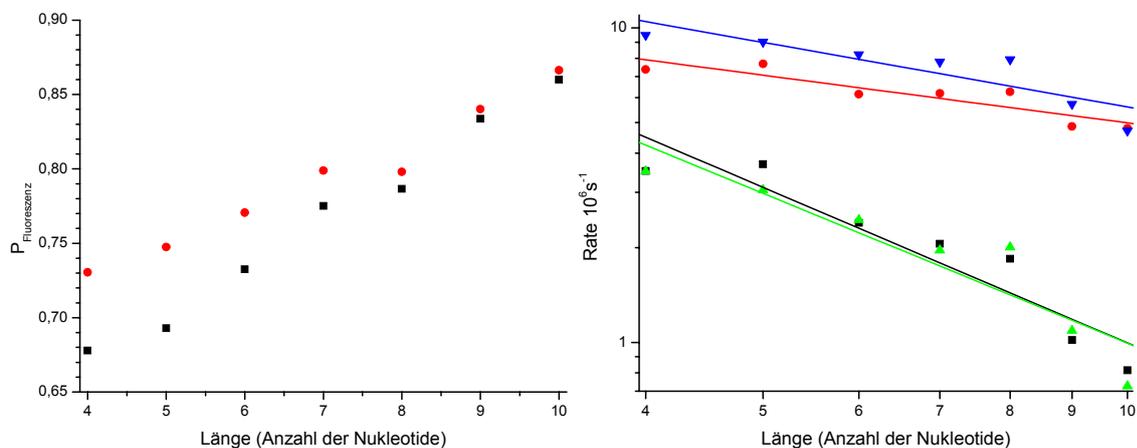
Um die diffusionsgesteuerten Kontaktraten zwischen 3'- und 5'-Ende zu untersuchen, werden unterschiedlich lange Oligonukleotide bestehend aus poly-Thymin (poly-dT) bzw. poly-Uracil (poly-U) synthetisiert, die keine stabilen intramolekularen Basenpaarungen ausbilden können. Am 5'-Ende befindet sich der Farbstoff MR121 an einem C3-Linker und am 3'-Ende ein Guanosin: MR121-(dT)<sub>x</sub>-G bzw. MR121-(U)<sub>x</sub>-G wobei x die Länge der poly-dT bzw. poly-U angibt. Da ein Einfluss des C3-Linkers für vergleichbar kurze Oligonukleotide nicht ausgeschlossen werden kann, werden die Längen x=4 bis 10 untersucht. Die Proben werden in einer nanomolaren Konzentration bei 20°C mittels FCS vermessen. Die Korrelationsfunktion wird mit dem folgenden Modell angefitet:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + K \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_K}} + 0,05 \cdot e^{-\frac{\tau}{8\mu s}} \right) \quad 5.14$$

wobei dieses dem normalen exponentiellen Modell entspricht, bei dem eine zusätzliche Komponente mit einer charakteristischen Zeit von 8µs und einer Amplitude von 0,05 für die Tripletzustände des Farbstoffs angenommen wird. Ein „stretched exponential“-Ansatz ist für diese Messungen nicht notwendig, weil die Oligonukleotide nur ein Guanosin – also nur einen Quencher – besitzen und keine intramolekularen

Wechselwirkungen zeigen sollten, für die man eine Verteilung der charakteristischen Zeit annehmen müsste.

Aus der charakteristischen Zeit und der Amplitude des Korrelationsfunktion können – wie oben beschrieben – der Anteil der fluoreszierenden Moleküle  $P_{\text{Fluoreszenz}}$  sowie die Kontaktraten für die DNA- und RNA-Oligonukleotide unterschiedlicher Länge berechnet werden [Abbildung 5.41]. Die Assoziationsrate  $k_a$  entspricht dabei der Rate, mit der sich eine „end-to-end“-Kontaktformation bildet, durch die der Farbstoff MR121 durch das Guanosin am anderen Ende des Oligonukleotids fluoreszenzgelöscht wird. Die Dissoziationsrate  $k_d$  entspricht dann der Rate, mit der dieser fluoreszenzgelöschte Zustand wieder aufgehoben wird.



**Abbildung 5.41: Anteil der fluoreszierenden Moleküle  $P_{\text{Fluoreszenz}}$  in Abhängigkeit von der Länge des Oligonukleotid (links): RNA (schwarz) bzw. DNA (rot). Kontaktformationsraten der DNA- und RNA-Oligonukleotide (rechts): Assoziationsraten von RNA (schwarz) und DNA (grün), sowie Dissoziationsraten von RNA (rot) und DNA (blau).**

Der relative Anteil der fluoreszierenden Moleküle zeigt für kurze RNA- und DNA-Oligonukleotide einen geringen, aber signifikanten Unterschied. Kurze DNA-Oligonukleotide zeigen bei einer thermodynamischen Betrachtungsweise stärkere Fluoreszenz als lange Oligonukleotide. Sie sind also weniger fluoreszenzgelöscht als RNA-Oligonukleotide. Das bedeutet, dass RNA-Oligonukleotide zeitlich betrachtet häufiger eine „end-to-end“-Kontaktformation einnehmen, wodurch der Farbstoff gelöscht wird. Für längere Oligonukleotide wird dieser Unterschied zwischen RNA und DNA deutlich geringer. Detaillierte Informationen liefert die Betrachtung der Assoziations- und Dissoziationsraten [Abbildung 5.41].

Auf Grund verschiedener Polymertheorien [150-154] lässt sich die Abhängigkeit der Raten von der Länge der Oligonukleotide durch eine Proportionalität darstellen:  $k \propto n^c$ , wobei n die Anzahl der Nukleotide ist. Der Exponent c liegt – je nach zu Grunde liegender Theorie – für die Assoziationsrate zwischen -1,5 und -2,0. Die Dissoziationsrate sollte weniger stark von der Länge abhängig sein. Eine vollständige Theorie zur Beschreibung von Oligonukleotiden ist jedoch derzeit nicht bekannt. Dieser Zusammenhang wird durch eine Linie in der doppeltlogarithmischen Darstellung verdeutlicht. Die Werte für c sind in [Tabelle 10] gegenübergestellt.

Die Assoziationsraten von RNA und DNA (schwarz und grün) unterscheiden sich im Wesentlichen nicht. Die Längenabhängigkeit beträgt  $c=-1,6\pm0,3$  und stimmt mit der Polymertheorie überein. Die Dissoziationsraten (rot und blau) unterscheiden sich deutlicher. Dieser Unterschied ist für kurze Oligonukleotide ausgeprägter als für lange. Ein Unterschied in der Flexibilität der RNA- bzw. DNA-Oligonukleotide kann jedoch nicht festgestellt werden, weil die Assoziationsraten nahezu identisch sind. Unterschiedliche Flexibilitäten müssten zu unterschiedlichen Assoziationsraten führen, da ein starreres Polymer weniger häufig so weit gebogen werden kann, dass sich beide Enden treffen. Dieser Prozess kommt bei einem sehr flexiblen Polymer viel häufiger vor. Dementsprechend müssten dann höhere Assoziationsraten beobachtet werden können.

