

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND
PHARMAZIE DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Untersuchung und Aufklärung des molekularen
Mechanismus von Enzymen der SWI2/SNF2-
Familie mit Hilfe der Einzelmolekül-
Fluoreszenzmikroskopie

von

Robert Alexander Lewis

aus

Rosenheim

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Jens Michaelis betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Die vorliegende Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 17. Juni 2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lewis', written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal dotted line.

Robert Lewis

Dissertation eingereicht am 17. Juni 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Michaelis

2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner

Mündliche Prüfung am 06. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund	5
2.1. SWI2/SNF2-Enzyme	5
2.2. Veränderungen an Protein-DNS-Bindungen	9
2.3. Alignment	10
2.4. Rad54	13
2.5. SsoRad54cd / SSO1653	14
2.6. Rad26	15
2.7. CSB / ERCC6	16
2.8. Transkriptionsgekoppelter Reparaturmechanismus	18
2.9. Fluoreszenz	23
2.10. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer FRET	26
2.10.1. Förster-Radius	28
2.10.2. Orientierungsfaktor κ^2	29
2.11. Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie	30
2.11.1. Totale Interne Reflexion	32
2.11.2. Prisma-basiertes TIRF-Mikroskop	34
3. Methodik	37
3.1. Spezifische Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	37
3.1.1. Auswahl der Farbstoffe	38
3.1.2. Direkte Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen	38
3.2. Aktivitätstests	39
3.3. Bestimmung der Bindungsverhältnisse von Proteinen zu DNS	40
4. Experimenteller Aufbau	43
4.1. Übersicht des Aufbaus	43
4.1.1. Anregungsstrahlengang	43
4.2. Meßkammer	47
4.2.1. Strahlengang und kritischer Winkel	47
4.2.2. Probenkammer	48
4.2.3. Reinigung und Beschichtung der Oberfläche	49
4.2.4. Probenpositionierung und Befüllung	51
4.3. Fluoreszenzdetektion	52
4.3.1. Abbildung der Oberfläche	52
4.3.2. Detektionssystem	53
4.4. Anwendungsbereiche des Aufbaus	55
5. Datenauswertung	57
5.1. Theoretischer Hintergrund zur Ensemble-Auswertung	57
5.2. Einfluß der statistischen Markierungsverhältnisse	62
5.3. Berechnung der Extinktionskoeffizienten	63
5.4. Notwendige Korrekturen	64

5.4.1.	Bestimmung der Anregungsintensität.....	64
5.4.2.	Intensitätsabhängige Nichtlinearität der Detektion.....	65
5.4.3.	Einfluß der Monochromatoren.....	67
5.4.4.	Einfluß der Polarisierung.....	67
5.4.5.	Mittelung der Korrekturspektren.....	67
5.5.	Auswertung der Fluoreszenzspektren.....	68
5.5.1.	Bestimmung der FRET-Effizienz.....	69
5.5.2.	Abzug des Crosstalks und der direkten Akzeptoranregung.....	71
5.5.3.	Anwendungsmöglichkeiten der Software.....	72
5.6.	Extraktion der Einzelmolekül-Intensitäts-Zeitspuren.....	72
5.7.	Analyse der Einzelmolekül-Intensitäts-Zeitspuren.....	75
5.7.1.	Bestimmung der FRET-Effizienz.....	75
5.7.2.	Manuelle Auswertung.....	77
5.7.3.	Notwendigkeit und Grundlagen der Vorsortierung der Datensätze.....	79
5.7.4.	Automatisches Auswerteprogramm.....	80
5.7.5.	Überblick und Aussichten der Datenanalyse.....	81
6.	SSO1653.....	83
6.1.	Aufgabenstellung.....	83
6.2.	Expression und zielgerichtete Mutagenese.....	86
6.3.	Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen.....	88
6.4.	Aktivitätstests.....	89
6.5.	Bestimmung einer Bindungskonstante an DNS.....	93
6.5.1.	Übersicht der Bindungsverhältnisse von Protein zu DNS.....	97
6.6.	Ensemble-Messungen.....	98
6.6.1.	FRET-Messungen an Mutante 2X.....	100
6.6.2.	FRET-Kontrollmessungen.....	104
6.6.3.	Einfluß der nativen Cysteine.....	105
6.6.4.	Einfluß der Fluorophore.....	106
6.6.5.	Übersicht der Ensemble-FRET-Messungen.....	108
6.7.	Einzelmolekül-Messungen.....	108
6.7.1.	FRET-Messungen am TIRF-Mikroskop.....	109
6.7.2.	Kinetik der Konformationsänderung.....	113
6.7.3.	Einfluß der Oberflächenanbindung.....	115
6.7.4.	Kontrollmessungen mittels Burst-Analyse.....	117
6.8.	Mechano-chemischer Zyklus.....	121
6.9.	Zusammenfassung und Ausblick.....	123
7.	Rad26.....	125
7.1.	Aufgabenstellung.....	125
7.2.	Elongationskomplex als Modellsystem.....	126
7.2.1.	Anwendung des Modellsystems auf die Verschiebung.....	129
7.3.	Expression von Vollängen- und gekürztem Konstrukt.....	130
7.4.	Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen.....	132
7.5.	Aktivitätstests.....	134
7.5.1.	Aktivität an doppelsträngiger DNS.....	135
7.5.2.	Aktivität an einzelsträngiger DNS.....	136
7.5.3.	Übersicht der Bindungsverhältnisse an DNS.....	137
7.5.4.	Untersuchung auf Prozessivität.....	139
7.5.5.	Aktivität an RNS.....	141
7.6.	Bestimmung einer Bindungskonstante an DNS.....	142
7.7.	Nachweis der Interaktion zwischen Rad26 und Pol II.....	144
7.7.1.	Bestimmung des Bindens über Fluoreszenz-Anisotropie.....	144
7.7.2.	Bestimmung des Bindens über Co-Lokalisation auf Einzelmolekülebene.....	145

7.7.3.	Bestimmung des Bindens über FRET.....	148
7.8.	Mögliches Auflösen des Elongationskomplexes	150
7.8.1.	Nachweise der Auftrennung über Gelelektrophorese und Retardation.....	151
7.8.2.	Nachweise der Auftrennung über Anisotropie.....	153
7.9.	Mögliche Abspaltung von Rpb4/Rpb7	155
7.10.	Einzelmolekül-Messungen.....	157
7.10.1.	Kompatible Distanzen der Ankerpunkte	157
7.10.2.	Rad26 am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17).....	162
7.10.3.	Rad26 und ATP am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17).....	165
7.10.4.	Anpassungen der Konstrukte	166
7.10.5.	Höhere Sensitivität durch veränderte Fluorophor-Ankerpunkte.....	172
7.11.	Zusammenfassender Überblick und Beurteilung der Hypothesen.....	180
7.11.1.	Auflösung des Elongationskomplexes	180
7.11.2.	Degradation durch Ubiquitinierung der Polymerase.....	181
7.11.3.	Überspringen der Schadensstelle	181
7.11.4.	Rückwärtsbewegung entgegen der Transkriptionsrichtung.....	183
7.11.5.	Konformationsänderung des Elongationskomplexes	184
8.	Terrylene-Diimid-Farbstoff	187
8.1.	Aufgabenstellung	187
8.2.	Kopplung von WS-TDI an DNS	188
8.2.1.	Analyse der Kopplung über Gelelektrophorese.....	189
8.2.2.	Analyse der Kopplung über Co-Lokalisation.....	192
8.3.	Zusammenfassung	193
9.	Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse.....	195
9.1.	Aufgabenstellung	196
9.2.	Computergestützte Suche nach Bleichschritten	196
9.2.1.	Bestimmung der Bleichschritte an mehrfach markierter DNS.....	200
9.2.2.	Voraussichtliche Applikationsmöglichkeiten der Software	203
10.	Zusammenfassung und Ausblick.....	205
A.	Methoden und experimentelle Durchführung	209
A.1.	Generelle Verfahrensweisen und übergreifende Bedingungen.....	209
A.2.	Verwendete Puffer.....	211
A.3.	Expression der Proteine	213
A.3.1.	Expression von SSO1653.....	213
A.3.2.	Klonierung und Mutagenese von SSO1653	213
A.3.3.	Expression von Rad26 (Vollängen-Konstrukt).....	214
A.3.4.	Expression von Rad26-R881	214
A.4.	Markierung der Proteine mit Fluoreszenz-Farbstoffen.....	215
A.4.1.	Markierung des SSO1653.....	216
A.4.2.	Markierung und Biotinylierung des SSO1653	217
A.4.3.	Markierung des Rad26.....	217
A.4.4.	Kopplung von Terrylene-Diimid (WS-TDI) an einzelsträngige DNS	217
A.4.5.	Hybridisierung von WS-TDI-DNS mit komplementärem Strang	218
A.5.	Aktivitätstest der Proteine.....	218
A.5.1.	Kalibrierungskurve	218
A.5.2.	Aktivitätstest an SSO1653.....	219
A.5.3.	Aktivitätstest an Rad26	220
A.6.	RNS-Polymerase II Elongationskomplexe	221
A.6.1.	Herstellung mit nicht-komplementärem RNS-DNS-Hybrid.....	221
A.6.2.	Herstellung mit natürlichem RNS-DNS-Hybrid.....	222
A.6.3.	Herstellung mit markiertem Rpb4/Rpb7.....	222

A.6.4.	Transkriptionsreaktion der Elongationskomplexe	222
A.6.5.	Ablösen der RNS-Polymerase vom Elongationskomplex.....	222
A.6.6.	Ablösen der Untereinheit Rbp4/Rpb7 durch Binden des Rad26	223
A.7.	Ensemble-Fluoreszenz-Messungen.....	223
A.7.1.	Generelle Einstellungen am Fluoreszenz-Spektrometer	223
A.8.	Anisotropie-Messungen.....	224
A.8.1.	Aufnahme des G-Faktors.....	224
A.8.2.	Aufnahme der Anisotropie-Spektren	225
A.8.3.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	225
A.8.4.	Interaktionen des Rad26 mit dem Elongationskomplex	227
A.9.	Ensemble-FRET-Messungen am SSO1653.....	228
A.9.1.	Zusammensetzung der Proben.....	228
A.9.2.	Aufnahme der Fluoreszenzspektren.....	229
A.10.	Einzelmolekül-Messungen.....	229
A.10.1.	Reinigung und Beschichtung der Glasplatten.....	229
A.10.2.	Zusammenbau der Flußkammer.....	230
A.10.3.	Befüllung der Flußkammer	231
A.10.4.	Einbau und Positionierung der Flußkammer.....	231
A.10.5.	Probenbeladung der Flußkammer	231
A.10.6.	Aufnahme der Meßvideos.....	232
A.10.7.	Intensität der Anregungsquellen.....	234
A.11.	Burst-Analysis Messungen.....	234
A.11.1.	Zusammensetzung der Proben.....	234
A.11.2.	Aufnahme und Auswertung der Konfokal-Messungen	234
B.	Literaturverzeichnis	209
	Publikationsliste	247
	Danksagung.....	249
	Lebenslauf.....	251

1. Einleitung

Eine der wichtigsten Hypothesen im Zusammenhang mit lebenden Organismen ist das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“ [1]. Formuliert von eben jenem Francis Crick, der maßgeblich an der Aufklärung der drei-dimensionalen Struktur der DNS im Jahre 1953 beteiligt war, beschreibt sie den Informationsfluß in biologischen Systemen. Im Zentrum der These befinden sich drei Arten von Biopolymeren, nämlich die DNS als Speichermedium der Erbinformation sowie die RNS als Bindeglied und Vermittler auf dem Weg der Herstellung der dritten Gattung, den Proteinen.

Im einfachsten Fall findet eine Weitergabe der Information von DNS zu RNS statt. Letztere wiederum kennt im Normalfall nur ein Ziel, nämlich die Informationsübertragung zu einem Protein. Darüber hinaus existieren natürlich noch weitere Möglichkeiten des Informationstransfers, man denke nur an die Verdoppelung der DNS im Zuge der Zellteilung von einer Generation zur nächsten. Aber auch weniger intuitive Wege sind bekannt, wie das Beispiel der Retroviren zeigt, nämlich die umgekehrte Biosynthese von RNS zurück zu DNS. Man muß sich aber nicht alle neun möglichen Übertragungsrichtungen vergegenwärtigen, um zu erkennen, daß eine Störung oder Unterbrechung bereits des ersten klassischen Informationsflusses, also im Rahmen der Transkription von DNS zu RNS, eine alles entscheidende und eine durchaus fatal endende Konsequenz nach sich ziehen kann.

Betrachtet man organisches Leben ist dessen Grundlage, also sein Bauplan in Form der Basensequenz seiner DNS, nur bedingt fehlertolerant gesichert. Grob definiert ist lediglich eine einzige Sicherungskopie vorzufinden, beruhend auf der selbstkomplementären Struktur der DNS. Dies wäre ansatzweise vergleichbar mit einer 1:1 Kopie auf dem Original-Datenträger in der Computertechnologie. Man stellt aber schnell fest, daß eine vollständige Redundanz und damit eine ausreichende Wahrung der Datenintegrität nur dann erreicht werden kann, wenn erstens mehrere Kopien auf mehr als nur einem Speichermedium erstellt werden und zweitens fehlerhafte Komponenten vor einem drohenden Datenverlust repariert oder ersetzt werden. Im Prinzip steht hier die Zelle als Grundbaustein allen Lebens vor einer leichten Entscheidung. Weitere Kopien anzufertigen erfordert in erster Linie ausreichend Platz. Die Natur und die Evolution haben sich ohnehin bereits ausgeklügelte Mechanismen überlegt, die DNS zu komprimieren, zu verpacken und aufzubewahren. Eine zweite Ausfertigung wäre nur unnötiger Ballast und würde das Platzangebot nur verringern. Dagegen liegt es wesentlich näher, beschädigte Strukturelemente auszubessern, zumal das Zelläquivalent eines Systemadministrators nicht wie bei der Datensicherung am

Computer ein externes Element sein muß, sondern aus dem gleichen Informationssatz erstellt werden kann, zu dessen Pflege und Wartung es geschaffen wurde. Zugleich ist dieser Ansatz nicht nur auf ein Reparatursystem limitiert, er kann beliebig viele und verschieden spezialisierte Einheiten enthalten.

Dennoch oder gerade in dieser Schlußfolgerung liegt die Ursache für weitere Schwächen, die den Informationsfluß hemmen können. Unterliegt nämlich das Reparatursystem selbst einem Fehler, ausgelöst durch einen Schaden oder eine Mutation im Genom, so ist es nur noch eingeschränkt einsatzfähig oder gänzlich unbrauchbar. Genau dies tritt bei der Beeinträchtigung des transkriptionsgekoppelten Reparaturmechanismus ein, deren Auswirkung sich beim Menschen im Cockayne-Syndrom manifestieren. Ein Schaden in der DNS, der erst während der Transkriptionsphase zum Tragen kommt, bedarf für dessen korrekte Instandsetzung primär eines bestimmten Proteins, das Cockayne-Syndrom B Protein, welches jedoch selbst aufgrund seines mutierten Gens dazu nicht mehr in der Lage ist.

Interessanterweise gehört das soeben erwähnte Enzym zu einer Kategorie, die nicht ausschließlich an Reparaturprozessen beteiligt ist. In erster Linie umfaßt diese Familie den Multiproteinkomplex SWI-SNF, der im Zusammenhang steht mit der Umstrukturierung chromosomaler DNS. Hierbei muß sichergestellt werden, daß die DNS trotz ihrer enorm kompakten Anordnung weiterhin zugänglich ist, insbesondere für Prozesse wie die Replikation und Transkription. Dazu ist es notwendig, die DNS aus ihrer perlenkettenähnlichen Struktur, dem Chromatin, zu lösen, um so eine zeitweise Umpositionierung der Histone, also der Perlen, zu ermöglichen und so beispielsweise Transkriptionsfaktoren den Zugang zu erleichtern. Somit zeigt sich abermals der Grundsatz des stetigen Informationsstroms.

Selbstverständlich benötigen derlei Vorgänge Energie, die in diesem Fall aus der ATP-Hydrolyse gewonnen wird. Genau hier erschöpft sich aber das Wissen über die Umsetzung der chemischen Energiequelle in eine physikalisch meßbare Größe, nämlich der gerichteten Bewegung. An dieser Stelle liefert ein Teil der vorliegenden Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Klärung des zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Mechanismus.

Wie ist es einem Enzym möglich, entlang einer DNS gezielt seine Position zu verändern?