Oligonukleotid	c ( $k_a$ )	c ( $k_d$ )
RNA	-1,6±0,3	-0,5±0,1
DNA	-1,6±0,3	-0,7±0,2

**Tabelle 10: Abhängigkeit der Assoziations- und Dissoziationsrate von der Länge der Oligonukleotide**

Die Betrachtung der Dissoziationsraten zeigt deutliche und unerwartete Unterschiede: Für die Längenabhängigkeit erhält man  $c=-0,5\pm0,1$  für die RNA, bzw.  $c=-0,7\pm0,2$  für die DNA. Eigentlich sollte der Prozess der Dissoziation des Farbstoff-Guanosin-Komplexes wegen der geringen Reichweite des photoinduzierten Elektronentransfers ausschließlich durch die beiden Wechselwirkungspartner Farbstoff und Guanosin charakterisiert sein. Unter Umständen hat auch noch der C3-Linker geringen Einfluss auf die Dissoziation. Wesentlich ist aber, dass die Dissoziation unabhängig von den Resten des Oligonukleotids – also Thymin oder Uracil – und der Länge des

Oligonukleotids sein sollte. Ein Einfluss der Länge könnte dann eine Rolle spielen, wenn die Flexibilität unterschiedlich wäre. Diese Ursache kann aber auf Grund der konstanten Assoziationsrate ausgeschlossen werden. Vielmehr könnte es zu schwachen intramolekularen Wechselwirkungen zwischen zwei Thymin- bzw. Uracil-Resten kommen. Die Stärke der Wechselwirkung von Thymin dürfte ebenfalls wegen der zusätzlichen Methylgruppe verschieden von der Wechselwirkungsstärke von Uracil sein. Dies könnte zu unterschiedlichen Dissoziationsraten führen. Außerdem kann ein unterschiedlicher Lösungsmiteleinfluss auf die RNA bzw. DNA nicht ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass hinsichtlich der Flexibilität von RNA und DNA keine Unterschiede bestehen. Vielmehr scheinen sich bereits in diesen Messungen Wechselwirkungen der Basen bemerkbar zu machen, die in heterogenen Oligonukleotiden dazu führen, dass RNA stärker eine Sekundärstruktur ausbildet als DNA.

## **6 Zusammenfassung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinwechselwirkungen mit anderen Proteinen mittels zeitaufgelöster nativer UV-Fluoreszenz (UV-FLIM) und mit RNA bzw. DNA-Oligonukleotiden durch schnelle Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) nachgewiesen. Die Wechselwirkungen konnten sowohl detektiert als auch quantifiziert werden. Darüber hinaus konnten die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Oligonukleotiden derart charakterisiert werden, dass sie Rückschlüsse auf ihren molekularbiologischen und pflanzenphysiologischen Mechanismus ermöglichten.

### **6.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde eine neuartige markierungsfreie Detektionsmethode entwickelt, die auf einer zweidimensionalen Messung der nativen UV-Fluoreszenzlebensdauer basiert. Dieses Verfahren wurde erfolgreich zum Nachweis der pH-Abhängigkeit von Tryptophan in wässriger Lösung, zur Aufdeckung von Proteinfaltungen sowie zum Nachweis und zur Quantifizierung von p53-Antikörpern eingesetzt. Zunächst wurde modellhaft die pH-Abhängigkeit von Tryptophan in wässriger Lösung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine exakte Bestimmung der UV-Fluoreszenzlebensdauer mit dem beschriebenen Aufbau möglich ist. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer vom pH-Wert, was auf die Protonierung der Amino- bzw. Ionisierung der Carboxylgruppe des Tryptophans zurückgeführt werden konnte. Für sehr hohe pH-Werte kam es zu einer gänzlichen Zerstörung des chromophoren Systems und einer Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer. Weitere Ergebnisse konnten in einem zweiten Versuch erzielt werden, bei dem der Entfaltungsprozess des menschlichen Serumalbumins – ein Protein mit einem einzigen Tryptophan – durch Guanidiniumhydrochlorid an Hand einer Änderung der nativen UV-Fluoreszenzlebensdauer beobachtet werden konnte. Dazu wurde die Lebensdauer bei unterschiedlichen Konzentrationen des Denaturanten bestimmt. Die gemessenen Lebensdauern zeigten einen sigmoidalen Verlauf, der den Übergang vom gefalteten in den entfalteten Zustand des Proteins widerspiegelt. Schließlich wurde eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinwechselwirkungen entwickelt, mit der

eine Nachweisgrenze im pikomolaren Bereich erreicht werden konnte. Diese Methode beruht ausschließlich auf unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern der in Proteinen und Peptiden enthaltenen Aminosäuren Tryptophan- bzw. Tyrosin. Für die Machbarkeitsstudie wurden p53-Antikörper – ein spezifischer Tumormarker in der Krebsdiagnostik – und ein kurzes lineares Peptidepitop des p53-Proteins als Rezeptor verwendet. Es konnte nach Zugabe von p53-Antikörpern eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer der p53-Peptidepitope, die auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert waren, beobachtet werden. Die Änderung zeigte einen sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration, wodurch eindeutig eine spezifische Rezeptor-Ligand-Bindung bis in den pikomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden konnte.

Mit diesem Aufbau konnten geringste Lebensdauerunterschiede aufgelöst werden, die bei dem untersuchten p53-Modellsystem mit 200ps ausreichend waren, um die Bindung eines Liganden an den Rezeptor nachzuweisen. Normalerweise wird bei der Datenanalyse von Fluoreszenzlebensdauer-messungen ein bi- oder multi-exponentielles Decay-Modell angefitet. Dieses Verfahren kann sehr zeitaufwendig sein, weil ein Decay-Modell mit mehreren Abklingkomponenten unpräzise – gerade bei geringen Fluoreszenzintensitäten – und numerisch instabil sein kann. Aus diesem Grund wurde ein robustes Modell-freies Verfahren zur Bestimmung einer „mittleren Fluoreszenzlebensdauer“  $\langle T(x,y) \rangle$  und zur grafischen Darstellung der Messdaten benutzt. Bei diesem Verfahren wird kein exponentielles Modell angefitet, weil dies wegen der Komplexität einer zeitaufgelösten Fluoreszenzabklingkurve der nativen Protein-Fluoreszenz ungenau ist. Stattdessen wird eine – entsprechend einem Massenschwerpunkt in der Mechanik – mittlere Zeit  $\langle T(x,y) \rangle$  berechnet, die so schnell und robust ist, dass sie Lebensdauerinformationen sogar in Echtzeit liefern kann.

Die vorgestellte Technik hat eine Nachweisempfindlichkeit und einen Dynamikbereich, der vergleichbar mit dem konventionellen ELISA-Verfahren ist. Sie ist daher prinzipiell für den Nachweis und die Quantifizierung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen geeignet und könnte daher eine große Rolle für zukünftige Detektionsverfahren von Protein-Chips spielen. Diese könnten für die Krebsdiagnose aber auch im Proteinscreening einzelner Zellen eingesetzt werden und damit der Systembiologie eine Vielzahl von Informationen in Form von Protein-Wechselwirkungsparametern liefern. Für einen möglichen Einsatz im Hochdurchsatz-Screening ist aber eine drastische Reduzierung der Spotgröße notwendig. Darüber hinaus bedarf es eines

Substrats, das ebenso fluoreszenzarm aber weniger porös als Nitrocellulose ist, um die sterische Hinderung einer Bindung zu minimieren. Zusätzlich sollte in Zukunft die Detektionsempfindlichkeit verbessert werden.