Konkret wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Hopfner ein Protein untersucht, SsoRad54cd aus *Sulfolobus solfataricus*, dessen Äquivalent in *S. cerevisiae* eine Schlüsselrolle einnimmt in Verbindung mit DNS-Reparatur und homologer Rekombination. Anhand künstlich geschaffener Mutanten sollten verschiedene Konformationen des SsoRad54cd innerhalb eines Bewegungszyklus dargestellt werden, um daraus ein detailliertes Reaktionsschema zu erstellen. Es liegt in der Natur der Sache, daß kristallographische Meßmethoden nicht in der Lage sind, dynamische Prozesse wiederzugeben. Daher mußte eine komplementäre Strategie angewendet werden, die dennoch sensitiv genug ist, um auf Veränderungen zu reagieren, die auf der Subnanometer-Skala stattfinden.

Mit Hilfe von FRET ist es möglich, Abstandsmessungen in dieser Größenordnung durchzuführen. Es wurden also Protokolle entwickelt, um Fluoreszenz-Farbstoffe an das Enzym zu koppeln und daran anschließend mittels Ensemble-Messungen die strukturellen Veränderungen unter physiologischen Bedingungen zu beobachten. Die stochastische Mittelung, der diese Methode unterliegt, ist jedoch ein nicht zu vernachlässigender Nachteil. Selten auftretende Ereignisse können nur schlecht sichtbar gemacht werden, was zum Beispiel eine zeitliche Synchronisation erforderlich macht. Wie sich herausstellen sollte, war dies im erwähnten Fall des SsoRad54cd jedoch unnötig.

Die Ergebnisse bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus des SsoRad54cd, die aus diesen Experimenten hervorgehen sollten, würden allerdings wichtige Informationen liefern für weitergehende Untersuchungen an einem sehr nahen Verwandten, dem Rad26 aus *S. cerevisiae*. Ähnlich dem SsoRad54cd gehört es derselben Subfamilie SNF2 an und verfügt über homologe Struktur motive. Wesentlich größere Übereinstimmung zeigt es jedoch mit einem anderen bereits bekannten Vertreter, dem menschlichen Cockayne-Syndrom B Protein. Im weiteren Teil dieser Arbeit stand es hier weniger im Vordergrund den mechanisch-chemischen Zyklus zu entschlüsseln, da bis dato eine wichtige Variable noch fehlt, nämlich die Kristallstruktur, sondern sich mehr auf den Reparaturprozeß TCR zu fokussieren.

Im speziellen stellt sich hier die Frage nach den Interaktionspunkten mit dem Hauptakteur der Transkription, der RNS-Polymerase II (Pol II). Daß diese regelrecht blockiert wird durch einen Schaden im abzulesenden Strang der DNS ist hinreichend bekannt sowie der gemeinsame Nenner, der sich daraus ergebenden Postulate, nämlich die Beseitigung der Pol II weg vom Schaden.

Wie aber gelingt es dem Rad26, die Pol II beiseite zu räumen? Reicht das Rad26 übertrieben formuliert alleine überhaupt aus oder sind mehrere Proteine im Spiel, gar ein Komplex und darin das Rad26 ein nicht unwichtiges Rädchen im Getriebe?

In Kooperation mit Prof. Hopfner und Prof. Cramer gelang es, Rad26 auf einem idealen in-vitro System anzuwenden, nämlich an einer DNS sowie RNS gebundenen Pol II. Dieser Komplex erwies sich bereits als sensibles Instrument, den noch bis vor kurzem unbekanntem Weg nachzuzeichnen, den die RNS aus der Pol II heraus nimmt[2]. Hierfür wie auch für die Messungen mit Rad26 setzen der Wunsch nach Visualisierung dynamischer Prozesse sowie die auftretenden Abstände im zweistelligen Ångstrom-Bereich die FRET-Methodik voraus. Jedoch war es zwingend notwendig, auf Einzelmolekül-Untersuchungen zurückzugreifen, da deren Informationsgehalt, durch den Wegfall der Mittelung, wie zuvor beschrieben, ungleich höher ausfällt.

In der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie findet sich eine Technik, die genau diesen Ansprüchen genügt und daher zum Einsatz kam. Mit Hilfe eines selbstgebauten und ständig weiterentwickelten Mikroskops, das auf der totalinternen Reflexion beruht, war es möglich, die extrem hohe Empfindlichkeit gepaart mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis

mit einem wesentlich größeren Bildausschnitt zu kombinieren als dies beispielweise die Konfokal-Mikroskopie bietet. Eine Vielzahl an Molekülen konnte so ohne Einbußen bei der zeitlichen Auflösung gleichzeitig detektiert werden.

Aufgrund der flexiblen Bauweise des beschriebenen Fluoreszenz-Mikroskops sind jedoch viele Anwendungsgebiete denkbar. Zum einen wurde es auch eingesetzt zur Untersuchung neuartiger Fluoreszenz-Farbstoffe für die Ankopplung an Biomolekülen wie DNS oder Proteine. Ein kleiner Teil dieser Arbeit wird sich mit diesem Thema auseinandersetzen. Die Möglichkeit einzelne fluoreszente Moleküle zu untersuchen kann aber auch dazu genutzt werden, stöchiometrische Verhältnisse zu bestimmen. Abschließend befaßt sich diese Arbeit mit einer Methode allein aus den Intensitäten der einzelnen Moleküle deren Anzahl zu extrahieren.

Grundsätzlich ist aber auf jeden Fall anzumerken, daß die Etablierung der physikalischen Meßmethoden nur ein Teilgebiet dieser Dissertation sein kann. Ohne biochemische Grundlagen wäre kaum eine Basis vorhanden gewesen, auf der man hätte Ergebnisse erzielen können. Man sieht, die Interdisziplinarität ist heute gefragter denn je, auch oder gerade weil sie die Ursprünge der Lebenswissenschaften ausmacht.

Nachfolgend gibt das Kapitel 2 Einblick in die biochemischen Grundlagen und deren Vorgänge, an denen die untersuchten Proteine teil haben und vermittelt das physikalische Grundwissen für die eingesetzten Methoden. In Kapitel 3 wird dann konkret auf die Methodik eingegangen, wie zum Beispiel technische Grundlagen des eingesetzten Instrumentariums sowie biochemischer Vorgänge, die zum Einsatz kamen. Es folgt eine Beschreibung des experimentellen Aufbaus in Kapitel 4, sowie der angewendeten Datenanalyse in Kapitel 5. Ab hier wird die Arbeit in vier Bereiche aufgeteilt, die sich einzeln mit der Problemstellung zu jedem Thema und den Lösungsansätzen einschließlich der Experimente, die verfolgt wurden, befaßt. Die Ergebnisse, die jeweils daraus resultierten, finden sich dort ebenfalls und werden diskutiert. Nacheinander werden so in Kapitel 6 das SsoRad54cd und in Kapitel 7 das Rad26 besprochen. Darauf folgen in den Kapiteln 8 die Ausführungen zum Farbstoff TDI und in Kapitel 9 die Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse. Eine Zusammenfassung in Kapitel 10 gibt noch einen Ausblick auf Experimente in der nahen Zukunft und schließt die Arbeit ab. In einem gesonderten Appendix A finden sich alle Methoden und Protokolle, die für diese Arbeit verwendet wurden. Das Literaturverzeichnis ist im Appendix Teil A zu finden.

2. Theoretischer Hintergrund

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung eines Reparaturvorgangs im Genom auf molekularer Ebene unter Zuhilfenahme physikalischer Meßmethoden. So wie das Aufgabenfeld aufgeteilt war in einerseits biochemische und andererseits physikalische Techniken, so soll dieser erste Abschnitt, sich nicht nur auf ein Themengebiet versteifend, ebenso den Spagat schaffen, sowohl die biologischen und biochemischen Grundlagen zu erläutern wie auch die Physik zu beleuchten, indem die verwendeten Meßmethoden beschrieben werden. Es werden Teile aus beiden Wissensgebieten Erwähnung finden, so daß im folgenden die Motivation verständlich wird und die Herangehensweise an die Problemstellung rechtfertigt werden kann.

Dazu wird zuerst ein genereller Überblick über die SWI2/SNF2-Enzyme gegeben, mit denen sich diese Arbeit befaßt. Danach erfolgt ein detaillierter Blick auf das SsoRad54cd sowie seinen Eigenschaften und den daraus resultierenden Hypothesen zu seiner Funktionsweise. Anhand einer Gegenüberstellung wird auch gleichzeitig der thematische Übergang auf das Rad26 Protein erfolgen, wobei dessen Einsatzgebiet, nämlich die Protein-Umgestaltung der RNS-Polymerase II, dargestellt wird. Zum besseren Verständnis wird letzteres Enzym kurz umrissen, um dann näher darauf einzugehen, wie DNS-Schäden dessen Funktion stören können. Zuletzt wird auf die Einzelmolekül-Mikroskopie eingegangen und Methoden wie Fluoreszenz bzw. FRET besprochen. Darüber hinaus soll eine kurze Übersicht gegeben werden über Ergebnisse, die in letzter Zeit mit dieser Technik erzielt werden konnten.

2.1. SWI2/SNF2-Enzyme

SWI2/SNF2-Enzyme treten in äußerst vielfältiger Form auf. Der Ausdruck SWI2/SNF2 ist zurück zu führen auf genetische Untersuchungen der Regulation der Transkription in *S. cerevisiae*. Dabei wurden diverse Gene identifiziert, insbesondere SWI1-3 (yeast mating type switching) und SNF2 & 5-6 (sucrose non fermenting). Hefen als Vertreter der Pilze sind fähig ihren Kreuzungstyp (mating type) zu ändern. Dies kann als primitive Urform eines Geschlechts angesehen werden. Hefen sind darüber hinaus fakultativ anaerob, sie können sowohl durch aerobe, oxidative Phosphorylierung Energie gewinnen wie auch

durch anaerobe Fermentierung. Durch eine Mutation im SNF-Gen ist die Hefe jedoch nicht mehr dazu in der Lage, auf Saccharose (sucrose) reichem Medium die Gärung zu betreiben[3]. Interessanterweise stellte sich heraus, daß ein Gen der SWI-Klasse identisch zu sein schien mit einem der SNF-Familie. Damit ergeben sich die Austauschbarkeit der beiden Kürzel SWI2 und SNF2 und somit auch der Grund, warum meist beide zusammen erwähnt werden[4].

Der Verbund wurde im Folgenden als SWI-SNF-Komplex charakterisiert[5], dessen Funktion in Verbindung mit der Chromatinstruktur gebracht wurde. Erstens zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen einwandfreier bzw. eingeschränkter Funktion der SWI/SNF-Gene im Ausmaß der Transkription sowie in Veränderungen der Chromatinstruktur[6]. Die Bindung von GAL4, einem Transkriptions-Aktivator zuständig für das Wachstum von Hefe auf galaktosereichem Medium, steigt um etwa eine Größenordnung nach Zugabe des SWI-SNF-Komplexes in Verbindung mit ATP. Zweitens ist der Komplex in vitro dazu in der Lage, Histon-DNS-Bindungen zu destabilisieren[7]. Dies geschieht, indem die Nukleosomen entlang der DNS verschoben werden. Gleichzeitig wurde eine Zunahme an Interaktionen zwischen freigelegter DNS und Transkriptionsfaktoren wie dem TATA-Box-Bindungs-Protein (TBP) beobachtet[8].

Bei der Suche nach sequenzhomologen Proteinen zu SNF2 fand man eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit DNS- und RNS-Helikasen[9]. Obgleich alle Helikasen Ähnlichkeiten und vergleichbare Motive in der Abfolge ihrer Aminosäuren aufweisen, sind sie doch zu verschieden für eine gemeinsame Gruppierung in eine einzige Familie. Demnach lassen sich die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sowie ihre Homologen in die SNF2-Subfamilie der Superfamilie 2 (SF2) einordnen[10]. Im Laufe der letzten 15 Jahre wurde aber die ursprüngliche Einteilung der Helikasen in drei Superfamilien immer wieder verfeinert[4, 11]. Zuletzt zählte die SNF2-Familie über 1300 Enzyme, wobei Eukaryonten den mehrheitlichen Anteil stellten.

Gemeinsam haben diese Proteine jeweils sieben konservierte Motive, unter anderem das Walker A-Motiv zur Bindung von NTPs, wobei Mutationen in diesen Motiven unweigerlich zur Beeinträchtigung ihrer Funktion führen[12]. Neben ihrer intrinsischen Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse überwiegt jedoch in allen Fällen die DNS-stimulierte ATPase-Aktivität, wenngleich kein bevorzugtes Substrat existiert.

Aus diesen Erkenntnissen resultierte auch die erste Hypothese, daß solche Enzyme die Chromatinstruktur durch Aufwinden der DNS beeinflussen könnten, ähnlich den reinen Helikasen[13]. Dagegen sprach jedoch, daß kein SNF2-Enzym je detektierbare Helikase-Aktivität aufwies. Auch der SWI-SNF-Komplex vermochte hierzu nicht[14], was die Schlußfolgerung aufkommen ließ, daß SNF2-Proteine näher zu den ATPasen verwandt seien, die zwar durch DNS stimuliert werden, aber keine Eigenschaften einer herkömmlichen Helikase aufweisen[15].

vor, beispielsweise in *D. melanogaster* in Form des Proteins ISWI wie auch beim Menschen als CSB oder BRG1, größtenteils aber mit spezialisierten und völlig unterschiedlichen Aufgabenbereichen[18]. Wegen der weitreichenden Verbreitung der SNF2-Enzyme ist natürlich eine Inaktivierung oder eine Störung verbunden mit ernstzunehmenden Konsequenzen. Mutationen im CSB Protein verursachen beim Menschen die Krankheit Cockayne Syndrome B, die einhergeht mit Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung und neurodegenerativen Abnormitäten[19]. Man findet vergleichbare Proteine aber auch in Prokaryonten und Archaeen, wie die Beispiele des RapA[20] und des Mfd zeigen[21]. RapA ist in der Lage, bakterielle RNS-Polymerase in einem noch unbekanntem Schritt, wohl im Anschluß an die Termination, gleichermaßen zu regenerieren, während Mfd, als Pendant des CSB, festgesetzte RNS-Polymerase wieder freilegen kann, was zur Fortsetzung der Elongation führt.

Übergreifend läßt sich feststellen, daß SNF2-Enzyme die Motoreinheit in ihrem jeweils übergeordneten Komplex darstellen. SWI2 im SWI-SNF-Komplex und Sth1 im nahe verwandten RSC-Komplex[22], wie auch ISWI in den NURF-[23], CHRAC-[24] und ACF-Komplexen[25] in *D. melanogaster* zeigen katalytische ATPase-Aktivität. Damit erklärt sich ebenfalls, warum sich die Homologie der SNF2-Subfamilien hauptsächlich auf die ATPase-Domäne beschränkt. Biochemische Untersuchungen verdeutlichen, daß alle SNF2-Enzyme nach einem bestimmten Schema agieren und über einen gemeinsamen ATP getriebenen Vorgang verfügen, der hochkonserviert ist. Eine weitere Spezialisierung ließe sich dann beispielsweise in Form der Kraftübertragung durch die darüber hinaus vorliegenden Domänen und deren relative Lage regulieren.

Die Motoreinheit selbst mag zwar hochkonserviert sein, nicht jedoch die Position an der sie im Enzym auftritt. Außerdem kann es vorkommen, daß die sieben Motive, die die SNF2-Familie ausmachen, durch mehr oder weniger lange Einschübe voneinander getrennt sind. Bisweilen verfügen nur die Mitglieder einer Subfamilie über weitere identische Domänen wie die Brom-Domäne bei der SNF2-Subfamilie oder die SANT-Domäne in der ISWI-Klasse[10]. So läßt sich auch die Austauschbarkeit der ATPase-Domänen zwischen den Subfamilien ohne den Verlust der Fähigkeit zur übergeordneten Komplexbildung erklären, was jedoch auf Kosten der biologischen Aktivität geschieht[26].

Diese Klassifizierung und Spezialisierung erinnert stark an die Einteilung anderer Motorproteine in Familien wie Kinesin und Myosin, was deren Feineinstellung auf ihr Einsatzgebiet widerspiegelt[27, 28]. Auf einem ähnlichen Weg könnte dies bei den SWI2/SNF2-Enzymen der Fall sein.

2.2. Veränderungen an Protein-DNS-Bindungen

Nachfolgend sollen verschiedene Modelle vorgestellt werden, inwiefern die Energie der ATP-Hydrolyse genutzt und umgesetzt wird. Jedes SNF2-Enzym zeigt auf individuelle Art, seine Eigenschaft als molekularer Motor, der darauf ausgelegt ist, unter Verbrauch von ATP, Protein-DNS-Bindungen umzustrukturieren. Multiprotein-Komplexe, deren wesentliche Bestandteile SNF2-Enzyme sind, nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse für Veränderungen an der Chromatinstruktur zum Zwecke der Transkription, der Reparatur oder des Aufbaus des Chromatins[29-31].

Als Beispiel soll die durch den SWI-SNF-Komplex katalysierte Auftrennung der Histon-DNS-Bindung und die daraus resultierende Neuplazierung der Histon-Oktamere dienen, um nur eines unter vielen untersuchten zu nennen[32]. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint noch nicht abschließend geklärt. Elektronenmikroskopische Untersuchung zeigten eine durch den SWI-SNF-Komplex verursachte Schleifenbildung, also die Voraussetzung für eine Verwindung der DNS[33]. Wiederum andere Experimente zeigten die Fähigkeit der SNF2-Enzyme zur Verkrümmung bzw. Verzerrung der DNS über Einführung negativer superhelikaler Verdrehung[34]. Dies liefert zugleich eine Basis, wie diese Enzyme mit Hilfe von Verdrehung und Verwindung der DNS aufgrund ihrer Fortbewegung und damit verbundener Rotation Protein-DNS-Kontakte aufbrechen können. Darüber hinaus könnte dies auch die Grundlage der Chromatin-Umstrukturierung für das Maschen-Modell sein, worauf auch andere Forschungsergebnisse hindeuten[35].

Dessen ungeachtet stellt sich die abschließende Frage nach dem zugrundeliegenden molekularen Mechanismus. Einerseits unterscheiden sich die Vorgehensweisen der SNF2-Enzyme in der Umstrukturierung des Chromatins, beispielsweise erleichtert ISWI den Zugang zur DNS bevorzugt an den Enden der Nukleosomen, während der SWI-SNF-Komplex generell nukleosomale DNS freilegt[36]. Andererseits zeigen selbst Proteine aus den anderen Subfamilien, insbesondere Rad54 und CSB, Aktivität im Umstrukturieren des Chromatins, obwohl sich dies von deren eigentlicher Hauptaufgabe unterscheidet[37, 38].

Ein anderer Ansatzpunkt ist, die SWI2/SNF2-Enzyme als ortsverändernde Proteine zu betrachten, zumal ihnen bisher nie Helikase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Röntgenstrukturanalysen zeigten, daß Helikasen modular aufgebaut sind und eine ATP-hydrolysierende Domäne mit ihren typischen Motiven aufweisen sowie eine zusätzliche Domäne, die entweder zur Destabilisierung des Doppelstrangs oder zur Bindung des Einzelstrangs dient[39]. Letztere wird auch dazu verwendet stromaufwärts liegende DNS aufzuwinden, während sich das Enzym stromabwärts entlang der einzelsträngigen DNS fortbewegt[40, 41].

Überdies ließ sich zeigen, daß sich die Helikase-Aktivität, also das Aufwinden der DNS, von der Einheit abkoppeln läßt, die für die Fortbewegung zuständig ist[42]. Dies führte auch zur Annahme, daß sämtliche Helikasen der Superfamilie 2 zur Translokation entlang des DNS Doppelstrangs fähig seien. Dafür spricht, daß zum Beispiel die ATPase-Aktivität des Rad54 abhängig ist von der Länge seines zur Verfügung gestellten DNS-Substrates[43]. Die Hydrolyse steigt nämlich in Abhängigkeit der eingesetzten DNS-Länge, ausgehend von einem Minimum unterhalb dessen keine Bindung stattfindet bis hin zu einem Maximalwert beim Erreichen der optimalen Länge.

Eine weitreichende Translokation wäre für eine lokale Veränderung der DNS nicht einmal erforderlich, sie ist immer verbunden mit einer Rotation und Verdrehung der DNS, was gezwungenermaßen zu einer Änderung ihrer Topologie führt. Betrachtet man in diesem Zusammenhang das Verhalten von Mfd, dem entfernten Verwandten des CSB, so scheinen diese Erkenntnisse noch weitreichender. Obwohl Mfd eine nur oberflächliche Homologie zu den Helikasen der SF1- und SF2-Familie zeigt und nicht direkt zu den SNF2-Enzymen gehört, so läßt seine Funktion um so mehr Ähnlichkeit vermuten. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß Mfd steckengebliebene bzw. zurückgezogene (backtracked) RNS-Polymerase wieder in die Elongationsphase überführen konnte. Da eine Mindestlänge an DNS stromaufwärts vorhanden sein mußte, kann man davon ausgehen, daß nicht eine direkte Interaktion zwischen RNS-Polymerase und Mfd dafür verantwortlich war, sondern wiederum aktive Translokation der Polymerase[21].

Ein wichtiges Hilfsmittel, um Aussagen über Enzyme zu treffen, ist das gegenseitige Abgleichen der Aminosäuresequenz (Alignment). In den folgenden Kapiteln sollen die verwendeten Proteine SsoRad54cd und Rad26 mit Homologen der SNF2-Familie verglichen werden, insbesondere dem menschlichen CSB und Rad54. Danach erfolgt eine kurze Beschreibung der Herkunft und der Eigenschaften der jeweiligen Proteine.

2.3. Alignment

Sequenzvergleiche sind das Mittel der Wahl, um einerseits die Primärstruktur eines neu zu charakterisierenden Proteins gegen Datenbankbestände abzugleichen und somit evolutionäre Verwandtschaft sog. Homologie zu ermitteln, um daraus Eigenschaften und potentielle Funktionen abzuleiten. In jüngerer Zeit ist es aber auch aufgrund immer leistungsfähigerer Rechner möglich, Suchmethoden und Algorithmen so zu verfeinern, daß vorhandene Katalogisierungen und Klassifizierungen überprüft werden können, um sie gegebenenfalls neu einzuteilen[10]. Ebenso bietet die Sequenzierung des Genoms von mehr und mehr Organismen die Möglichkeit, postulierte Proteine in den Vergleich aufzunehmen und da-

durch eine höhere Informationsdichte zu gewinnen. Dies kann dann zur Identifizierung von weiteren homologen Abschnitten führen, die zuvor noch keine statistische Relevanz zeigten.

Nachfolgend ist ein derartiges Abgleichen für die Proteine SsoRad54cd, sowie seinem unbeschnittenen identischen Analogon, dem ursprünglichen SSO1653 aufgeführt. Als Vergleichsobjekte dienen die beiden Hefeproteine Rad54 und Rad26, das im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde, neben dem humanen CSB.

Folgende Abbildung (Abb. 3) zeigt die gesamten Sequenzen in voller Länge, also nicht nur den katalytisch wirksamen Ausschnitt, der die höchste Konservierung zeigt, sondern auch die Bestandteile, die für die Spezialisierung verantwortlich gemacht werden. Die Sequenzen wurden mittels der Bioinformatik-Programme MUSCLE und MAFFT einander angeglichen und anschließend mit JALVIEW dargestellt. Bei der Angleichung entstehen naturgemäß Lücken, da zum einen die Proteine nicht die gleiche Anzahl an Aminosäuren besitzen und zum anderen Einschübe aufweisen können. Die sieben konservierten Sequenzmotive der Helikasen sind rot hinterlegt und der Reihenfolge nach nummeriert (römisch I bis VI und Ia), während alle übrigen homologen Bereiche in blau schattiert sind. Kommt eine Aminosäure in allen vier unterschiedlichen Proteinen übereinstimmend vor, so erscheint ein dunkelblauer Kasten. Je mehr dieser Kasten aufhellt, desto weniger konserviert ist diese Aminosäure bis hin zum weißen Hintergrund. Sehr gut zu erkennen ist dies an den ersten und letzten 500 Indizes, da dort keinerlei Konservierung vorzufinden ist. Im Gegensatz dazu ist der katalytische Bereich dazwischen geprägt von sehr hoher Homologie mit den funktionellen Motiven.

Das erste Motiv I, auch Walker A genannt, ist zuständig für die Bindung des ATP sowie für die Stabilisierung des ATP-Mg²⁺-Übergangszustands während der Hydrolyse, während das Motiv Ia einen Strang der DNS bindet. Motiv II oder auch Walker B ist ebenfalls wichtig für die ATP-Hydrolyse, da es Mg²⁺ binden soll. Außerdem gibt die vorherrschende Aminosäuresequenz DEAD den Namen für eine wichtige Gruppierung unter den Helikasen. Motiv III unterscheidet sich deutlich von den allgemeinen Helikasen, da hier im Normalfall die Doppelhelix der DNS aufgetrennt wird, indem die gewonnene Energie aus der Hydrolyse auf die Struktur umgesetzt wird, was aber nicht für die SNF2-Enzyme gelten kann. Genau so existieren auch für Motiv IV zwei voneinander verschiedene Funktionen, nämlich Nukleotid-Bindung in SF1- und DNS-Bindung in SF2-Helikasen. Das Motiv V mag mehrere Aufgaben ausführen, darunter Einzelstrang-DNS-Bindung und möglicherweise auch ATP-Hydrolyse. Konformationsänderungen sind Aufgabe des Motivs VI, das als Vermittler zwischen der DNS-Bindung und der ATP-Hydrolyse wirkt. Da bisher nur allgemein auf die Eigenschaften der verwendeten Proteine und ihrer Homologen eingegangen wurde, sollen im Anschluß die einzelnen Exemplare näher vorgestellt werden.

2.3. Alignment

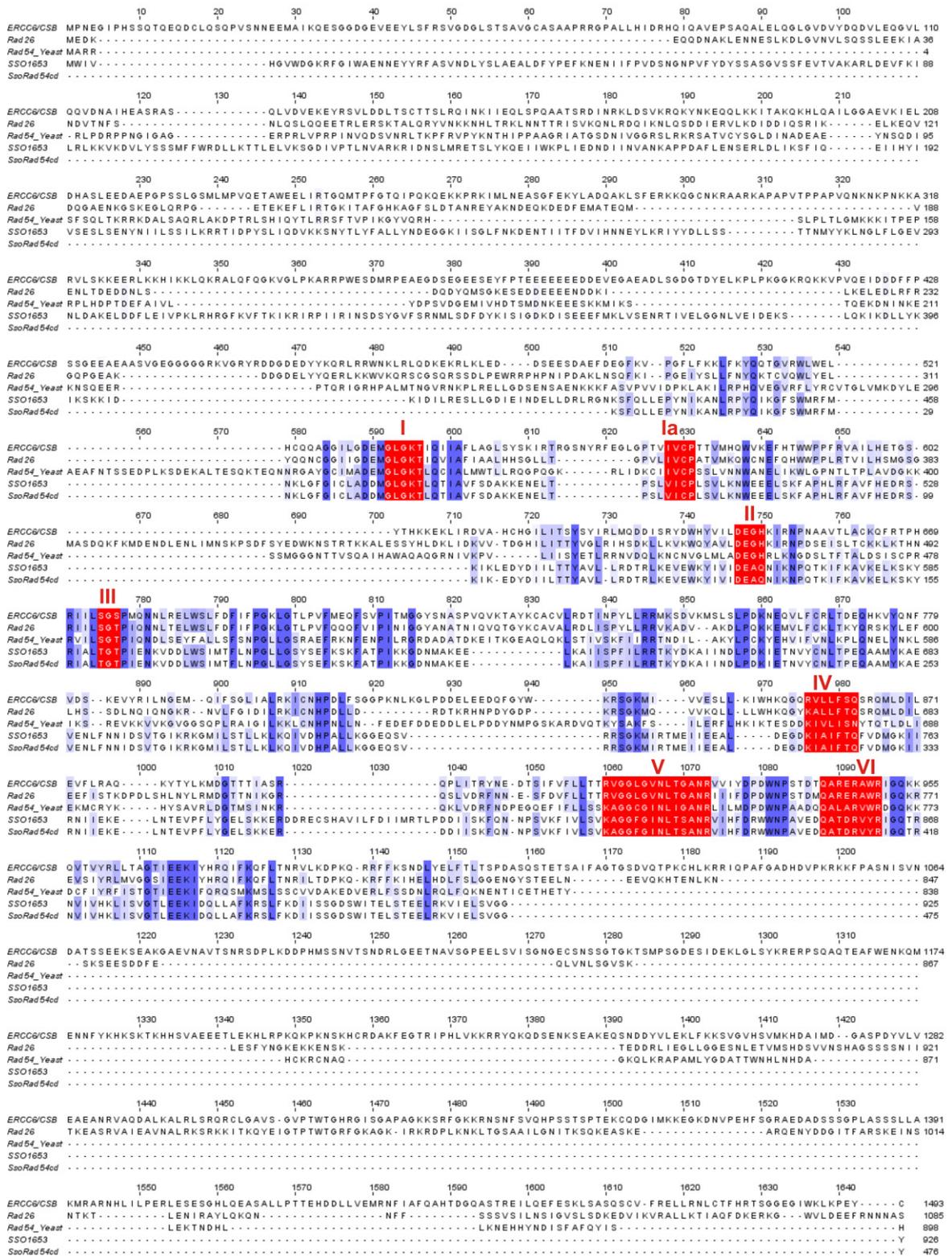


Abb. 3: Sequenzanalyse und -abgleich der Proteine SsoRad54cd und Rad26.
 Als Vergleichsobjekte dienen homologe Enzyme aus dem Mensch (CSB) bzw. aus der Hefe (Rad54). Die sieben hochkonservierten Motive der Helikasen sind rot markiert. Alle anderen Sequenzbereiche sind blau eingefärbt. (Höhere Konservierung = dunklerer Blauton).

2.4. Rad54

Das Rad54-Gen gehört zur Rad52-Epistasis-Gruppe um die Proteine Rad50 bis Rad59 und wurde ursprünglich durch genetische Analysen an Mutanten von *S. cerevisiae* entdeckt, die eine Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen[44]. Alle Enzyme dieser miteinander interagierenden Gruppe sind an der Reparatur von Brüchen im Doppelstrang beteiligt[45]. Das Protein ist etwa 102 kDa schwer und verfügt über 898 Aminosäuren. Interessanterweise existiert in der Hefe das eigene Homolog Rdh54/Tid1, welches ebenfalls durch genetisches Screening identifiziert wurde[46, 47]. Das menschliche Homolog hRad54 zeigt dagegen nur begrenzte Übereinstimmung von etwa 48 %[48], wobei auch hier ein zweites Homolog Rad54B existiert, welches wiederum größere Ähnlichkeit mit Rdh54/Tid1 zeigt[49]. Wie alle SWI2/SNF2-Enzyme zeigt auch Rad54 eine durch doppelsträngige DNS stimulierte ATPase-Aktivität, die aber nicht zur Separation des Doppelstrangs analog zu Helikasen genutzt wird[50-52]. Statt dessen ist es in der Lage, die Topologie der DNS über Einführung von Supercoils zu beeinflussen[50]. Dabei werden sowohl eine negative wie eine positive Verdrehung der DNS durchgeführt, was die Schlußfolgerung nahelegt, daß sich das Rad54 entlang der DNS fortbewegt[52]. In diesem Zusammenhang wurde auch beobachtet, daß Rad54 zur Oligomerisierung neigt[50].

Daß die Energie aus der ATP-Hydrolyse in eine Translokation entlang der DNS umgesetzt würde, postulierten auch Messungen mittels Kraftmikroskopie[53]. Eine direkte Visualisierung dieser Fortbewegung gelang letztendlich über Markierung des Rad54[54] sowie seines Homologs Rdh54/Tid1[55] mit Fluoreszenzfarbstoffen. Dafür spricht auch die Fähigkeit, Komplexe entlang der DNS entfernen zu können, wie biochemische Versuche zeigten, bei dem ein Konstrukt aus drei DNS-Strängen durch Rad54 geteilt wurde[43, 55]. Dieser Test wies bereits die Bewegung des Restriktionsenzym *EcoR124I* nach[56]. Daneben existiert auch eine Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Substratlänge[43].

Im Hinblick auf die homologe Rekombination, die durch fehlendes oder beeinträchtigt Rad54 stark eingeschränkt wird, könnte diese Translokation die Suche nach der homologen bzw. komplementären Basensequenz während des Stadiums der Synapse erklären[57]. Durch die gleichzeitige Interaktion mit Rad51 und daran gebundener einzelsträngiger DNS könnten zuerst beide DNS-Stränge in räumliche Nähe zueinander gebracht werden[58-60]. Diese Nukleoprotein-Filamente stimulieren währenddessen sowohl die Aktivität der ATP-Hydrolyse wie auch das Einführen der Supercoils[52].

Anstelle einer Translokation ohne Vorzugsrichtung könnte aber möglicherweise bereits die Einführung der Supercoils ausreichen, um die doppelsträngige DNS aufzutrennen und für homologe Rekombination mit einem komplementären Strang zugänglich zu machen, wobei die Wahrscheinlichkeit zur Molekülformation steigen würde. Rad51 alleine ist nicht

zur Bildung dieser Intermediate, der sogenannten D-Loops im Stande[52]. Untersuchungen zeigten aber auch stabilisierende Wirkung des Rad54 auf Rad51 in der prä-synaptischen Phase[61], die als einzige Funktion nicht der ATP-Hydrolyse bedarf. In der post-synaptischen Phase könnte die Translokase-Funktion greifen, um den gesamten Protein-Komplex wieder von der DNS abzulösen[57]. Darüber hinaus ist auch eine Aktivität im Rahmen der Chromatin-Umstrukturierung bekannt. Das Rad54 verschafft dabei zwar einen Zugang zur chromosomalen DNS, kann aber im Gegensatz zum SWI-SNF-Komplex keine weitreichende Neupositionierung der Nukleosomen entlang der DNS bewirken[43]. Andere Messungen zeigten jedoch im Widerspruch dazu Verschiebungen der Nukleosomen bis über die Enden der DNS-Stränge hinaus[37]. Im Allgemeinen wird jedoch die homologe Paarung zu D-Loops durch den Einsatz des Chromatins stimuliert[62].