Die Spotgröße kann drastisch durch Einsatz von Spotting-Techniken reduziert werden. Mittels der Ink-Jet-Technik [155], die vergleichbar mit dem Prinzip eines Tintenstrahldruckers ist, oder mit Nadeln, die auf die Oberfläche des Substrats gedrückt werden [156-158], können ~0,5nl-Spots mit einer Größe von ~100µm und dadurch Dichten von ungefähr 5000 Spots/cm<sup>2</sup> erzielt werden. Kleinere Strukturen in der Größenordnung von wenigen Mikrometern können durch das „Microcontact Printing“ (µCP) erreicht werden [159, 160]. Dazu wird zunächst ein Stempel beispielsweise aus PDMS (Poly-Dimethylsiloxan) erstellt und dessen Oberfläche mit Proteinen inkubiert. Diese werden anschließend auf das Microarray-Substrat übertragen und können dort immobilisiert werden.

Die Auswahl anderer Substrate ist wegen der Verwendung von UV-Anregungslicht stark eingeschränkt, weil viele Materialien eine hohe UV-Autofluoreszenz zeigen. Als eine der wenigen möglichen Alternativen kommt daher Gold in Frage. Die derzeit kommerziell erhältlichen Gold-Slides haben eine ca. 10nm dicke Schicht, die auf Glas-Objektträgern aufgedampft ist. Darüber hinaus sind auch dünnere Nitrocellulosemembranen erhältlich, die unter Umständen weniger porös als die verwendeten sind [161]. Weniger poröse Materialien können nicht mehr so viele Proteine binden, weshalb die Detektionsempfindlichkeit verbessert werden muss. Ziel dabei ist es, einzelne bzw. wenige Tryptophan-Reste nachweisen zu können. Erst kürzlich haben in der Literatur veröffentlichte Ergebnisse das Potenzial von nativen UV-Fluoreszenzlebensdauermessungen auf der Einzelmolekülebene aufgezeigt [162].

## **6.2 Protein-RNA/DNA-Wechselwirkungen**

Die schnelle FCS konnte als ein Verfahren zum Nachweis von Protein-RNA- bzw. Protein-DNA-Wechselwirkungen etabliert werden. Mit diesem Verfahren war es möglich, einen tieferen Einblick in den negativen Rückkopplungsmechanismus des zirkadianen Slave-Oszillators bestehend aus dem Protein AtGRP7 und seiner mRNA zu erhalten. Vor dem Hintergrund theoretischer Simulationen der mRNA-

Sekundärstruktur mit den Computerprogrammen MFOLD und RNASHAPES wurde die mRNA-Bindestelle des Proteins auf wenige Nukleotide eingegrenzt und ihre Sekundärstruktur vor und nach der Bindung mit AtGRP7 untersucht. Zur Eingrenzung der Bindestelle wurden von der bereits bekannten 32 Basen langen RNA-Sequenz sich einander überlappende 12 Basen lange Oligonukleotide erstellt. Auf Grund der ermittelten Dissoziationskonstanten konnte die Bindestelle auf die Basensequenz (TT)CTGG eingegrenzt werden. Dabei sind die Basen CTGG wichtig für eine spezifische Erkennung und Bindung des Oligonukleotids. Die beiden Thyminen scheinen dabei eher eine den gebildeten Komplex stabilisierende Funktion zu haben. Für die Bindung konnte eine Dissoziationskonstante  $K_d$  im Bereich von  $1 \cdot 10^{-7}$  bis  $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  ermittelt werden.

Die Experimente zeigten, dass das Protein AtGRP7 sowohl RNA- als auch DNA-Oligonukleotide als Einzelstrang bindet. Obwohl nur die RNA zellphysiologische Bedeutung hat, scheint der chemische Unterschied der beiden Oligonukleotide keine oder nur eine geringe Bedeutung für die Bindung zu haben. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur wesentlichen Einfluss auf die Bindung hat. Der Vergleich der Konformationsdynamik zwischen einem synthetischen Hairpin mit einem Stamm bestehend aus 3 komplementären Basen und der entsprechenden nativen Sequenz, die die Bindestelle enthält, zeigte eine Konformationsänderung des Hairpins bei Bindung mit dem Protein AtGRP7. Dies macht deutlich, dass das Protein durch die Bindung eine Kraft auf das Hairpin ausübt, der Stamm aufgerissen wird und das Oligonukleotid in der Bindungstasche eine andere Konformation annimmt. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Protein durch Bindung an seine mRNA in der Lage ist, an dieser Änderungen der Sekundärstruktur vorzunehmen und dadurch unmittelbar oder durch eine Kaskade weiterer Prozessierungen zum alternativen Spleißen zu führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Konformation eines bindenden Oligonukleotids durch Bindung stark eingeschränkt ist. Zum einen scheint das Oligonukleotid im Vergleich zur ungebundenen linearen Struktur etwas zusammengedrückt in der U-förmigen Bindungstasche des Proteins AtGRP7 vorzuliegen. Zum anderen scheint das Protein auch auf lineare Strukturen Kräfte auszuüben, die von den für die Bindung relevanten Aminosäuren ausgehen müssen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich RNA und DNA nur unwesentlich in ihrer Flexibilität unterscheiden. Die ausgeprägte Sekundärstruktur eines RNA-Oligonukleotids ist daher auf stärkere Wechselwirkungen zwischen den Basen zurückzuführen.

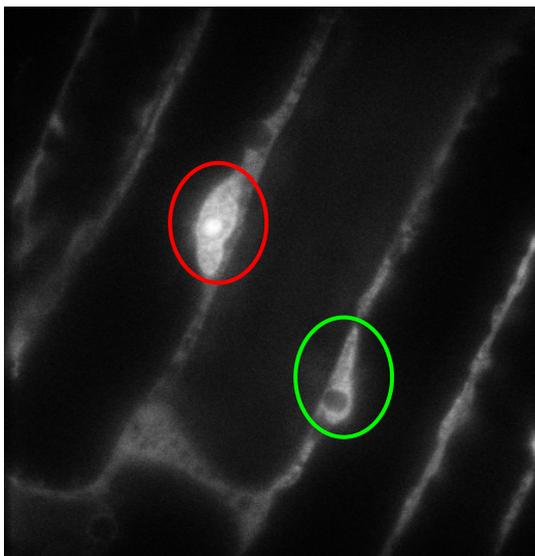
Die Bindungsuntersuchungen wurden mit schneller FCS an farbstoffmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde die Diffusionszeit des Farbstoffs durch das Beobachtungsvolumen untersucht. Dieser ist kovalent am Oligonukleotid gebunden, das als Monomer oder als Komplex mit dem Protein AtGRP7 vorliegt. Dementsprechend ändert sich die Diffusionszeit. Das vorgestellte Verfahren liefert aussagekräftige Ergebnisse und ist für Bindungsstudien gut geeignet.

In der vorliegenden Arbeit konnten aber auch Konformationen von Oligonukleotiden bzw. Konformationsänderungen durch Bindung des Proteins untersucht werden. Dies wurde möglich durch eine qualitative und quantitative Auswertung der Fluoreszenzlöschkinetik des Farbstoffs, die durch direkten Kontakt mit dem Nukleotid Guanosin hervorgerufen wird. Dazu wurde die Korrelationsfunktion mit einem „stretched exponential“-Modell gefittet. Basierend auf der Kohlrausch-Williams-Watts-Relaxationsfunktion konnte eine geeignete Methode zur quantitativen Untersuchung der Fluoreszenzlöschkinetik etabliert werden. Analog zur Diffusionszeit zeigten die daraus gewonnenen Parameter ebenfalls eine sigmoidale Bindungsisotherme. Zusätzlich konnten die Kontaktraten des Farbstoffs mit quencheden Guanosinen eines nativen Oligonukleotids vor und nach der Bindung mit AtGRP7 quantifiziert und zur Beantwortung biologischer Fragestellungen ausgewertet werden.

Mit diesem vorgestellten leistungsstarken Verfahren können in Zukunft schnell und effizient weitere Untersuchungen von Protein-RNA- bzw. Protein-DNA-Wechselwirkungen durchgeführt werden. Für das Verständnis des zirkadianen Slave-Oszillators bedarf es der Untersuchung der RNA-Sequenz aus der 2. Hälfte des Introns. Darüber hinaus könnte es auch auf der bereits untersuchten RNA-Sequenz aus dem 3' UTR noch weitere Bindestellen geben. In einem weiteren Schritt könnte durch Punktmutationen der bindenden RNA-Sequenz bzw. einzelne Aminosäuren im Protein AtGRP7 die an der Bindung beteiligten Wechselwirkungspartner exakt eingegrenzt werden. Dies könnte zu einem fundamentalen Verständnis einer ganzen Klasse von RNA-bindenden Proteinen beitragen. Unter Umständen sind dazu kinetische Informationen des Bindungsmechanismus, die jedoch mit diesem Verfahren nicht zugänglich sind, hilfreich.

Die Vorteile der schnellen FCS liegen in ihrer Sensitivität und der Möglichkeit, schnelle Fluoreszenzfluktuationen auflösen zu können. Dadurch können bei einer sehr geringen Probenkonzentration im Bereich von  $10^{-9}$ M in einem Femtoliter-Probenvolumen einzelne Moleküle untersucht werden. Durch die geeignete Wahl eines Farbstoffs und fluoreszenzlöschender Moleküle wie Guanosin oder Tryptophan lassen Kontaktformationsraten zwischen Farbstoff und Quencher Rückschlüsse auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zu. Diese können – wie hier vorgestellt – nicht nur für den Nachweis einer Bindung, sondern auch für das Erlangen eines tieferen Verständnisses des molekularen Bindungsmechanismus von Nutzen sein.

Alle vorgestellten Experimente wurden *in vitro* durchgeführt. Die pflanzenphysiologische Bedeutung ergibt sich jedoch aus einem komplexen Zusammenspiel vieler Proteine. Man geht davon aus, dass AtGRP7 sowohl im Cytoplasma als auch im



**Abbildung 6.1:** Wurzelzellen der *Arabidopsis thaliana* mit dem stabil exprimierten Fusionsprotein AtGRP7-GFP. In einem Zellkern mit umgebendem Cytoplasma befindet sich eine hohe Proteinkonzentration (rot), während in einem Zellkern einer anderen Zelle nur wenig AtGRP7-GFP ist (grün).

Zellkern einer Zelle der *Arabidopsis thaliana* lokalisiert ist. Dadurch können unterschiedliche Funktionen, wie die Regulation des alternativen Spleißens und des Abbaus, in unterschiedlichen Zellkompartimenten wahrgenommen werden. *In vivo* lässt sich die Bindung mittels der FCS nur bedingt untersuchen, weil sie eine Fluoreszenzmarkierung eines der Bindungspartner voraussetzt. Aus diesem Grund können aber für Untersuchungen *in vivo* bestimmte Farbstoffe direkt mit dem Protein AtGRP7 exprimiert werden, um die subzelluläre Verteilung mit mikroskopischen Verfahren nachzuweisen. Das weit verbreitete Fusionsprotein GFP (Green Fluorescent Protein) ist wegen der langen Halbwertszeit nicht geeignet, um Oszillationen innerhalb einer Zelle nachzuweisen. Es konnten Aufnahmen von Wurzelzellen der

*Arabidopsis thaliana* mit stabil exprimiertem AtGRP7-GFP mittels eines 2-Photonen-Laser Scanning-Mikroskops gemacht und ein unterschiedliches Verhalten der Zellen

beobachtet werden [Abbildung 6.1]. Neben GFP gibt es ein Konstrukt mit deutlich verkürzter Halbwertszeit, das so genannte d2GFP (destabilized GFP) [163]. Darüber hinaus könnte man diese Konstrukte in Verbindung mit der FRAP-Technik (Fluorescence Recovery After Photobleaching) einsetzen [164]. Besonders interessant für solche Anwendungen scheint eine neue Mutante des GFP zu sein. Dronpa ist reversibel photoschaltbar [165]. Es lässt sich bei einer Wellenlänge von 488nm in eine nur schwach fluoreszierende protonierte Form überführen. Mit 405nm lässt sich diese nahezu vollständig reversibel in die fluoreszierende Form zurückschalten [166-168]. Dadurch ist es möglich, AtGRP7-Dronpa in unterschiedlichen Zellkompartimenten selektiv aus- oder anzuschalten und danach die Regenerierung der Fluoreszenz bzw. die Diffusion in andere Zellkompartimente zu beobachten.

## 7 Anhang

### Protokoll zur Herstellung eines diskontinuierlichen Tris-Glycin Polyacrylamidgels

#### 15% PA Trenngel:

1,875 mL	Acrylamid 40% (37,5:1)
1,33 mL	1,5 M Tris HCl pH 8,8
1,687 mL	H <sub>2</sub> O
0,05 mL	10% (w/v) SDS
10 µL	TEMED
50 µL	10% APS

---

6 mL Gesamtvolumen

#### Sammelgel:

0,375 mL	Acrylamid 40% (37,5:1)
0,75 mL	0,5 M Tris HCl pH 6,8
1,804 mL	H <sub>2</sub> O
0,04 mL	10% (w/v) SDS
5 µL	TEMED
40 µL	10% APS

#### Laufpuffer:

192 mM	Glycine
25 mM	Tris
	SDS

#### Bandshift Puffer:

Substanz	10 x Konzentration	1 x Konz (im Ansatz)
HEPES pH 7,5	200 mM	20 mM
NaCl	1 M	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	1 mM
10% NP40	40 µL	0,01 %

#### Ladepuffer:

Lämmli-Puffer

1. gelabelte RNA in der Verdünnungsstufe  $10^{-5}M$  kurz auf  $80^{\circ}C$  erhitzen und anschl. wieder auf RT abkühlen lassen.