2.5. SsoRad54cd / SSO1653

SWI2/SNF2-Enzyme sind in allen Organismen beheimatet, so auch in Prokaryonten und Archaeen wie *Sulfolobus solfataricus*. Bei der Voraussage für potentielle homologe Proteine zu Eukaryonten stellten sich zwei durch ein Interposon getrennte Gene (SSO1653 / SSO1655) heraus, die zusammen für ein homologes Protein zu Rad54 aus Hefe codieren sollten[63]. Es wurde somit in Verbindung gebracht mit den zu Rad54 ähnlichen Proteinen, daher stammt auch seine Bezeichnung SsoRad54cd. Dies wurde auch untermauert durch die sieben signifikanten Motive für Helikasen und die ähnliche Position der konservierten ATPase-Domäne am C-Terminus. Aus der vorangegangenen Sequenzanalyse erkennt man jedoch, daß auch andere Enzyme als Referenzen in Frage kommen können.

Mittlerweile scheint es so, als ob dieses Protein ebenfalls Begründer seiner eigenen Subfamilie ist. Daher erfolgte auch eine Neueinordnung in die SSO1653-Familie zusammen mit Rad26. Dort finden sich auch das CSB und das Mot1 wieder, die beide nicht nur mit Nukleosomen interagieren, sondern eigene Bindungspartner aufweisen[10]. Das Rad54 selbst hingegen ist ein Schlüsselbaustein im Zusammenhang mit homologer Rekombination, wo es im Verbund mit Rad51 auftritt und homologe DNS-Basenpaarung stimuliert[50, 52]. Darüber hinaus ist über die Bedeutung des SsoRad54cd nicht sehr viel bekannt, weder ob es doch wie Rad54 an der homologen Rekombination oder ähnlich den anderen SSO1653-Enzymen an anderweitigen Umstrukturierungen von Protein-DNS-Bindungen beteiligt ist.

Eines ist jedoch sicher: *Sulfolobus solfataricus* als Angehöriger der Crenarchaeoten verfügt nicht über eukaryontenähnliche Histon-Proteine, daher scheidet die Chromatin-Umstrukturierung als Funktionsweise für SSO1653 aus.

Für die nähere Charakterisierung des Proteins wurde eigens nur der katalytisch wirksame Kern der ATPase exprimiert (Aminosäuren 430-906, MG 57.995 Da, catalytic domain). Biochemische Untersuchungen wiesen die typischen Eigenschaften der SNF2-Familie nach und bestätigten die Tauglichkeit als Studienobjekt des molekularen Mechanismus der SWI2/SNF2-Enzyme[63].

2.6. Rad26

Rad26 stammt aus *S. cerevisiae* und ist eine durch DNS stimulierte ATPase, die der SNF2-Subfamilie angehört[64]. Sein Molekulargewicht beträgt etwa 125 kDa, es ist also mehr als doppelt so schwer wie das SsoRad54cd und etwa 25 % schwerer als das ungeschnittene SSO1653.

Hefezellen mit deaktiviertem Rad26 zeigten keine erhöhte UV-Sensitivität und damit keinen eindeutigen Phänotyp, wie dies bei menschlichen Zellen der Fall ist[65]. Der Globale-Genom-Reparaturweg (GGR) scheint, in Hefe wesentlich effizienter zu arbeiten und den Defekt des transkriptionsgekoppelten Reparaturwegs (TCR) ausgleichen zu können[66]. Weitere Experimente zeigten, daß Rad26 am TCR-Reparaturvorgang beteiligt ist, da fehlendes Rad26 keine Auswirkungen hatte auf die Geschwindigkeit der Reparatur des nicht-transkribierten Strangs, wohl aber auf die Zeit bis zur Behebung des Schadens im transkribierten Strang[67]. Sofern UV induzierte DNS-Schäden auftreten, greift Rad26 als Elongationsfaktor in die Transkription ein, ähnlich wie das CSB[68]. Eine Interaktion zwischen RNS-Polymerase II und Rad26 könnte durch Rbp4, einer Untereinheit der Polymerase, ermöglicht werden und zu strukturellen Veränderungen an der Grenzfläche zwischen Polymerase und DNS führen[69].

Dies wird auch getragen von Ergebnissen, die eine Antikorrelation zwischen TFIIH und Rad26 sehen[70]. Erst die Dissoziation des TFIIH und der Übergang vom Initiationskomplex in die Elongationsphase, ließe Raum und Nutzen für ein Binden des Rad26. Bis dahin, also während der Initiationsphase innerhalb der ersten 50 Nukleotide, wird eine schnelle Reparatur durch das holo-TFIIH gewährleistet, erst danach dient Rad26 entweder möglicherweise der Umstrukturierung der Nahtstelle zwischen RNS-Polymerase und DNS oder der erneuten Rekrutierung des Kern-TFIIH in Form des Repairosoms. Diese Hypothese scheint sich auch in der zeitlichen Abfolge zu decken mit Experimenten, die den Einsatz des Rad26 erst ab der Phase der prozessiven Elongation sehen[71]. Das Rad26 ist also, je nach Position des Schadens und ob ein Gen stark oder schwach transkribiert wird, nicht zwingend im TCR-Mechanismus notwendig[72]. Fernerhin scheint der NER-Reparaturweg Vorrang vor der Transkription zu besitzen, da das Kern-TFIIH hierauf hemmend wirkt, aber

nur dann, wenn zeitgleich Rad26 vorhanden ist[73]. Solange die Reparatur im Gange ist, würde so sicher gestellt werden, daß nicht ständig neue RNS-Polymerase initiiert würde.

Liegen anderweitige Schäden vor, wie beispielsweise Alkylierungen oder Lücken, dann kann Rad26 sogar außerhalb der bekannten Reparaturwege eingreifen und die Transkription positiv beeinflussen, indem die Elongation stimuliert wird[74, 75]. Weitere Unterstützung finden diese Resultate in der Tatsache, daß RNS-Polymerase in *E. coli* bestimmte DNS-Schäden effizient überspringen kann, ohne den TCR-Mechanismus einschalten zu müssen[76, 77].

Außerdem wird darüber berichtet, daß Rad26 einen Komplex mit Def1 bildet, worauf ein alternativer Reparaturweg gestartet wird, der jedoch zur irreversiblen Ubiquitinierung mit anschließender Proteolyse der RNS-Polymerase II führt[78]. Dies wäre jedoch nur dann der Fall, wenn wegen eines nicht zu behebenden Schadens Rad26 als Elongationsfaktor versagen sollte. Solange fungiert Rad26 als Inhibitor der Proteolyse bis es selbst durch Def1 aufgehoben wird.

Generell scheint es Anzeichen zu geben, daß auf zellulärer Ebene Rad26 nicht alleine agiert, sondern einen Partner benötigt, der ebenfalls Mutationen unterliegen kann[79]. Anders läßt sich die Abhängigkeit, daß nur einige Stränge der Hefe von defektem Rad26 betroffen sind und andere weniger oder nicht, kaum erklären. Daß der TCR-Mechanismus durch fehlendes Rad26 nicht vollständig deaktiviert wird, zeigt die Verflechtung mit anderen Proteinen die für NER essentiell sind, wie Rad9, Rad24 oder Rad16[80, 81].

Für ein besseres Verständnis dieser Vorgänge und der Beschreibung des Mechanismus auf molekularer Ebene bedarf es eines *in vitro* Systems zur Untersuchung der Interaktion von Rad26 mit RNS-Polymerase. Hierzu liefert die vorliegende Arbeit grundlegende Erkenntnisse.

2.7. CSB / ERCC6

CSB (Cockayne Syndrome B) bzw. ERCC6 (Excision Repair Cross Complementing) ist das homologe Protein zu Rad26 im Menschen. Es gehört daher ebenfalls der SNF2-Subfamilie an und besitzt DNS stimulierte ATPase-Aktivität, ist aber ebenso keine klassische Helikase[82]. Sein Molekulargewicht von 168 kDa ist vergleichsweise groß[83]. Es ist zur Bindung an DNS fähig, wie Experimente zeigten, die die Bildung negativer Supercoils ähnlich dem Rad54 nachwiesen[38]. Zwei CSB-Proteine binden dazu ATP und wickeln gemeinsam als Dimer die DNS um sich herum auf, wie auch Experimente mit einem Rasterkraft-Mikroskop zeigten[84, 85]. ATP-Hydrolyse führt dann wiederum zu einem Abwickeln der DNS, wodurch die Konformation der DNS aktiv beeinflusst werden kann.

Dies mag zugleich den Mechanismus erklären, warum CSB in der Lage ist, Nukleosomen neu zu arrangieren und wie die SWI-SNF- und ISWI-Komplexe das Chromatin umzustrukturieren[38]. Dabei bedient es sich aber nicht nur der DNS-Bindung, es kann auch direkt mit den Histonen interagieren. Somit ist CSB ein wichtiger Bestandteil für eine funktionierende Genexpression[86]. In vivo Experimente zeigten eine deutlich verminderte Transkription bei fehlendem CSB[87, 88], was durch seine Funktion als Regulator für die Initiation der Transkription erklärt werden könnte[89]. Es stellte sich heraus, daß sogar unbeschädigte DNS nicht transkribiert wird, sofern die Wirkung des CSB ausbleibt.

Eigentlichen Einsatz findet CSB jedoch während des transkriptionsgekoppelten Reparaturmechanismus in der Stimulation der Elongation, für den Fall, daß die RNS-Polymerase II an einem Schaden zum Stillstand gekommen sein sollte[90]. CSB verhindert die Degradation der RNS durch TFIIS und bewirkt den Einbau eines zusätzlichen Nukleotids in die RNS durch Translokation der RNS-Polymerase II. Zu Gute kommt ihm dabei die Interaktion mit RNS-Polymerase II[91, 92]. Das prokaryontische Mfd scheint in dieser Hinsicht sehr ähnlich, jedoch ist es CSB nicht wie Mfd möglich, RNS-Polymerase II von DNS abzulösen oder freizusetzen[83]. Bei Schäden, die nicht ohne weiteres zeitnah repariert werden können, wie cis-platin, bleibt als letztes Mittel der Wahl nur die Ubiquitinierung der Polymerase. Auch hier scheint CSB involviert zu sein[17].

CSB ist aber auch wie Rad26 an Reparaturwegen abseits des TCR-Mechanismus beteiligt, wie man anhand der Behebung oxidativer Schäden wie 8-Oxoguanin über den BER-Weg sehen kann[93-96]. Hierzu wird die Expression der zugehörigen Reparatur-Glycosylasen gezielt heruntergefahren (Downregulation). Theoretisch wäre es vorstellbar, daß derartige Schäden auch den TCR-Weg durchlaufen. Jedoch existieren hierzu widersprüchliche Ergebnisse, da 8-Oxoguanin im Prinzip zu einer Gruppe von DNS-Schäden zählt, die von der RNS-Polymerase II übersprungen werden können. Hingegen werden auch andere Proteine aus dem BER-Reparaturweg wie PARP1, ein molekularer Scanner für Brüche des Rückgrats, mit CSB in Verbindung gebracht[97]. Daneben ist CSB auch an der Reparatur mitochondrialer DNS beteiligt, obwohl es nicht in Mitochondrien vorkommt[98].

Einen Überblick über interagierende Proteine findet sich in der Literatur[19], wobei besonders TFIIH als Partner hervorzuheben ist, vermutlich mit einer zum Rad26 analogen Funktion[83, 92, 99, 100]. CSB zeigt auch hohe Affinität zu den Reparaturenzymen XPA und XPG, was deren Rekrutierung an die Schadensstelle bedeutend erleichtern könnte[83, 101]. Darüber hinaus kann CSB auch RNS-Polymerase I aktivieren, indem es daran bindet, was nur die fundamentale Rolle des CSB in der Transkription bestätigt[102]. CSB selbst scheint auch regulierbar zu sein, indem seine Serine und Threonine phosphoryliert werden[103]. Davon abgesehen scheint CSB auch im BER-Reparaturprozeß als Co-Aktivator tätig zu sein[97]. Ohne ATP-Verbrauch kann CSB zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen nach Streßinduktion stimulieren.

Obwohl CSB und Rad26 eindeutig homolog zueinander sind, konnten nicht sämtliche Funktionen analog nachgewiesen werden. Dennoch sollten die Erkenntnisse, die über die jeweiligen Proteine gewonnen wurden, zusammenhängend betrachtet werden.

2.8. Transkriptionsgekoppelter Reparaturmechanismus

Es steht außer Frage, daß die strukturelle Integrität der DNS und damit ihre unbeeinträchtigte Replikation und Transkription eine unabdingbare Voraussetzung ist für alles Leben. Dabei werden diese Vorgänge jederzeit durch Veränderungen in der Struktur der DNS bedroht, sei es durch exogene Einflüsse wie Strahlung oder chemische Stoffe oder sei es durch endogene Quellen wie Radikale oder intrinsische Replikationsfehler. Aus gutem Grund bildete sich daher im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Mechanismen zur Beseitigung dieser möglichen Schwachstellen. Ohne sie wären unzählige Mutationen und somit der sichere Zelltod vorprogrammiert.

Diese Arbeit fokussiert sich auf den transkriptionsgekoppelten Reparaturmechanismus, einem nicht unwichtigen Reparaturweg, der jedoch von zahlreichen weiteren ergänzt wird. Selbst nur einen Überblick über die verschiedenen und vielfältigen Bereiche anderer Mechanismen zu geben, übersteigt die Grenzen dieser Arbeit um ein Vielfaches. An dieser Stelle sei verwiesen auf verschiedene Übersichtsartikel der letzten Jahre zu diesem Thema[104-107].

Hauptgrund für die Existenz des transkriptionsgekoppelten Reparaturmechanismus mag der folgende sein. Obwohl zahlreiche DNS-Polymerasen bekannt sind, die zur schadensüberspringenden Synthese fähig sind, wurden bis heute keine RNS-Polymerasen entdeckt, die nicht von einem Schaden arretiert werden[108]. Der TCR-Weg konnte außer bei den Archaeen übergreifend in den meisten Bakterien und Eukaryonten phylogenetisch nachgewiesen und erstmals durch die Gruppe um *Hanawalt* auch experimentell gezeigt werden[109-111]. Dabei stellte sich heraus, daß die Reparatur aktiv transkribierter Gene wesentlich schneller ablief im Vergleich zu anderen nicht-transkribierten Regionen im Genom. Weiterhin fand man heraus, daß ausschließlich der transkribierte Strang des betroffenen Gens mit einer höheren Geschwindigkeit repariert wird, was wiederum heißt, daß nicht allein die bessere Erreichbarkeit entscheidend ist. Obwohl dieser Prozeß in Bakterien außerordentlich gut verstanden ist[112], kennt man zwar die beteiligten Enzyme und ihre Wirkung bei Eukaryonten, nicht aber deren zeitlichen Ablauf und ihre exakte Funktion.

Als Überblick über den gesamten Reparaturvorgang soll die folgende Abbildung (Abb. 4) dienen.

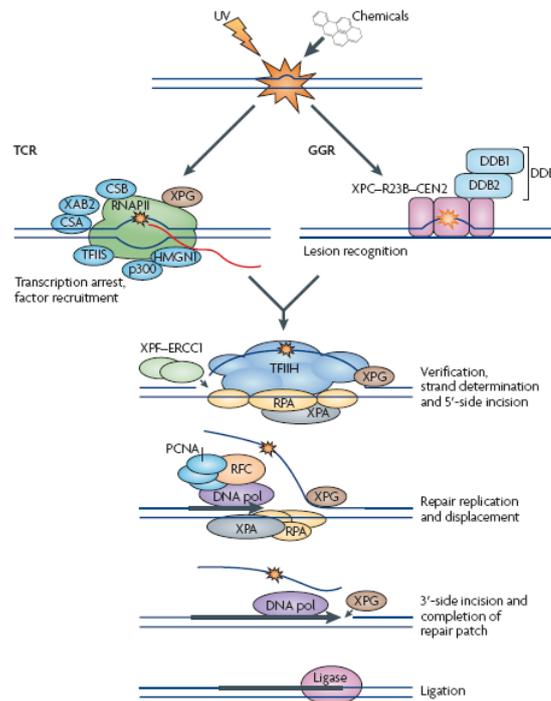


Abb. 4: Überblick über die Nukleotid-Entfernungs-Reparatur (NER) (Hanawalt et al. [108]). Der TCR-Weg ist komplementär zum GGR-Weg und dient zur Erkennung des Schadens auf dem transkribierten Strang (2. Reihe). Nach der Erkennung durch die RNS-Polymerase II (RNAPII) und ihrer notwendigen Beseitigung münden beide Wege zu einem gemeinsamen Reparaturpfad. Der in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Aspekt ist das Vorgehen des Enzyms Rad26 bei TCR.

Ab hier wird es sehr spekulativ, eines ist aber sicher. Die RNS-Polymerase II stellt ein schwerwiegendes und hauptsächlich nichtüberwindbares Hindernis dar für alle Reparaturenzyme, die den Schaden beheben könnten[113]. Daher scheint es nur logisch, daß die Freilegung der Schadensstelle oberste Priorität hat.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den Aspekt der Interaktion von Rad26 zur Beseitigung der RNS-Polymerase II, weshalb im folgenden die unterschiedlichen Hypothesen seitens der Wissenschaftsgemeinde vorgestellt werden.

Es existieren mindestens fünf Ansätze, welche Schritte zur Freilegung der Schadensstelle als nächstes eingeleitet werden[108, 114, 115]. Aufgrund des in Bakterien gefundenen Faktors TCRF bzw. Mfd[116], der dort im nächsten Schritt eingreift und sogar rückwärtsverschobene RNS Polymerase in Elongationsrichtung bewegt[21], wurde nach ähnlich arbeitenden Proteinen in Eukaryonten gesucht und in Form von Rad26 bei Hefe[64, 65] bzw. CSB / ERCC6 beim Menschen[83] gefunden. Bei fehlendem CSB bzw. Rad26 ist die Reparaturdauer am transkribierten Strang in der Tat höher, was dafür spricht, daß beide Proteine die Elongation verbessern[67]. Jedoch sind Mfd und CSB bzw. Rad26 nicht verwandt, das Mfd gehört nicht einmal der Familie der SNF2-Enzyme an, sondern wird zu den

RecG-Helikasen gezählt[10, 21]. Daher ist es nicht verwunderlich, daß bisher nicht derselbe Effekt des CSB nachgewiesen werden konnte.

Es existieren soweit nur Modelle (Abb. 5), wobei zur Vereinfachung der Vorstellung das Rad26 bzw. das CSB im folgenden als gleichwertig angesehen werden[115]. Zusammengefaßt ist CSB also verantwortlich für die Stimulation der Elongation, wenn die RNS-Polymerase II an einem Schaden in der DNS steckengeblieben sein sollte.

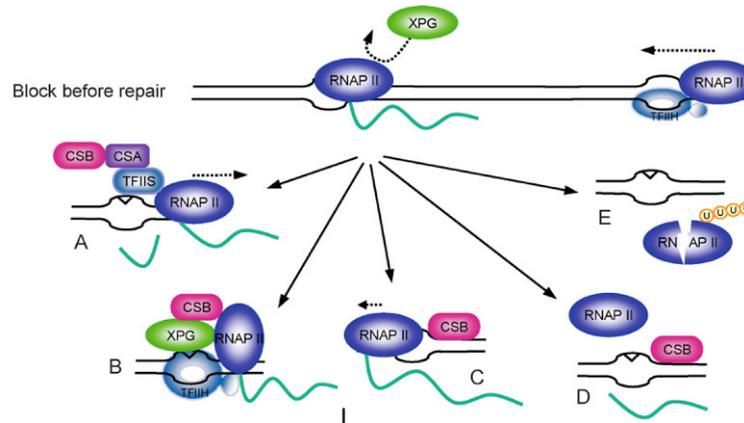


Abb. 5: Übersicht über 5 postulierte Mechanismen zur Beseitigung der RNS-Polymerase II (RNAP II) bei TCR (Nospikel[115]).

Während der Elongationsphase blockiert ein Schaden in der DNS die Transkription. (A) Unter Rekrutierung von CSA und TFIIIS führt CSB zu einer Rückwärtsbewegung der Polymerase und Kürzung der m-RNS. (B) CSB und XPG binden gemeinsam zur Rekrutierung von TFIIH und zur Umstrukturierung des Elongationskomplexes. Möglicherweise ist CSB dazu auch alleine fähig. (C) CSB stimuliert die Elongation und das Überspringen der Schadensstelle. (D) CSB führt zur Ablösung der Polymerase ohne oder mit anschließender Ubiquitinierung (E).

▪ **Rückwärtsbewegung der Polymerase**

Die Idee, daß Rad26 eine Rückwärtsbewegung der Polymerase induziert, beruht größtenteils auf Untersuchungen an TFIIIS, das unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, die Polymerase soweit von der Schadensstelle wegzubewegen, daß Reparaturenzyme ungehindert binden können. Gleichzeitig sah man auch um bis zu 25 Basen verkürzte m-RNS-Stücke, woraus man folgerte, daß die RNS-Polymerase um diese Distanz verschoben worden sein mußte[113]. Im ersten Modell (Abb. 5A) trägt CSB zur Rekrutierung von CSA bei, das seinerseits die Bindung von TFIIIS stimuliert[117]. Die Polymerase wird durch TFIIIS rückwärtsverschoben, worauf das Transkript gekürzt wird[113].

Es stellte sich aber auch heraus, das TFIIIS überhaupt nicht am transkriptionsgekoppelten Mechanismus beteiligt ist[118] und sogar durch CSB inhibiert wird[90, 119]. Also wäre nichts naheliegender, als daß das CSB selbst für die Verschiebung der Polymerase zuständig ist. Wie im Abschnitt 2.1 dieser Arbeit bereits angesprochen existieren Helikasen, die ihre ATPase-Aktivität nicht zum Aufwinden der DNS benutzen, sondern um sich entlang der DNS fortzubewegen und dabei sogar Proteinkomplexe verschieben können[120-122].

Dazu muß gesagt werden, daß dies weder bei Rad26 noch bei CSB jemals nachgewiesen werden konnte. Vorteilhaft wäre die Methode zweifelsohne, da bereits transkribierte m-RNS nicht verloren ginge, sondern die Transkription nahtlos fortgesetzt werden könnte, was insbesondere bei sehr langen eukaryontischen Genen eine Zeitersparnis bedeuten würde[108].

▪ **Umstrukturierung der Polymerase**

Eine viel diskutierte Hypothese beinhaltet die Umstrukturierung des Elongationskomplexes insbesondere an der Grenzfläche zwischen RNS-Polymerase II und dem RNS-DNS-Hybrid (Abb. 5B). Konkret könnten dazu zwei Mechanismen angewendet werden.

Entweder verändert das CSB die Struktur der Polymerase selbst oder es rekrutiert weitere Enzyme für diese Aufgabe. Dies könnte mechanistisch ähnlich ablaufen wie die Interaktionen des SWI-SNF-Komplexes mit den Histonen eines Nukleosoms[32]. CSB kann beispielsweise direkt mit Histonen interagieren, aber sie nicht von der DNS ablösen[38]. Wenn das Rad26 wie das CSB ebenfalls nicht in der Lage sein sollte, die Polymerase von der DNS abzulösen, so könnte es seine ATPase-Aktivität wenigstens zur Strukturveränderung einsetzen. Das CSB ist auf jeden Fall in der Lage, die Konformation der DNS, an der es bindet, zu verändern[38, 85]. Die RNS-Polymerase II wäre davon unmittelbar betroffen und müßte ebenso ihre Bindung verändern. Der klare Vorteil dieses Mechanismus wäre, daß die DNS bereits einzelsträngig vorläge und so Reparaturenzyme von vornherein binden könnten.

Die Rekrutierung hingegen zielt hauptsächlich ab auf Erkenntnisse, die TFIIH als entscheidenden Faktor sehen[123]. Die Aufgabe des CSB liegt also zuerst in der kooperativen Bindung zusammen mit XPG. Über die Rekrutierung von XPG wird TFIIH an die RNS-Polymerase II gebunden, was zu einer teilweisen Freilegung der Schadensstelle führt. Erst nachdem TFIIH die Polymerase soweit verändert hätte, daß zusätzliche Reparaturenzyme wie beim GGR-Mechanismus die notwendigen Einschnitte in die DNS durchführen könnten, würde mit Hilfe von CSA die Bindung des TFIIH wieder aktiviert, um die bereits transkribierte m-RNS zu kürzen[117].

Einige Fragen stellen sich jedoch unweigerlich. Das CSB würde erstens nicht zwingend seine ATPase-Fähigkeit brauchen. Außerdem müssen die DNS-Stränge zur komplementären Reparatur zuvor erst wieder hybridisiert werden. Sie liegen aber in zwei unterschiedlichen Bereichen der RNS-Polymerase II. Abgesehen davon muß das beschädigte und herausgeschnittene Oligonukleotid entfernt und das Rückgrat der DNS wieder durch eine Ligase geschlossen werden. Mit der RNS-Polymerase II scheint aber ein sehr großes sterisches Problem zu existieren. In dieser Hinsicht gäbe es die Möglichkeit die gesamte Polymerase mitsamt dem Schaden aus der DNS zu entfernen[124]. Dafür spricht, daß die Polymerase nach der Reparatur sofort wieder die Elongation aufnehmen könnte und zum anderen zeigten Experimente, daß solche Einschnitte auch in Anwesenheit der RNS-Polymerase II erfolgreich durchgeführt werden können[119].

Dieser Mechanismus wäre wohl nur dann leicht zu untersuchen, wenn eine Konformationsänderung nicht nur strukturelle Maßnahmen auslösen würde, die das Protein selbst beeinflussen, sondern auch Veränderungen des Substrats auftreten würden (vgl. Kapitel 7.2.1).

▪ **Überspringen der Schadensstelle**

Schon kurz nach der Entdeckung von CSB stellte sich heraus, daß eine seiner Wirkungen die Verbesserung der Elongation ist (Abb. 5C). Die Untersuchungen zeigten, daß die Addition von CSB zu einem blockierten Elongationskomplex zum Einbau eines zusätzlichen Nukleotids führte und so die transkribierte m-RNS verlängert wurde[90]. Über die Schadensstelle hinaus konnte aber keine Transkription beobachtet werden. Könnte tatsächlich der Schaden übersprungen werden, ließe die Elongation normal weiter, ähnlich der transkriptionellen Mutagenese bei Bakterien[125].

Möglicherweise stellt aber der Einbau eines weiteren Nukleotids auch nicht die Vorstufe des Überspringens der Schadensstelle dar, sondern sollte im Zusammenhang mit der Inhibition des TFIIS betrachtet werden. Um nicht in einen endlosen Kreislauf aus Degradation und Zurückverschiebung mit anschließendem neuen Anlauf zur Elongation zu geraten, müßte das CSB also dem TFIIS entgegenwirken und die Polymerase am Schaden festhalten und stabilisieren[90]. So könnten dann auch auf einfache Weise zusätzliche Enzyme direkt zum Schaden rekrutiert werden, allen voran XPG, CSA und TFIIH respektive ihre homologen Formen in Hefe im Fall des Rad26.

▪ **Auflösung des Elongationskomplexes**

Ein weiterer möglicher Vorgang für den das Rad26 bzw. CSB verantwortlich sein könnte, ist die Auflösung des Elongationskomplexes um die RNS-Polymerase II (Abb. 5D). Natürlich würde dies nicht zu einer Reparatur mit anschließender Wiederaufnahme der Transkription führen. Dennoch könnte die RNS-Polymerase II ein von den Größenverhältnissen her so schwerwiegendes Problem darstellen, daß nur der Ausweg über den Abbruch der Transkription bleibt. Ähnlich dem prokaryontischen TCRF bzw. Mfd könnte CSB seine ATPase-Aktivität nutzen und die RNS-Polymerase II von der Schadensstelle ablösen[21].

Dagegen sprechen jedoch, daß sich die Homologie zwischen CSB / Rad26 und Mfd auf die ATPase-Domäne beschränkt und, daß CSB eben nicht in der Lage ist, die Polymerase von der DNS abzulösen, obwohl CSB negative Überdrehung der DNS herbeiführen kann.

▪ **Degradation des Elongationskomplexes**

Eine, wenn auch drastische Methode, ist die Degradation durch vorangegangene Ubiquitinierung (Abb. 5E). Zu diesem Ausweg würde die Zelle jedoch nur zurückgreifen, sofern die Polymerase selbst ein Hindernis bei der Schadensbeseitigung darstellt. Dieser Vorgang ist noch mehr als die Ablösung der Polymerase ein Weg, der wenig mit Reparatur gemein hat. Anfänglich noch als Modifikation des TCR-Wegs gesehen[126], wurde bald entdeckt, daß zumindest in Hefe die Ubiquitinierung nur ein alternativer Weg sein konnte[127].

Rad26 wirkt sogar als Inhibitor für Def1, welches den Abbauprozess startet[78, 128]. Beim Menschen war das auslösende Enzym noch länger unbekannt, bis Mitarbeiter um *Svejstrup* das Protein Nedd4 identifizieren konnten[129]. Gleichzeitig schlossen sie jegliche Beteiligung von CS-Proteinen definitiv aus, obwohl CSA im Komplex mit einer Ubiquitin-Ligase vorliegen kann[130]. Dieser Komplex hat aber nicht die Polymerase als Ziel, sondern das CSB, welches selbst nach verrichteter Arbeit abgebaut werden muß, damit die Elongation wieder aufgenommen werden kann[131].

Wenn überhaupt dieser Weg als eine Reparatur angesehen werden kann, dann nur als parallele Notlösung für den Fall, daß der transkriptionsgekoppelte Reparaturmechanismus fehlschlägt, nicht aber als sein Bestandteil[132].

2.9. Fluoreszenz

Das optische Phänomen der Fluoreszenz wurde erstmals vor mehr als 150 Jahren von Sir J. F. W. Herschel wissenschaftlich beschrieben[133] und 1935 durch Aleksander Jabłoński physikalisch erklärt[134].

Fluoreszenz ist die Emission von Licht und somit die Abgabe von Energie durch Substanzen, die zuvor Photonen absorbiert haben, und dadurch in höhere elektronische Niveaus angeregt wurden. Je nach Eigenschaft des angeregten Zustands kann es sich hierbei auch um Phosphoreszenz handeln. Typischerweise handelt es sich bei Farbstoffen um organische Moleküle, aber auch ionische Verbindungen sind bekannt.

Zur Illustration soll ein Jabłoński-Diagramm (Abb. 6) dienen, das die möglichen Vorgänge bei der Lichtabsorption beschreibt. Ein Molekül wird bei Einstrahlung genügend hoher Energie ($h\nu_A$) aus dem elektronischen Grundzustand S_0 , der für gewöhnlich einer Singulett-Konfiguration entspricht, in ein höheres Singulett-Niveau S_1 oder S_2 elektronisch angeregt. Die Übergangsrate (k_A) für diesen Prozeß liegt bei etwa 10^{15}s^{-1} . Aufgrund der Boltzmann-Verteilung erfolgt bei Raumtemperatur die Anregung hauptsächlich aus dem Schwingungsgrundzustand ν_0 und endet in einem angeregten Schwingungszustand $\nu_{>0}$, was sich durch das Franck-Condon-Prinzip erklären läßt. Klassisch gesehen kann eine Anregung nur in Niveaus erfolgen, in denen Lage und Impuls der Kerne korrespondieren, also in den Umkehrpunkten, da die Anregung der Elektronen schneller abläuft als sich der Abstand der Kerne ändern könnte. Quantenmechanisch betrachtet ist der Übergang dort am wahrscheinlichsten, wo das Quadrat des Überlappintegrals der beiden Wellenfunktionen maximal wird.

Innerhalb der nächsten 10^{-12} s folgt das Molekül der Regel von Kasha-Vavilov, nach der es in das niedrigste Schwingungsniveau ν_0 von S_1 relaxiert[135].

Dies erfolgt auch aus höher gelegenen elektronischen Niveaus gleicher Spinmultiplizität, wenn sie energetisch nahe zusammen liegen und wird als internal conversion bezeichnet (k_{IC}). Folglich hängt das Emissionsspektrum nicht ab von der absorbierten Wellenlänge. In Lösungen dominiert noch ein weiterer Effekt, nämlich die Relaxation in den Schwingungsgrundzustand (k_{SR}) aufgrund der Umorientierung der umgebenden Lösemittelmoleküle um den Dipol des angeregten Zustands. Dies dauert etwa 10^{-10} s, von wo aus es im einfachsten Fall nur die Möglichkeit der spontanen Emission Γ gibt, die absorbierte Energie wieder abzugeben.