2. Zusammenpipettieren der Bandshiftansätze mit verschiedenen tRNA-Konzentrationen:

- 1,5  $\mu$ L 10x Bandshift Puffer
- 0,2  $\mu$ L RNAsin Eppendorf
- 1  $\mu$ L Glycerin (87%)
- 1  $\mu$ L tRNA (100 ng/ $\mu$ L bis 10  $\mu$ g/ $\mu$ L)
- 5  $\mu$ L AtGRP7 (1,3  $\mu$ g/ $\mu$ L)
- 1  $\mu$ L MR121 Farbstoff-markierte RNA  $10^{-5} M$
- 5,3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O

3. Zusammenpipettieren der Bandshiftansätze mit verschiedenen unmarkierten Oligo-Konzentrationen:

- 1,5  $\mu$ L 10x Bandshift Puffer
- 0,2  $\mu$ L RNAsin Eppendorf
- 1  $\mu$ L Glycerin (87%)
- 5  $\mu$ L unlabeled Oligo (2 ng/ $\mu$ L bis 2  $\mu$ g/ $\mu$ L)
- 5  $\mu$ L AtGRP7 (1,3  $\mu$ g/ $\mu$ L)
- 1  $\mu$ L MR121 Farbstoff-markierte RNA  $10^{-5} M$
- 1,3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O

4. Inkubation der Ansätze bei RT ( $20^{\circ}C$ ) für 30 min. Während dessen die übrigen Proben für das Gel vorbereiten:

- a. 1 $\mu$ L  $10^{-5} M$  RNA wird mit 1  $\mu$ L BS-Puffer, 1  $\mu$ L Glycerin und 0,5  $\mu$ L RNAsin versetzt. H<sub>2</sub>O ad 10  $\mu$ L.
- b. 5  $\mu$ L AtGRP7 werden mit 1  $\mu$ L BS-Puffer, 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O und 1 $\mu$ L Glycerin gemischt.

5. Alle Ansätze werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 2,3J/cm<sup>2</sup> im UV-Licht vernetzt.

6. Alle Proben werden mit 15 $\mu$ L Ladebuffer versetzt und für 5 Minuten auf  $95^{\circ}C$  erhitzt.

7. Alle Proben auf das Gel auftragen und 1h bei 12mA laufen lassen, dann die Spannung auf 17mA erhöhen. BPB bis zum Gelende laufen lassen.

8. Gelbelegung:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nur RNA Oligo	AtGRP7 + 100ng tRNA	AtGRP7 + 1 $\mu$ g tRNA	AtGRP7 + 10 $\mu$ g tRNA	nur AtGRP7	AtGRP7 + 10ng Oligo	AtGRP7 + 100ng Oligo	AtGRP7 + 1 $\mu$ g Oligo	AtGRP7 + 10 $\mu$ g Oligo	Protein-marker Fermentas #SM0441



## 8 Literaturverzeichnis

1. Soussi, T., *The humoral response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapy*. Immunol. Today, 1996. **17**(8): 354-356.
2. International Human Genome Sequencing Consortium, *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): 931.
3. Venter, J.C., et al., *The Sequence of the Human Genome*. Science, 2001. **291**(5507): 1304-1351.
4. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): 860-921.
5. Gavin, A.C., et al., *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature, 2002. **415**(6868): 141-147.
6. Stanfield, R.L., et al., *Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody*. Structure, 1993. **1**(2): 83-93.
7. Jones, S., Thornton, J.M., *Principles of protein-protein interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. **93**(1): 13-20.
8. Stanfield, R.L., Wilson, I.A., *Protein-peptide interactions*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1995. **5**(1): 103-113.
9. Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., Thornton, J.M., *Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level*. Nucleic Acids Res., 2001. **29**(13): 2860-2874.
10. Seeman, N.C., Rosenberg, J.M., Rich, A., *Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1976. **73**(3): 804-808.
11. Pabo, C.O., Sauer, R.T., *Protein-DNA recognition*. Annu. Rev. Biochem., 1984. **53**: 293-321.
12. Draper, D.E., *Themes in RNA-protein recognition*. J. Mol. Biol., 1999. **293**(2): 255-270.
13. Nagai, K., *RNA-protein complexes*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1996. **6**(1): 53-61.
14. Uetz, P., et al., *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000. **403**(6770): 623-627.
15. Ideker, T., Galitski, T., Hood, L., *A new approach to decoding life: systems biology*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2001. **2**: 343-372.

16. Pálsson, B., *The challenges of in silico biology*. Nat. Biotechnol., 2000. **18**(11): 1147-1150.
17. Xenarios, I., Eisenberg, D., *Protein interaction databases*. Curr. Opin. Biotechnol., 2001. **12**(4): 334-339.
18. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Phys., 1948. **437**(2): 55-75.
19. Cui, Y., et al., *Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species*. Science, 2001. **293**(5533): 1289-1292.
20. Ros, R., et al., *Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998. **95**(13): 7402-7405.
21. Schwesinger, F., et al., *Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000. **97**(18): 9972-9977.
22. Aslan, K., Lakowicz, J.R., Geddes, C.D., *Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2005. **9**(5): 538-544.
23. Smith, E.A., Corn, R.M., *Surface Plasmon Resonance Imaging as a Tool to Monitor Biomolecular Interactions in an Array Based Format*. Appl. Spectr., 2003. **57**: 320.
24. Roegerer, J., et al., *Ultrasensitive detection of unstained proteins in acrylamide gels by native UV fluorescence*. Anal. Chem., 2003. **75**(1): 157-159.
25. Lane, D.P., Crawford, L.V., *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): 261-263.
26. Linzer, D.I., Levine, A.J., *Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells*. Cell, 1979. **17**(1): 43-52.
27. Benchimol, S., Pim, D., Crawford, L., *Radioimmunoassay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines*. EMBO J., 1982. **1**(9): 1055-1062.
28. Soussi, T., *p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review*. Cancer Res., 2000. **60**(7): 1777-1788.
29. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): 15-16.
30. Nigro, J.M., et al., *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. Nature, 1989. **342**(6250): 705-708.

31. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): 49-53.
32. Lubin, R., et al., *p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification, and characterization*. Clin. Cancer Res., 1995. **1**(12): 1463-1469.
33. Lubin, R., et al., *Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer*. Nat. Med., 1995. **1**(7): 701-702.
34. Lubin, R., et al., *Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface*. Cancer Res., 1993. **53**(24): 5872-5876.
35. Dunlap, J.C., *Molecular bases for circadian clocks*. Cell, 1999. **96**(2): 271-290.
36. Young, M.W., Kay, S.A., *Time zones: a comparative genetics of circadian clocks*. Nat. Rev. Genet., 2001. **2**(9): 702-715.
37. Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E., *Genes encoding glycine-rich Arabidopsis thaliana proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm*. Plant Physiol., 1994. **104**(3): 1015-1025.
38. Heintzen, C., et al., *AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997. **94**(16): 8515-8520.
39. Van Nocker, S., Vierstra, R.D., *Two cDNAs from Arabidopsis thaliana encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains*. Plant Mol. Biol., 1993. **21**(4): 695-699.
40. Staiger, D., Heintzen, C., *The circadian system of Arabidopsis thaliana: forward and reverse genetic approaches*. Chronobiol. Int., 1999. **16**(1): 1-16.
41. Maris, C., Dominguez, C., Allain, F.H., *The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression*. FEBS J., 2005. **272**(9): 2118-2131.
42. Staiger, D., et al., *The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA*. Plant J., 2003. **33**(2): 361-371.
43. Knemeyer, J.P., Marme, N., Sauer, M., *Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level*. Anal. Chem., 2000. **72**(16): 3717-3724.
44. Widengren, J., Dapprich, J., Rigler, R., *Fast interactions between Rh6G and dGTP in water studied by fluorescence correlation spectroscopy*. Chem. Phys., 1997. **216**: 417.

45. Seidel, C.A.M., Schulz, A., Sauer, M.H.M., *Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies*. J. Phys. Chem., 1996. **100**(13): 5541-5553.
46. Edman, L., Mets, U., Rigler, R., *Conformational transitions monitored for single molecules in solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. **93**(13): 6710-6715.
47. Neuweiler, H., Doose, S., Sauer, M., *A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005. **102**(46): 16650-16655.
48. Heinlein, T., et al., *Photoinduced Electron Transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins*. J. Phys. Chem. B, 2003. **107**(31): 7957-7964.
49. Neuweiler, H., Sauer, M., *Using photoinduced charge transfer reactions to study conformational dynamics of biopolymers at the single-molecule level*. Curr. Pharm. Biotechnol., 2004. **5**(3): 285-298.
50. Bonnet, G., Krichevsky, O., Libchaber, A., *Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998. **95**(15): 8602-8606.
51. Goddard, N.L., et al., *Sequence dependent rigidity of single stranded DNA*. Phys. Rev. Lett., 2000. **85**(11): 2400-2403.
52. Magde, D., Elson, E.L., Webb, W.W., *Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization*. Biopolymers, 1974. **13**(1): 29-61.
53. Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. Eur. Biophys. J., 1993. **22**(3): 169-175.
54. Chattopadhyay, K., Elson, E.L., Frieden, C., *The kinetics of conformational fluctuations in an unfolded protein measured by fluorescence methods*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005. **102**(7): 2385-2389.
55. Chattopadhyay, K., et al., *Measuring unfolding of proteins in the presence of denaturant using fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys. J., 2005. **88**(2): 1413-1422.
56. Demtröder, W., *Atome, Moleküle und Festkörper. 2.*, überarb. und erw. Aufl. 2000, Berlin: Springer. 617 S.
57. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1983, New York: Plenum Press. XIV, 496 S.

58. Magde, D., Elson, E.L., Webb, W.W., *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Phys. Rev. Lett., 1972. **29**(11): 705.
59. Elson, E.L., Magde, D., *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, 1974. **13**(1): 1-27.
60. Krichevsky, O., Bonnet, G., *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*. Rep. Progr. Phys., 2002. **65**(2): 251.
61. Winkler, T., et al., *Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1999. **96**(4): 1375-1378.
62. Eggeling, C., et al., *Highly sensitive fluorescence detection technology currently available for HTS*. Drug Disc. Today, 2003. **8**(14): 632-641.
63. Auer, M., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy: lead discovery by miniaturized HTS*. Drug Disc. Today, 1998. **3**: 457.
64. Smoluchowski, M., *Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen*. Physik. Z., 1916. **17**: 557-571, 585-599.
65. Einstein, A., *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*. Ann. Phys., 1905. **17**: 549-560.
66. Einstein, A., *Zur Theorie der Brownschen Bewegung*. Ann. Phys., 1906. **19**: 371-381.
67. Maiti, S., Haupts, U., Webb, W.W., *Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997. **94**(22): 11753-11757.
68. Lakowicz, J.R., Hrsg. *Topics in fluorescence spectroscopy*. Vol. 1. 1991, Plenum Press: New York. XIII, 453 S.
69. Koppel, D.E., *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy*. Phys. Rev. A, 1974. **10**(6): 1938-1945.
70. Kask, P., Günther, R., Axhausen, P., *Statistical accuracy in fluorescence fluctuation experiments*. Eur. Biophys. J., 1997. **25**(3): 163-169.
71. Qian, H., *On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys. Chem., 1990. **38**(1-2): 49-57.
72. [http://www.vcell.de/genomstation/proteinbiosynthese\\_schema.html](http://www.vcell.de/genomstation/proteinbiosynthese_schema.html)
73. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): 575-581.

74. Koolman, J., Röhm, K.-H., *Taschenatlas der Biochemie*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. 2003, Stuttgart: Thieme. IX, 478 S.
75. Morgan, E.L., Weigle, W.O., *Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulin*. Adv. Immunol., 1987. **40**: 61-134.
76. Hayama, R., Coupland, G., *Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering*. Curr. Opin. Plant Biol., 2003. **6**(1): 13-19.
77. Barak, S., et al., *All in good time: the Arabidopsis circadian clock*. Trends Plant Sci., 2000. **5**(12): 517-522.
78. Alabadi, D., et al., *Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock*. Science, 2001. **293**(5531): 880-883.
79. Staiger, D., *RNA-binding proteins and circadian rhythms in Arabidopsis thaliana*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 2001. **356**(1415): 1755-1759.
80. O'connor, T., Gosling, J.P., *Antibody affinity and the detection limit of solid-phase enzyme immunoassay*. Biochem. Soc. Trans., 1998. **26**(1): S42.
81. Marme, N., et al., *Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan*. Bioconjug. Chem., 2003. **14**(6): 1133-1139.
82. Lindsey, C.P., Patterson, G.D., *Detailed comparison of the Williams-Watts and Cole-Davidson functions*. J. Chem. Phys., 1980. **73**(7): 3348-3357.
83. Alvarez, F., Alegria, A., Colmenero, J., *Relationship between the time-domain Kohlrausch-Williams-Watts and frequency-domain Havriliak-Negami relaxation functions*. Phys. Rev. B, 1991. **44**(14): 7306-7312.
84. Axelrod, D., et al., *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*. Biophys. J., 1976. **16**(9): 1055-1069.
85. Periasamy, N., Bicknese, S., Verkman, A.S., *Reversible photobleaching of fluorescein conjugates in air-saturated viscous solutions: singlet and triplet state quenching by tryptophan*. Photochem. Photobiol., 1996. **63**(3): 265-271.
86. Elson, E.L., *Membrane dynamics studied by fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery*. Soc. Gen. Physiol. Ser., 1986. **40**: 367-383.
87. White, A., *Effect of pH on fluorescence of tryosine, tryptophan and related compounds*. Biochem. J., 1959. **71**(2): 217-220.
88. De Lauder, W.B., Wahl, P., *pH dependence of the fluorescence decay of tryptophan*. Biochemistry, 1970. **9**(13): 2750-2754.
89. Szabo, A.G., Rayner, D.M., *Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution*. J. Am. Chem. Soc., 1980. **102**(2): 554-563.