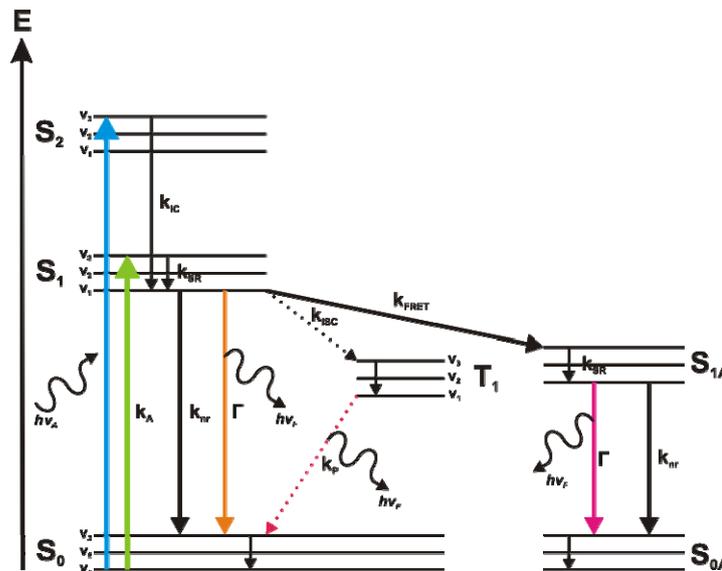


Abb. 6: Darstellung eines Jablonski-Diagramms zur Beschreibung der Vorgänge bei Fluoreszenz.

Nach der Absorption von Licht (blauer Pfeil, grüner Pfeil, $h\nu_A$) vom Grundzustand des Systems in ein elektronisch- und schwingungsangeregtes Niveau (S_2v_3 oder S_1v_3) relaxiert das Molekül auf den Schwingungsgrundzustand des 1. elektronisch angeregten Niveaus (S_1v_1). Entweder geht es über Fluoreszenz (Γ , $h\nu_F$) oder strahlungslose Desaktivierung (k_{nr}) direkt in den Grundzustand über. Beim Intersystem-Crossing (k_{ISC}) in einen Triplettzustand tritt anschließend Phosphoreszenz ($h\nu_P$) auf. Eine zusätzliche strahlungslose Desaktivierung ist die Energieresonanz auf ein Niveau eines benachbarten Akzeptormoleküls ($S_{1A}v_3$). Von dort können die gleichen Vorgänge zum Übergang in den Grundzustand stattfinden. Bei FRET wird dabei Fluoreszenzlicht (Γ , $h\nu_F$) ausgestrahlt.

Dies ist die eigentliche Fluoreszenz ($h\nu_F$) und läuft typischerweise in einem Zeitraum zwischen 10^{-7} und 10^{-9} s ab. Analog gilt auch hier das Franck-Condon-Prinzip, was dazu führt, daß das Emissionsspektrum der meisten Fluorophore ein Spiegelbild des Absorptionsspektrums des $S_0 \rightarrow S_1$ Übergangs darstellt. Letztendlich führen die strahlungsfreien Relaxationen zu einem Energieverlust und so zu einer Verschiebung des Emissionsspektrums zu höheren Wellenlängen hin, besser bekannt als Stokes-Shift[136].

Es gibt aber noch eine weitere Möglichkeit für das Molekül, den S_1 -Zustand zu verlassen, indem unter Spinumkehr, begünstigt durch die Spin-Bahn-Kopplung, ein energetisch günstigerer Triplettzustand T_1 besetzt wird. Nach dieser Interkombination (intersystem crossing) k_{ISC} und weiterer Schwingungsrelaxation kann das System seine Energie nur

durch einen verbotenen Übergang k_P zurück in den Singulettzustand unter Emission eines Photons abgeben. Diese Phosphoreszenz ($h\nu_P$) findet aber mit weitaus geringerer Wahrscheinlichkeit statt, weshalb die Verweildauern im Triplettzustand T_1 relativ lang, 10^3 - 10^4 s, sein können. Somit ließe sich die Phosphoreszenz eigentlich zu den unerwünschten Übergängen zählen, die den angeregten Zustand depopulieren und so das Verhältnis von eingestrahlenen Photonen zu fluoreszenzemittierten Photonen negativ beeinflussen. Daneben gibt es aber noch weitere Prozesse k_{nr} , die strahlungslos den Fluorophor deaktivieren können. Dazu gehört Fluoreszenzauslöschung (quenching) über Kollisionen des angeregten Zustands mit dem Löscher, aber auch Komplexbildungen des Grundzustands.

Es läßt sich somit die Quantenausbeute als Größe definieren, die den Anteil an emittierten Photonen gegenüber den absorbierten in Relation setzt (Gl. 1).

$$\Phi_F = \frac{\Gamma}{k_A} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

Gl. 1

Da die strahlungslosen Übergänge k_{nr} meist nicht beobachtet werden können, kann die Quantenausbeute auch als der Bruchteil der Fluorophore angesehen werden, die über Emission von Strahlung Γ in den Grundzustand übergehen. Der angeregte Zustand besitzt dabei eine Lebenszeit im angeregten Zustand, die wie folgt definiert ist (Gl. 2).

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

Gl. 2

Die Quantenausbeute zeigt sich auch in der mittleren Zerfallszeit des angeregten Zustands, die als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet wird. Im einfachsten Fall folgt sie einem monoexponentiellen Verlauf nach der folgenden Gleichung (Gl. 3).

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Gl. 3

Typischerweise bewegen sich die Lebensdauern zwischen 10^{-8} und 10^{-10} s.

Ein wichtiger Punkt, der die Fluoreszenz noch ausschlaggebend verändern kann, ist das irreversible Bleichen, das durch Photooxidation mit Singulett-Sauerstoff oder von Hydroxylradikalen induziert wird und dadurch die Anzahl der möglichen Absorptions-Emissions-Zyklen signifikant verringert. Die Rate, mit der der Fluorophor bleicht, hängt von verschiedenen Parametern wie Temperatur, pH-Wert oder Vorkommen an Sauerstoff ab, aber auch von der Stabilität des chromophoren Elektronensystems, das in den meisten Fällen nicht variiert werden kann.

Wünschenswerte Eigenschaften eines Fluorophors sind generell eine hohe Quantenausbeute, ein hoher Absorptionskoeffizient und eine hohe Anzahl an Absorptions-Emissions-Zyklen.

Für eine Steigerung der Quantenausbeute müssen die strahlungslosen Relaxationsprozesse minimiert werden, während die molekulare Helligkeit definiert ist als Produkt aus Quantenausbeute und Absorptionskoeffizient, der ebenfalls stoffspezifisch ist.

2.10. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer FRET

Einer der wichtigsten strahlungslosen Relaxationsprozesse k_{FRET} ist jedoch wünschenswert und kann technisch genutzt werden. Der Resonanz-Energietransfer, nach dem Begründer des mathematischen Zusammenhangs auch Förster-Resonanz-Energietransfer genannt, ist die strahlungslose Übertragung der Energie aus dem Schwingungsgrundzustand von S_1 eines Fluorophors (Donor) auf ein zweites energetisch tiefer liegendes Molekül (Akzeptor) über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Hier ist strikt zu unterscheiden zwischen den Prozessen der Emission eines Photons durch den Donor gefolgt von der Reabsorption durch den Akzeptor und intermolekularer Energieübertragung durch Resonanz ohne zwischenzeitliche Aussendung von Licht.

Sofern das Fluoreszenz-Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt kann dieses Phänomen beobachtet werden[137]. Wenn der Akzeptor obendrein ein Fluorophor ist, wird die übertragene Energie auch durch Fluoreszenz ($h\nu_F$) abgegeben, obwohl auch beim Akzeptor nicht-radiative Zerfallswege k_{nr} existieren können. Das Ausmaß an übertragener Energie hängt in erster Linie von zwei Parametern ab, dem Förster-Radius, der für jedes Fluorophor-Paar individuell bestimmt werden kann und der Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Der Förster-Radius gibt den Abstand zweier frei beweglicher Fluorophore an, bei dem eine Übertragungseffizienz von 50 % auftritt. Die Rate des Energietransfers ist folgendermaßen definiert:

$$k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

Gl. 4

mit τ_D : Fluoreszenz-Lebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

R_0 : Förster-Radius

r : Abstand der Fluorophore

Die Effizienz eines Fluorophor-Paars hängt ab vom Verhältnis der vom Donor absorbierten Photonen gegenüber den an den Akzeptor übertragenen und kann auch angegeben werden als:

$$E = \frac{k_{FRET}}{\tau_D^{-1} + k_{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Gl. 5

Die folgende Abbildung (Abb. 7) veranschaulicht den Verlauf der FRET-Effizienz als Funktion eines zufällig gewählten Förster-Radius von 50 Å.

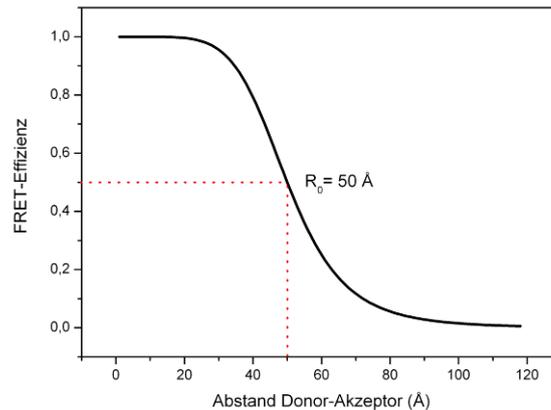


Abb. 7: Darstellung des Verlaufs der FRET-Effizienz in Abhängigkeit des Abstands von Donor und Akzeptor.

Es wurde ein Förster-Radius von 50 Å ausgewählt. Es besteht eine starke Korrelation bei 50 % FRET-Effizienz. Dort liegt der sensitivste Meßbereich.

Wenn der gewählte Abstand nahe am Förster-Radius liegt, reagiert das System sehr sensitiv auf Abstandsänderungen. Ganz anders dagegen ist die Situation an den Extrempunkten, an denen die FRET-Effizienz selbst bei großer Abstandsänderung nur unmerklich ansteigt bzw. abfällt. Typischerweise bewegen sich die Förster-Radien zwischen 20 und 90 Ångstrom, wobei organische Fluorophor-Paare meist zwischen 40 und 70 Ångstrom rangieren[138]. Weil diese Größenverhältnisse mit biochemischen Makromolekülen wie Proteinen oder Membranen relativ genau übereinstimmen, eignet sich FRET daher als eine Art spektroskopisches Lineal, da jederzeit vom Energieübertrag auf den Abstand zurückgerechnet werden kann[139, 140].

Vergleicht man die Experimente, die in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengetragen wurden, so kann man die bis dato erzielten Daten grob in qualitative und quantitative Applikationen einteilen[141]. Dabei fällt auf, daß viele Resultate auf dem Gebiet der Makromoleküle erzielt wurden, seien es Polymere wie DNS oder RNS[142] oder komplexere Einheiten wie Proteine[143]. Die dynamische Bestimmung von Distanzen innerhalb eines Moleküls oder zwischen verschiedenen war schon immer die treibende Kraft dahinter. Hierzu können teilweise Ensemble-Techniken [144] ebenso eingesetzt werden wie Einzelmolekül-Methoden[145-147]. Obwohl mit großem technischem Aufwand verbunden, schließen letztere doch die Mittelung dynamischer Zustände oder heterogener Populationen aus und versprechen so eine genauere Studienmöglichkeit der untersuchten Probe.

2.10.1. Förster-Radius

Der Förster-Radius hängt von vielen Faktoren ab, wie die folgende Gleichung verdeutlicht (Gl. 6).

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D J(\lambda)}{128\pi^5 N n^4}$$

Gl. 6

Es gelten folgende Parameter:

κ^2 : Orientierungsfaktor zwischen Donor- und Akzeptordipol

Φ_D : Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

spektrales Überlappintegral $J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda)A_A(\lambda)^4 d\lambda$

N : Avogadrozahl

n : Brechungsindex des verwendeten Mediums

Der Brechungsindex ist experimentell leicht zu bestimmen und weicht im Fall von wässrigen Medien kaum von 1.33 ab. Der spektrale Verlauf der Absorption und Emission kann stark von der Umgebung der Fluorophore abhängen und muß daher am eingesetzten System individuell bestimmt werden, um systematische Fehler zu vermeiden. Die folgende Abbildung (Abb. 8) zeigt qualitativ das Überlappintegral eines Absorptions- und eines Emissionsspektrums.

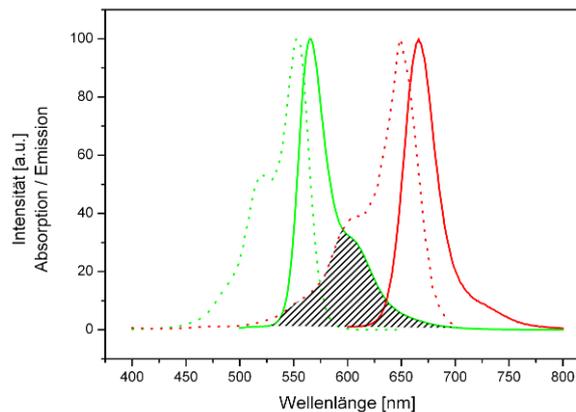


Abb. 8: Darstellung des Überlappintegrals eines Donor- und eines Akzeptorfarbstoffs als Funktion der Wellenlänge.

Die Schulter der Fluoreszenzemission des Donors (grün) überlappt teilweise (grau schattiert) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (rot gepunktet).

Gleiches gilt für die Quantenausbeute des Donors sowie für den Extinktionskoeffizienten des Akzeptors, obwohl alle diese Parameter aufgrund der sechsten Wurzel einen geringeren Einfluß auf den Förster-Radius zeigen als der Orientierungsfaktor κ^2 .

2.10.2. Orientierungsfaktor κ^2

Ein sehr wichtiger Faktor in der Bestimmung des Förster-Radius ist die relative Orientierung des Donors im Verhältnis zum Akzeptor, die gegeben ist durch die folgende Gleichung (Gl. 7).

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 = (\sin\theta_D\sin\theta_A\cos\varphi - 2\cos\theta_D\cos\theta_A)^2$$

Gl. 7

θ_T beschreibt den Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donors und dem Absorptionsdipol des Akzeptors, wie auch aus folgender Abbildung hervorgeht.

θ_D und θ_A sind die Winkel zwischen den Dipolen und dem Vektor zwischen Donor D und Akzeptor A , während φ den Winkel zwischen den zwei Ebenen beschreibt.

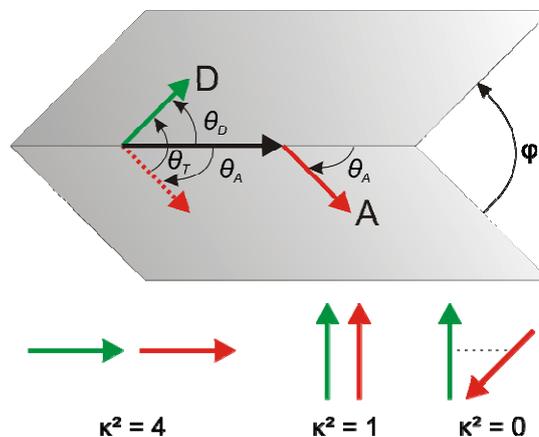


Abb. 9: Darstellung des Orientierungsfaktors κ^2 als Funktion der Absorptions- und Emissionsdipole der Fluorophore.

θ_T zeigt den Winkel zwischen Donor-Emissionsdipol und Akzeptor-Absorptionsdipol. θ_D und θ_A beschreiben die Winkel zwischen den Dipolen und dem Verbindungsvektor. φ steht für den Winkel zwischen den zwei Ebenen. Es ergeben sich unterschiedliche Werte für κ^2 je nach relativer Orientierung (kollinear: 4, parallel: 1, senkrecht: 0).

Die Absolutwerte für κ^2 reichen von 0 bei senkrechter bis 4 bei kollinearer Ausrichtung der beiden Dipole zueinander. Die Orientierung der Dipole ist experimentell kaum zu bestimmen, lediglich die freie Beweglichkeit der Dipole kann über Anisotropiemessungen überprüft werden. Gesetzt den Fall, daß keine Anisotropie besteht, gilt ein Wert von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$. Dies trifft jedoch in der Praxis nur sehr selten zu aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Molekül an dem der Farbstoff gebunden wurde. Zwar besteht auch hier eine Abhängigkeit des Förster-Radius in der sechsten Wurzel. Dennoch können die errechneten Abstände einen Fehler von bis zu 35 % im Vergleich zur Berechnung mit isotropem Förster-Radius aufweisen, wenn κ^2 Werte zwischen 1 und 4 annimmt[148]. Weitaus größere Fehler ergeben sich sogar noch, wenn κ^2 gegen 0 tendiert. Man muß aber zugestehen, daß zusätzliche Faktoren, die beispielsweise die fundamentale Anisotropie beeinflussen können, den effektiven

Fehler auf etwa 10 % verringern können[149]. Dies gilt aber nur dann, wenn keiner der beiden Farbstoffe sehr rigide z. B. an einem Makromolekül befestigt ist. Andernfalls bleibt nur die Berechnung von oberen und unteren Limits für κ^2 aus der Betrachtung der Fluoreszenz-Anisotropien, woraus sich dann wiederum Fehlerbereiche für die FRET-Effizienz bestimmen lassen. Diese möglichen Artefakte müssen jedoch nur bedacht werden, wenn einerseits dynamische Prozesse verfolgt werden und Umorientierungen ausgeschlossen werden sollen bzw. wenn absolute Distanzen so genau wie möglich bestimmt werden müssen.

Diese Arbeit zielt jedoch auf die Identifizierung jeglicher Veränderungen der FRET-Effizienz ab, sei sie durch Distanzänderungen oder durch Orientierungsänderungen verursacht. In diesem Sinne wären Änderungen am Orientierungsfaktor vielleicht sogar vorteilhaft im Bezug auf die Sensitivität dieser Methode als Reporter für Veränderungen auf der Subnanometerskala.

2.11. Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

Bevor die Einzelmolekül-Mikroskopie beschrieben werden kann, ist es wichtig und notwendig, den Unterschied von Ensemble- und Einzelmolekül-Spektroskopie herauszustellen. Beide Methoden beruhen auf der Absorption und der darauffolgenden Emission von Licht fluoreszenter Moleküle, den Fluorophoren, aber unterscheiden sich maßgeblich in den eingesetzten Konzentrationen.

Im Verfahren der Ensemble-Messung werden weitaus höhere und zum Teil mit dem Auge sichtbare Konzentrationen gebraucht, was den Vorteil eines relativ einfachen und unempfindlichen Instruments zur Folge hat, da mit Signalen gearbeitet wird, die weit von jeglichem Untergrundrauschen entfernt sind. Im Gegensatz dazu werden um mehrere Größenordnungen verdünntere Konzentrationen für die Messung einzelner Moleküle benötigt, was automatisch auf Kosten der Signalintensität geht und einen hohen Preis fordert in Form einer ultra-sensitiven Detektion, die praktisch jedes emittierte Photon sammeln muß.

Es verwundert also nicht, daß das erste Experiment zur Untersuchung einzelner fluoreszenter Moleküle in wäßriger Lösung nur einen vergleichsweise kurzen Zeitraum von knapp 15 Jahren zurückliegt[150], was hauptsächlich auf Forschung und Entwicklung von neuartigen Techniken zurückzuführen ist, die maßgeblich zur Erhöhung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen beigetragen haben. Dazu zählen sowohl die Erfindung tiefgekühlter Detektoren mit hoher Quantenausbeute wie auch die Synthese von wesentlich photostabileren Fluorophoren und deren Anwendung in bekannten Konfokal-Mikroskopen oder Mikroskopen basierend auf der totalen internen Reflexion[151].

Es müssen nämlich Mikroskopiearten eingesetzt werden, die über ein genügend hohes Signal-Rausch-Verhältnis verfügen, damit unerwünschtes Hintergrundsignal so weit wie möglich minimiert werden kann.

Wenn so viele Voraussetzungen erst erfüllt werden müssen, welche Vorteile bringt eine Messung an einzelnen Molekülen dann überhaupt?

Die Motivation dahinter ist damals wie heute die gleiche, nämlich Informationen zu gewinnen, die über die Resultate aus reinen Ensemble-Messungen hinausgehen. Das größte Manko einer Messung im Ensemble besteht in der Mittelung über alle Moleküle hinweg, unabhängig von ihren Zuständen und Eigenschaften. Nur im Idealfall für eine einzige vorliegende Population wäre dies vertretbar. Schon bei einer Mischung von zwei Bestandteilen läßt sich nur der nach außen hin effektive Mittelwert der beiden Komponenten als Ergebnis bestimmen. Existieren aber dazu noch unterschiedliche Verteilungen bezüglich der Häufigkeit, kann es sein, daß oft auftretende Ereignisse, seltenere teilweise oder ganz überdecken. Damit sinkt natürlich auch der Informationsgehalt, der aus dem Experiment gewonnen wird. Im schlimmsten Fall verfälscht es sogar das Resultat. Dabei geht man aber noch immer von statischen Prozessen aus. Verändert sich die Probe noch dazu im Laufe der Zeit, so müßten alle Moleküle synchronisiert werden, um nicht auch hier durch zeitliche Mittelung Informationen zu verlieren. Selbstverständlich wurden auch auf dem Gebiet der Ensemble-Messungen Techniken wie z.B. stopped-flow eingeführt, die diesen Nachteilen Rechnung tragen. Außerdem ist es möglich, durch sorgfältige Abstimmung des Meßsystems bestimmte Zustände dynamischer Systeme zu populieren bzw. „einzufrieren“ und so zumindest eine zeitliche Mittelung zu minimieren.

Trotzdem haben Einzelmolekül-Messungen den generellen Vorteil, daß individuelle Moleküle selektiv beobachtet werden können. Mittlerweile ist die Technik so weit gereift, daß nicht nur in vitro sondern auch in vivo gearbeitet werden kann, wenn auch mit Abstrichen aufgrund der intrinsischen Autofluoreszenz von Zellen und damit verbundenen Erhöhung des Hintergrundsignals.

Einen generellen Nachteil weisen aber beide Fluoreszenz-Techniken auf, da die meisten biologisch relevanten Moleküle erst mit dem System kompatibel bzw. beobachtbar gemacht werden müssen, d.h. es müssen Farbstoffe angebunden werden, sofern es sich nicht von vornherein um selbstfluoreszierende Proteine handelt. Über selektive Kopplung an definierte Positionen läßt sich dies jedoch in einen Vorteil ummünzen, da so unterschiedliche Fragestellungen je nach Bindungsstelle betrachtet werden können. Hier ergeben sich zuweilen zwangsweise Berührungspunkte mit der Röntgenstrukturanalyse, da einerseits auf vorhandene Kristallstrukturen zurückgegriffen werden muß, um diese Bindungsstellen sinnvoll auswählen zu können. Andererseits greift die Kehrseite der hohen räumlichen Auflösung, nämlich der Verlust jeglicher Dynamik, hier nicht, sodaß diese Methode komplementär eingesetzt werden kann.

2.11.1. Totale Interne Reflexion

Bei der totalen internen Reflexion wird aufgrund der Brechung des Lichts beim Durchgang an Medien unterschiedlicher Brechungsindizes ein evaneszentes elektromagnetisches Feld generiert.

Trifft ein Lichtstrahl nach dem Durchgang durch ein Medium mit einem bestimmten Brechungsindex (n_E) auf ein Medium mit einem davon unterschiedlichen Index (n_A), so wird das Licht nach dem Gesetz von Snell (Gl. 8) gebrochen:

$$n_E \times \sin \theta_E = n_A \times \sin \theta_A$$

Gl. 8

Für den einfallenden Strahl gilt dabei θ_E gemessen gegen die Normale, während der gebrochene Strahl den Winkel θ_A aufweist (Abb. 10A). Wird der Einfallswinkel stetig erhöht, erreicht er einen kritischen Wert θ_K bei dem der Brechungswinkel 90° zur Normalen beträgt (Abb. 10B). Unterhalb des kritischen Winkels wird das Licht in einem nach Snell bestimm- baren Brechungswinkel in das optisch dünnere Medium abgelenkt. Ein Bruchteil wird zu- rück ins Glas reflektiert wird. Überhalb des kritischen Winkels wird das Licht vollständig am Übergang der beiden Medien reflektiert (Abb. 10C). Der Zustand der totalen internen Reflexion ist erreicht, da kein Licht mehr in das Medium mit niedrigerem Brechungsindex gebrochen wird.

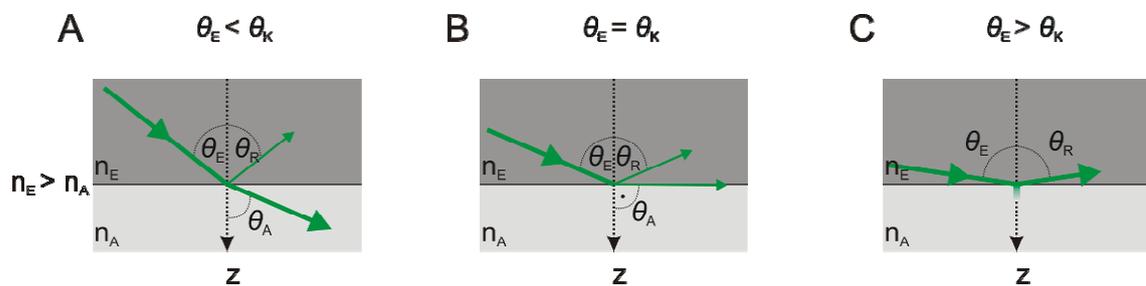


Abb. 10: Darstellung der Brechung eines Lichtstrahls beim Durchgang zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes ($n_E > n_A$) in Abhängigkeit des Einfallswinkels θ_E .

(A) Der Einfallswinkel θ_E liegt unterhalb des kritischen Winkels θ_K für Totalreflexion. Der Lichtstrahl wird beim Übergang in das optisch dünnere Medium vom Lot weggebrochen. (B) Ist der Einfallswinkel θ_E gleich dem kritischen Winkel θ_K wird ein Teil des Lichts reflektiert. Der andere Teil wird 90° zum Lot gebrochen und die Lichtwelle bewegt sich entlang der Phasengrenze. (C) Überhalb des kritischen Winkels θ_K findet keine Brechung statt. Alles Licht wird totalreflektiert unter der Erzeugung eines evaneszenten, exponentiell abfallenden Feldes an der Grenzfläche.

Der kritische Winkel beträgt dann:

$$n_E \times \sin \theta_K = n_A$$

Gl. 9

oder

$$\theta_K = \arcsin\left(\frac{n_A}{n_E}\right)$$

Gl. 10

n_A steht für den Brechungsindex des optisch dünneren Mediums, n_E dementsprechend für den des optisch dichteren. Bei Verwendung von wässrigen Medien (n_A : 1.33) in Kombination mit Quarzglas (n_E : 1.46) beträgt der kritische Winkel etwa 65.6°.

An der Grenzfläche der beiden Medien entsteht jedoch ein nicht-propagierendes, evaneszentes Feld mit derselben Frequenz des ursprünglich einfallenden Lichtstrahls. Es wird hervorgerufen durch den endlichen Strahlungsquerschnitt des einfallenden Lichts und der damit verbundenen Abweichung von einer perfekten Welle[152]. Nur durch ein Streuzentrum, wie beispielsweise einem Farbstoffmolekül, kann es wieder in ein propagierendes Feld umgewandelt werden.

Die Feldstärke fällt jedoch exponentiell ab mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche, weshalb das Feld eine extrem kurze Reichweite aufweist. Für die Intensität in einem Abstand z von der Oberfläche gilt:

$$I(z) = I(0) \times e^{-z/d}$$

Gl. 11

mit der Penetrationstiefe d

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{n_E^2 \cdot \sin^2 \theta_E - n_A^2}}$$

Gl. 12

λ_0 : Wellenlänge des einfallenden Lichts im Vakuum

Die Tiefe d ist unabhängig von der Polarisation des Lichts und sinkt mit steigendem Winkel θ_E . d liegt in der Größenordnung der Wellenlänge λ_0 oder darunter, außer wenn gilt: $\theta_E \rightarrow \theta_K$. Die maximale Tiefe des Feldes beträgt bei $\theta_E = 65.6^\circ$ und Brechungsindizes für Wasser und Quarzglas etwa 146 nm.

Werden nun Moleküle innerhalb dieses Feldes, also an der Oberfläche immobilisiert, können diese angeregt werden, vorausgesetzt eine elektronische Anregung ist bei der gegebenen Wellenlänge durch die Lichtquelle möglich. Alle Moleküle außerhalb dieses Feldes, also im restlichen Volumen in z -Achse der Kammer, aber innerhalb des Blickfelds, werden bei der TIRF-Mikroskopie nicht angeregt. Es lassen sich somit kontrastreiche Aufnahmen erzielen, deren axiale Auflösung sogar die der konfokalen Mikroskopie mit etwa 500 nm übersteigt[153].

2.11.2. Prisma-basiertes TIRF-Mikroskop

Die Gruppe um Axelrod lieferte bereits vor mehr als 20 Jahren theoretische Beschreibungen zur Entwicklung und Anwendung der TIRF-Mikroskopie[154].

Es existieren primär zwei Arten, um bei einer Mikroskopiemethode den kritischen Winkel für TIR zu generieren. Einerseits kann dies über Objektive mit hoher Apertur ($N.A. > 1.45$) oder über Prismen bewerkstelligt werden, wobei beide Methoden ihre Vorzüge und auch Nachteile haben. Eine graphische Gegenüberstellung der beiden Techniken findet sich in der folgenden Abbildung (Abb. 11).

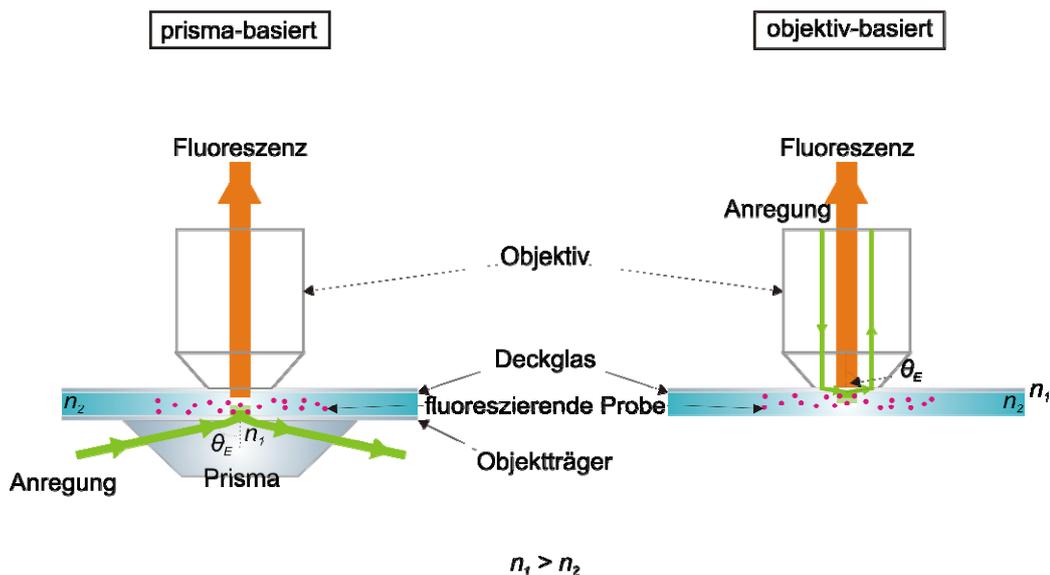


Abb. 11: Gegenüberstellung der beiden Mikroskopieverfahren unter Ausnutzung der totalen internen Reflexion.

Beim prisma-basierten Aufbau erfolgt die totale interne Reflexion durch ein Prisma auf der gegenüberliegenden Seite des Objektivs. Nur Wasserimmersions-Objektive können bei dieser Arbeitstiefe genutzt werden. Bei der objektivbasierten Variante ist keine Sandwich-Bauweise erforderlich. Die Anregung erfolgt durch das Objektiv selbst. Es müssen Objektive mit hoher Apertur ($N.A. > 1.45$) in Kombination mit Quarzglas verwendet werden. Messungen an lebenden Zellen können nur objektivbasiert durchgeführt werden.

Beim Prisma-basierten Mikroskop (Abb. 11, links) wird der Anregungsstrahl an der Grenzfläche einer Glasplatte und einer wässrigen Probenlösung total reflektiert. Der Einfallswinkel θ_E wird über ein Prisma erzeugt, das auf der Glasplatte befestigt ist. Dazu kann mit einem Winkel, der noch nicht einmal über dem kritischen Winkel θ_K liegt, auf ein Prisma fokussiert werden. Der überkritische Winkel wird erst durch weitere Brechung im Prisma generiert. Das dabei entstehende evaneszente Feld kann innerhalb der ersten 100 - 200 nm nach der Grenzfläche effektiv genutzt werden, weshalb sich die zu untersuchenden Moleküle möglichst nah an der Glasoberfläche befinden müssen. Um die Fluoreszenz der Probenmoleküle detektieren zu können, muß ein Objektiv in unmittelbarer Nähe platziert werden. In der Praxis wird dies meist über eine Sandwich-Bauweise realisiert, wobei ein-

fach aus Platzgründen, das Objektiv auf der gegenüberliegenden Seite des Prismas positioniert wird. Zur Untersuchung dynamischer Prozesse, werden dazu meist Flußkammern aus zwei Glasplatten und einem Abstandshalter verwendet, bei denen die Probenlösung jederzeit gewechselt werden kann. Die Brechungsindizes des Prismas und der darunterliegenden Glasplatte müssen aufeinander abgestimmt sein. Es darf auch nicht zu einer erneuten Brechung zwischen den beiden Glasflächen kommen, weshalb ein Immersionsöl eingesetzt werden muß.