90. Petrich, J.W., et al., *On the origin of nonexponential fluorescence decay in tryptophan and its derivatives*. J. Am. Chem. Soc., 1983. **105**(12): 3824-3832.
91. Robbins, R.J., et al., *Photophysics of aqueous tryptophan: pH and temperature effects*. J. Am. Chem. Soc., 1980. **102**(20): 6271-6279.
92. Gudgin, E., Lopez-Delgado, R., Ware, W.R., *The tryptophan fluorescence lifetime puzzle. A study of decay times in aqueous solution as a function of pH and buffer composition*. Can. J. Chem., 1981. **59**(7): 1037-1044.
93. Jameson, D.M., Weber, G., *Resolution of the pH-dependent heterogeneous fluorescence decay of tryptophan by phase and modulation measurements*. J. Phys. Chem., 1981. **85**(8): 953-958.
94. Anfinsen, C.B., et al., *The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1961. **47**: 1309-1314.
95. Shortle, D., *The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability*. FASEB J., 1996. **10**(1): 27-34.
96. Anfinsen, C.B., Haber, E., *Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds*. J. Biol. Chem., 1961. **236**: 1361-1363.
97. Uversky, V.N., et al., *Anion-induced folding of Staphylococcal nuclease: characterization of multiple equilibrium partially folded intermediates*. J. Mol. Biol., 1998. **278**(4): 879-894.
98. Muzammil, S., Kumar, Y., Tayyab, S., *Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation*. Proteins, 2000. **40**(1): 29-38.
99. Uversky, V.N., et al., *Association of partially-folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability*. Protein Sci., 1999. **8**(1): 161-173.
100. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., *VMD: visual molecular dynamics*. J. Mol. Graph., 1996. **14**(1): 33-38.
101. Sigma-Aldrich, *Albumin from human serum (A3782) - Product Information Sheet*. 2000.
102. Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N., *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*. Mol. Pharmacol., 1975. **11**(6): 824-832.
103. Sjöholm, I., et al., *Binding of drugs to human serum albumin: XI. The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles*. Mol. Pharmacol., 1979. **16**(3): 767-777.

104. Yamasaki, K., et al., *Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996. **1295**(2): 147-157.
105. Carter, D.C., He, X.M., *Structure of human serum albumin*. *Science*, 1990. **249**(4966): 302-303.
106. He, X.M., Carter, D.C., *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*. *Nature*, 1992. **358**(6383): 209-215.
107. Sugio, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. *Protein Eng.*, 1999. **12**(6): 439-446.
108. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Res.*, 2000. **28**(1): 235-242.
109. Ahmad, B., et al., *Guanidine hydrochloride denaturation of human serum albumin originates by local unfolding of some stable loops in domain III*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005. **1750**(1): 93-102.
110. Pace, C.N., *Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves*. *Methods Enzymol.*, 1986. **131**: 266-280.
111. Greene, R.F., Jr., Pace, C.N., *Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin*. *J. Biol. Chem.*, 1974. **249**(17): 5388-5393.
112. Wallevik, K., *Reversible denaturation of human serum albumin by pH, temperature, and guanidine hydrochloride followed by optical rotation*. *J. Biol. Chem.*, 1973. **248**(8): 2650-2655.
113. Ideker, T., et al., *Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network*. *Science*, 2001. **292**(5518): 929-934.
114. Weston, A.D., Hood, L., *Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine*. *J. Proteome Res.*, 2004. **3**(2): 179-196.
115. Vitzthum, F., et al., *Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs*. *J. Proteome Res.*, 2005. **4**(4): 1086-1097.
116. Patterson, S.D., Aebersold, R., *Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins*. *Electrophoresis*, 1995. **16**(10): 1791-1814.
117. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. *Nat. Biotechnol.*, 1999. **17**(10): 994-999.

118. Gygi, S.P., et al., *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000. **97**(17): 9390-9395.
119. Fey, S.J., Larsen, P.M., *2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2001. **5**(1): 26-33.
120. Roman, G.T., et al., *Single-cell manipulation and analysis using microfluidic devices*. Anal. Bioanal. Chem., 2006.
121. Wheeler, A.R., et al., *Microfluidic device for single-cell analysis*. Anal. Chem., 2003. **75**(14): 3581-3586.
122. Ros, A., et al., *Bioanalysis in structured microfluidic systems*. Electrophoresis, 2006. **27**(13): 2651-2658.
123. Abbott, A., *A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis*. Nature, 1999. **402**(6763): 715-720.
124. Macbeath, G., Schreiber, S.L., *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination*. Science, 2000. **289**(5485): 1760-1763.
125. Templin, M.F., et al., *Protein microarray technology*. Trends Biotechnol., 2002. **20**(4): 160-166.
126. Holt, L.J., et al., *The use of recombinant antibodies in proteomics*. Curr. Opin. Biotechnol., 2000. **11**(5): 445-449.
127. De Wildt, R.M., et al., *Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions*. Nat. Biotechnol., 2000. **18**(9): 989-994.
128. Pandey, A., Mann, M., *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): 837-846.
129. Zhu, H., et al., *Global analysis of protein activities using proteome chips*. Science, 2001. **293**(5537): 2101-2105.
130. Hogan, B.L., Yeung, E.S., *Indirect fluorometric detection in gel electrophoresis*. Appl. Spectr., 1989. **43**(2): 349-500.
131. Yamamoto, H., et al., *Ultraviolet imaging densitometry of unstained gels for two-dimensional electrophoresis*. Anal. Biochem., 1990. **191**(1): 58-64.
132. Koutny, L.B., Yeung, E.S., *Expert system for data acquisition to achieve a constant signal-to-noise ratio: application to imaging of DNA sequencing gels*. Anal. Chem., 1993. **65**(2): 148-152.
133. Kazmin, D., et al., *Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination*. Anal. Biochem., 2002. **301**(1): 91-96.

134. Sluszný, C., Yeung, E.S., *One- and two-dimensional miniaturized electrophoresis of proteins with native fluorescence detection*. *Anal. Chem.*, 2004. **76**(5): 1359-1365.
135. Striebel, H.M., et al., *Readout of protein microarrays using intrinsic time resolved UV fluorescence for label-free detection*. *Proteomics*, 2004. **4**(6): 1703-1711.
136. Schulze, P., et al., *Deep UV laser-induced fluorescence detection of unlabeled drugs and proteins in microchip electrophoresis*. *Anal. Chem.*, 2005. **77**(5): 1325-1329.
137. Hellmich, W., et al., *Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology*. *Electrophoresis*, 2005. **26**(19): 3689-3696.
138. Scheffler, S., Sauer, M., Neuweiler, H., *Monitoring antibody binding events in homogeneous solution by single-molecule fluorescence spectroscopy*. *Z. Phys. Chem.*, 2005. **219**(5): 665-678.
139. Neuweiler, H., et al., *Detection of individual p53-autoantibodies by using quenched peptide-based molecular probes*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002. **41**(24): 4769-4773.
140. Neuweiler, H., Scheffler, S., Sauer, M., *Development of a Homogeneous Assay Format for p53 Antibodies Using Fluorescence Correlation Spectroscopy*. *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine III*, Hrsg. M.-A. Mycek. 2005. 99-106.
141. Friguet, B., et al., *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. *J. Immunol. Methods*, 1985. **77**(2): 305-319.
142. Zuker, M., Mathews, D.H., Turner, D.H., *Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology*. NATO ASI Series, Hrsg. J. Barciszewski, B.F.C. Clark. 1999: Kluwer Academic Publishers.
143. Steffen, P., et al., *RNAshapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(4): 500-503.
144. <http://www.arabidopsis.org/>
145. Lund, O., et al., *CPHmodels 2.0: X3M a Computer Program to Extract 3D Models*. Abstract at the CASP5 conference A102. 2002.
146. Varani, G., *Exceptionally stable nucleic acid hairpins*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1995. **24**: 379-404.

147. Uhlenbeck, O.C., *Tetraloops and RNA folding*. Nature, 1990. **346**(6285): 613-614.
148. Ansari, A., Kuznetsov, S.V., *Is hairpin formation in single-stranded polynucleotide diffusion-controlled?* J. Phys. Chem. B, 2005. **109**(26): 12982-12989.
149. Kim, J., et al., *The initial step of DNA hairpin folding: a kinetic analysis using fluorescence correlation spectroscopy*. Nucleic Acids Res., 2006. **34**(9): 2516-2527.
150. Jacobson, H., Stockmayer, W.H., *Intramolecular Reaction in Polycondensations. I. The Theory of Linear Systems*. J. Chem. Phys., 1950. **18**(12): 1600-1606.
151. Szabo, A., Schulten, K., Schulten, Z., *First passage time approach to diffusion controlled reactions*. J. Chem. Phys., 1980. **72**(8): 4350-4357.
152. Flory, P.J., *Principles of polymer chemistry*. George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. 1953, Ithaca: Cornell University Press. 672 S.
153. Wilemski, G., Fixman, M., *Diffusion-controlled intrachain reactions of polymers. II Results for a pair of terminal reactive groups*. J. Chem. Phys., 1974. **60**(3): 878-890.
154. Doi, M., *Diffusion-controlled reaction of polymers*. Chem. Phys., 1975. **9**(3): 455.
155. Moody, M.D., et al., *Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines*. Biotechniques, 2001. **31**(1): 186-190, 192-184.
156. Diehl, F., et al., *Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal*. Nucleic Acids Res., 2001. **29**(7): E38.
157. Yoshikawa, T., et al., *Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. **275**(2): 532-537.
158. Sakai, K., et al., *Microarray hybridization with fractionated cDNA: enhanced identification of differentially expressed genes*. Anal. Biochem., 2000. **287**(1): 32-37.
159. Lagraff, J.R., Chu-Lagraff, Q., *Scanning force microscopy and fluorescence microscopy of microcontact printed antibodies and antibody fragments*. Langmuir, 2006. **22**(10): 4685-4693.
160. Graber, D.J., et al., *Antigen Binding Specificity of Antibodies Patterned by Microcontact Printing*. Langmuir, 2003. **19**(13): 5431-5434.

161. Fisler, R., *Toward Miniaturization of Protein Microarray Substrates*. Am. Biotechnol. Lab., 2004. **22**(1): 23-25.
162. Li, Q., Seeger, S., *Label-free detection of single protein molecules using deep UV fluorescence lifetime microscopy*. Anal. Chem., 2006. **78**(8): 2732-2737.
163. Mateus, C., Avery, S.V., *Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry*. Yeast, 2000. **16**(14): 1313-1323.
164. Carrero, G., et al., *Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins*. Methods, 2003. **29**(1): 14-28.
165. Sauer, M., *Reversible molecular photoswitches: a key technology for nanoscience and fluorescence imaging*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005. **102**(27): 9433-9434.
166. Ando, R., Mizuno, H., Miyawaki, A., *Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting*. Science, 2004. **306**(5700): 1370-1373.
167. Habuchi, S., et al., *Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005. **102**(27): 9511-9516.
168. Wilmann, P.G., et al., *The 1.7 Å crystal structure of dronpa: a photoswitchable green fluorescent protein*. J. Mol. Biol., 2006. **364**(2): 213-224.

## 9 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Schüttpelz, M.**, Müller, C., Neuweiler, H., Sauer, M., *UV Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy: A Label-Free Method for Detection and Quantification of Protein Interactions*. Anal. Chem., 2006. **78**(3): 663-669.

Über diese Veröffentlichung wurde berichtet in:

J. Prot. Res., 2006. **5**(3): 465

Biophotonics Int., 2006. **13**(3): 58-59

Konferenzbeiträge:

Rögner, J., **Schüttpelz, M.**, Sauer, M., Markierungsfreier Nachweis von Proteinwechselwirkungen auf Microarrays durch laser-induzierte UV-Fluoreszenz. DECHEMA Statusseminar Chiptechnologien: Mikroarrays, Hygiene und Gesundheit. Frankfurt am Main, 26.01. - 27.01.2004. (Poster)

**Schüttpelz, M.**, Müller, C., Rögner, J., Sauer, M., Identification of Antigen-Antibody Binding Processes Using Native Laser-induced Fluorescence Lifetime Imaging. Picoquant 10<sup>th</sup> International Workshop on "Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences". Berlin, 22.09. - 24.09.2004. (Poster)

**Schüttpelz, M.**, Peters, E., Müller, C., Staiger, D., Sauer, M., Application of Fluorescence Correlation Spectroscopy to AtGRP7 binding studies. Perspektive\_05: ScienceFair. Bielefeld, 16.06.2005. (Poster)

**Schüttpelz, M.**, Müller, C., Neuweiler, H., Sauer, M., UV fluorescence lifetime imaging microscopy (UV-FLIM): A label-free method for detection and quantification of protein interactions. Ruperto-Carola Symposium 2006: Single Molecule Spectroscopy Meets Chip-Technology. Heidelberg, 18.10. - 20.10.2006. (Vortrag)

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Markus Sauer für die interessante Themenstellung, den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung und seine hervorragende Betreuung,

Dr. Hannes Neuweiler für seine ständige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen und Korrekturlesen dieser Arbeit,

Elisabeth Peters für Arbeiten an den DNA-Oligonukleotiden, Dr. Jiho Kim und Dr. Sören Doose für Messungen der Polythymine sowie Hannes Barsch für die Modellierung des Polythymins,

Dr. Rudolf Böttner, Reinhild Pätzmann, Dr. Gerd Wiebusch und Stephan Wörmer, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen,

Jan C. Schöning und Martina Lummer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dorothee Staiger für die Bereitstellung des Proteins AtGRP7, der *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen und der Nachhilfe in Molekularbiologie,

sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie“ für eine sehr angenehme und konstruktive Zusammenarbeit.

Jeg vil også takke Prof. Dr. Jakob J. Stamnes for at jeg hadde muligheten til å komme til Norge. En takk går til Kjersti Hestenes for hyggelig og godt samarbeid.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer uneingeschränkt unterstützt haben.

Danke, Britta!

---

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Bielefeld, im November 2006

---

Mark Schüttpelz