Alternativ dazu kann das Prisma selbst die Unterseite der Flußkammer darstellen. Der Vorteil dieser Methode ist, nicht auf Immersionsöl, das möglicherweise fluoreszente Verunreinigungen beinhaltet, zwischen Prisma und Objektträger bzw. Glasplatte zurückgreifen zu müssen. Die Nachteile überwiegen jedoch, insbesondere wegen der unverhältnismäßig höheren Kosten. In der Theorie kann zwar herkömmliches Glas ($n: 1.52$) verwendet werden, in der Praxis wird hauptsächlich Quarzglas wegen seiner außergewöhnlichen Reinheit eingesetzt. Im Gegensatz zu einem Prisma aus Quarzglas können Objektträger aus diesem Material jederzeit ausgetauscht und ersetzt werden. Daher ist auch die Reinigung wesentlich unproblematischer.

Der Abstandshalter, der die beiden Glasplatten trennt, muß möglichst dünn gehalten werden, um die Distanz des Objektivs und der Probe zu minimieren. Auf der anderen Seite müssen Objektive mit hoher numerischer Apertur und großem Arbeitsabstand eingesetzt werden. Aufgrund auftretender sphärischer Abberationen können jedoch keine Ölimmersions-Objektive verwendet werden, sondern nur wasserbasierte. Aber auch hier ist der effektive Arbeitsabstand auf unter $300\ \mu\text{m}$ (Nikon CFI Plan Apo VC 60X WI: $0.27\ \text{mm}$) begrenzt.

Dies kann auch gleichzeitig als Nachteil gegenüber objektivbasierten Mikroskopen gewertet werden. Obwohl durch die Verwendung eines Prismas sehr hohe überkritische Winkel des Anregungsstrahls möglich sind und dadurch eine sehr hohe axiale Auflösung mit sehr hohem Signal-Hintergrund-Verhältnis, können nur Objektive eingesetzt werden, die über eine numerische Apertur von 1.2 verfügen. Bei Ölimmersions-Objektiven werden auch Werte von 1.65 erreicht, was im Gegensatz dazu die Zahl der detektierbaren Photonen und damit das Signal deutlich positiv beeinflusst[155].

Dieser Vorteil wird beim objektivbasierten TIRF-Mikroskop (Abb. 11, rechts) ausgenutzt, bei dem das evaneszente Feld auf der Seite erzeugt wird, auf der die Detektion stattfindet. Der Anregungsstrahl wird dazu auf die rückwärtige Brennebene des Objektivs fokussiert und soweit parallel verschoben, bis der Winkel θ_E den kritischen Winkel erreicht und eine Totalreflexion am Übergang des Deckglases zur Probenlösung erzeugt wird. Die Rückreflexion wie auch die Fluoreszenz werden dann vom Objektiv wieder gesammelt und zurückgeführt. Für die benötigte Parallelverschiebung muß es sich dabei um ein Objektiv mit sehr hoher numerischer Apertur (> 1.4) handeln. Ein großer Vorteil dieser Methode ist das Fehlen eines zweiten Deckglases und damit eines offenen Probenvolumens.

Dies erleichtert zum einen die Manipulation der Probe, zum anderen sind im Vergleich zum Prisma-basierten Aufbau auch Experimente an Zellen möglich[156, 157].

Gegen objektivbasiertes TIRF spricht, daß selbst bei extrem hohen numerischen Aperturen keine so hohe axiale Auflösung wie beim Prisma-basierten Ansatz erreicht wird. Es besteht auch die Gefahr, daß das der totalreflektierte Strahl zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führt und so das Signal-Rausch-Verhältnis trotz besseren Öffnungswinkels negativ beeinflusst. Die verwendeten Deckgläser müssen hier aus Quarzglas gefertigt werden, was im Gegensatz zu Objektträgern sehr kostenintensiv ist. Zudem sind Wasserimmersions-Objektive derzeit erhältlich, die bis in den violetten spektralen Bereich chromatisch korrigiert sind, bei Ölimmersionen-Objektiven existiert dagegen keine ausreichende Korrektur.

Beide Mikroskopie-Arten können mit der Detektion über ultra-sensitive CCD-Kameras kombiniert werden, die sowohl eine sehr hohe zeitliche Auflösung bieten wie auch die simultane Aufnahme hunderter Moleküle. Anders als bei rasterartigen Verfahren wie der konfokalen Mikroskopie können so kurzerhand statistisch relevante Zahlen erzielt werden. Heterogene Probenzusammensetzung und auch dynamisches Verhalten können so schnell erschlossen werden. Obendrein eignen sich diese Verfahren für Messungen bei Raumtemperatur bzw. physiologischen Temperaturen.

In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Experimente *in vitro* durchgeführt, weshalb ein Prisma-basiertes TIRF-Mikroskop zum Einsatz kommt.

3. Methodik

Dieses Kapitel soll kurz die spezifischen Vorgehensweisen beleuchten, die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden, um z.B. die Funktion der Proteine sicherzustellen oder die Systeme für die Untersuchung mit der FRET-Technik zugänglich zu machen.

Experimente, Ergebnisse und Diskussion finden sich später in Kapitel 6ff, zusammen mit etwaigen Schwierigkeiten, die im Laufe der Arbeit auftraten. Waren jedoch schon im Vorfeld Probleme absehbar, die bestimmte Experimente verhindert hätten, wird hier explizit darauf hingewiesen.

3.1. Spezifische Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Unter physiologischen Bedingungen können zur spezifischen Markierung einzelner Aminosäuren nur wenige Reaktionstypen eingesetzt werden. Die wohl gängigste Methode zur kovalenten Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs verläuft über eine Michael-Addition einer Maleimid-Gruppe an die Aminosäure Cystein (Abb. 12). Daneben existieren zwar noch weitere Möglichkeiten wie die Anwendung der Click-Chemie mit Katalyse durch Übergangsmetalle oder die Modifikation von Tryptophanen und Tyrosinen[158-160]. Leider sind letztere jedoch nur unter größerem Aufwand vereinbar mit dem Einsatz kommerziell erhältlicher Farbstoffe.

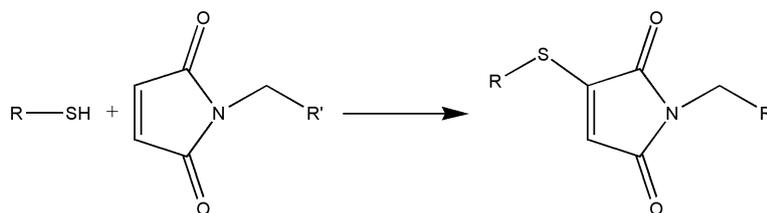


Abb. 12: Markierungsreaktion.

Michael-Addition einer Thiolgruppe R (Cystein) mit der Maleimid-Gruppe eines Farbstoffs R' unter Bildung eines Thioethers.

Generell führt eine Markierung mit Maleimid-Derivaten zu einer spezifischen Markierung der Cystein-Reste an einem Protein. Dabei gilt, daß weiter innen im Protein liegende Aminosäuren weniger als weiter außen liegende umgesetzt werden können. Zum einen

verhindert die eingeschränkte Freiheit ein Andocken des Fluorophors, zum anderen herrscht im Inneren eine leicht hydrophobere Umgebung, sodaß manche Farbstoffe schlechter hydratisiert werden können.

Die alternative Reaktion mit Hilfe von N-Hydroxysuccinimidestern (NHS-Ester) führt dagegen von vornherein zu einer sehr unspezifischen Anbindung der Farbstoffe an Lysine, wovon die meisten Proteine eindeutig mehr besitzen als Cysteine. Die Reaktion erfolgt anhand des folgenden Schemas (Abb. 13).

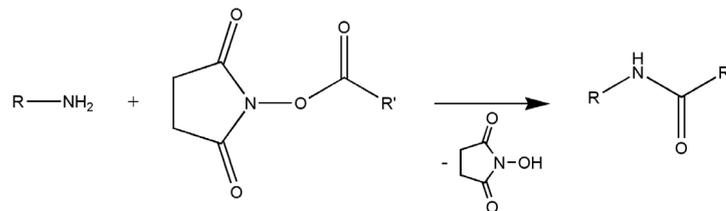


Abb. 13: Markierungsreaktion.

Reaktion zwischen einer Amingruppe R (Lysin) und eines Farbstoffs R' unter Bildung eines Amids bei gleichzeitiger Abspaltung der N-Hydroxysuccinimid-Gruppe.

3.1.1. Auswahl der Farbstoffe

Generelle Voraussetzungen, die Farbstoffe erfüllen sollten, um für Fluoreszenz-Messungen eingesetzt werden zu können, sind neben einem ausreichend hohen Absorptionskoeffizienten ($> 50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), eine relativ hohe Quantenausbeute ($> 30 \%$) sowie chemische wie photophysikalische Stabilität. Für eine Anbindung an ein Protein müssen sie außerdem sehr gut wasserlöslich sein, die Aktivität des Proteins möglichst wenig beeinflussen sowie idealerweise als Maleimid-Derivat kommerziell erhältlich sein. Im Fall von FRET-Messungen müssen das Fluoreszenz-Emissionsspektrum des als Donor eingesetzten Farbstoffs und das Fluoreszenz-Anregungsspektrum des als Akzeptor verwendeten Farbstoffs zueinander kompatibel sein. Es bieten sich also beispielsweise Farbstoffe wie Cy3 (Amersham Biosciences), Alexa 546 (Invitrogen) oder Atto 532 (Atto-Tec) als Donor-Farbstoffe an, während Cy5 (Amersham Biosciences) sowie Alexa 647 (Invitrogen) und Atto 647N (Atto-Tec) als Akzeptoren gewählt werden können, welche alle kommerziell als Maleimid-Derivate erhältlich sind. Durch die Verwendung mehrerer Donor-Akzeptor-Paare kann auch ihr Einfluß untersucht werden.

3.1.2. Direkte Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen

Für Einzelmolekül-Experimente mit einem TIRF-Mikroskop müssen die zu untersuchenden Moleküle an einer Glasoberfläche immobilisiert werden. Dabei ist die Immobilisierung über DNS durch die relativ starke Anbindung weniger problematisch im Vergleich

zur direkten Immobilisierung des Proteins selbst, um es ohne Substrat untersuchen zu können. Das Protein muß in letzterem Fall notwendigerweise so modifiziert werden, daß es an der Quarzglasoberfläche immobilisiert werden kann. Hierzu bieten sich zwar konjugierbare Biotin-Derivate an, die über eine N-Hydroxysuccinimid-Kupplung verfügen (Abb. 13).

Eine Interaktion mit der Oberfläche ist bei direkter Anbindung jedoch nicht mehr auszuschließen. Sie kann aber abgesehen durch Passivierung der Oberfläche auch mittels Verlängerung des Verbindungsstücks zwischen Biotin-Molekül und Protein minimiert werden. Dazu müssen dann Derivate mit zwischengeschalteten CH₂-Ketten verwendet werden, wie 6-((Biotinyl)amino)hexansäure-succinimidylester (Biotin-X) oder 6-((6-((Biotinyl)amino)hexanyl)amino)hexansäure-succinimidylester (Biotin-XX) mit einem 9- bzw. 14-armigen Verbindungsstück.

Ein weiteres Problem, das in Verbindung zur Immobilisierung steht, ist, daß nicht unterschieden werden kann, ob ein Protein sich von der DNS löst oder nur der Farbstoff bleicht. Es müssen also Farbstoffe mit einer hohen photophysikalischen Stabilität eingesetzt werden, um das Protein so lange wie möglich beobachten zu können. Atto 647N könnte sich hierfür eignen, da es bereits herausragende Stabilität zeigte[161].

Hier können zur Aufklärung auch Messungen mit Hilfe der Burst-Analyse auf einem Konfokalmikroskop beitragen[162-164]. Das untersuchte System ist dort nicht immobilisiert, sondern befindet sich ähnlich der Ensemble-Experimente in Lösung. Der Anteil an durchschnittlich gebundenem Enzym müßte also über die Einstellung der Konzentrationsverhältnisse geregelt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die völlig andere Zeitskala verglichen mit den anderen beiden Methoden. Da ein Molekül nur untersucht werden kann, solange es durch das Anregungsvolumen diffundiert, gibt diese Art der Messung zwar einen Überblick über die vorherrschenden Populationen, nicht aber über längerdauernde Dynamik, die überhalb der Diffusionszeiten liegen würde, wobei sich üblicherweise die Diffusionszeiten in der Größenordnung von Millisekunden bewegen.

3.2. Aktivitätstests

Essentiell für Messungen jedweder Art an Mutanten, gekürzten Konstrukten oder modifizierten Formen eines Enzyms ist die Erhaltung seiner Eigenschaften und somit der Funktionalität des Proteins. Zudem kann auch der Einfluß verschiedener DNS-Substrate untersucht werden.

Bei ATPasen ist dies sehr leicht festzustellen, indem ein Aktivitätstest die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse verfolgt. Neben der gängigsten Methode radioaktiv markiertes ATP einzusetzen, existieren auch enzymbasierte Tests, die über eine Lumineszenzreaktion

ablaufen. Erstere erfordern spezielle nichtvorhandene Laborausrüstung, letztere arbeiten mit mehreren Enzymkomplexen und sind dementsprechend komplex und fehleranfällig. Einen einfachen und schnellen Test bietet beispielsweise Biomol Green[165], das auf der Wellenlängenverschiebung des Absorptionsmaximums von Malachit-Grün basiert[166]. Bei Vorliegen freien Phosphats verschiebt sich sein Absorptionsspektrum von hell-gelb nach dunkel-grün je nach Konzentration der Phosphat-Ionen. Dies geschieht bereits ab sehr geringen Mengen und führt linear über einen breiten Bereich zu einem Sättigungswert, was eine relativ hohe Meßdynamik zuläßt.

3.3. Bestimmung der Bindungsverhältnisse von Proteinen zu DNS

Im vorliegenden Fall muß das Bindungsverhalten der Proteine SSO1653 und Rad26 an DNS quantitativ untersucht werden, um etwaige Unterschiede in ihrem Verhalten auf Affinitätsverschiebungen zurückführen zu können.

Bekannte und etablierte Methoden sind Blotting-Techniken mit Hilfe von Nitrocellulose-Membranen[167] oder die quantitative Retardation eines Protein-DNS Komplexes bei der Gel-Elektrophorese, auch genannt Electrophoretic Mobility Shift Assay EMSA[168, 169]. Die Bestimmung der Fluoreszenz-Anisotropie eines Farbstoffs am verwendeten DNS-Substrat wurde erst vergleichsweise spät eingesetzt, was hauptsächlich am benötigten Instrumentarium gelegen haben mag[170, 171].

Die Anisotropie eines Farbstoffs ist definiert als dessen Fähigkeit, absorbiertes polarisiertes Licht wieder mit der gleichen Polarisation zu emittieren. Viele Faktoren können hierbei eine Rolle spielen und zu einer Depolarisierung führen. Ohne näher ins Detail zu gehen, besitzt jeder Fluoreszenz-Farbstoff eine definierte Anisotropie, seine fundamentale Anisotropie, die über den Grad der intrinsischen Depolarisierung informiert[138]. Ist sie hoch, die Werte variieren zwischen -0.2 und 0.4, so gibt der Farbstoff die eingestrahlte Polarisation wieder ab. Sie gilt jedoch nur, sofern keine anderen Quellen der Depolarisierung vorhanden sind, wie zum Beispiel Reabsorption eines Photons bei hohen Konzentrationen oder Rotations-Diffusion durch Brown'sche Molekularbewegung. Letztere ist aber keinesfalls unerwünscht, denn sie gibt wichtige Informationen über das fluoreszente Molekül und seine Umgebung wieder. Bedenkt man die Größe eines Proteins an dem ein Fluorophor befestigt wurde, so liegen die Fluoreszenz-Lebensdauer im angeregten Zustand und die Rotationszeit des Proteins etwa in derselben Größenordnung. Verändert sich nun die Rotationszeit des Proteins, weil sich z.B. seine Struktur ändert oder es an einen Partner bindet, so wird

die Fluoreszenz dementsprechend unterschiedlich depolarisiert, was wiederum die Anisotropie verändert.

Im Gegensatz zu den alternativen biochemischen Meßmethoden, liefert die Anisotropie jedoch Daten über den Gleichgewichtszustand in Lösung. Anders als auf Membranen oder in vernetzten Matrizen können sich in der Probenlösung Protein und DNS jederzeit trennen und anschließend wieder aneinander binden. Man gewinnt dadurch Informationen, die nicht ausschließlich von der Trennungsrate k_{off} bzw. der durchschnittlichen Bindungszeit am DNS-Substrat abhängen, sondern die Affinität auch in Bezug auf die Bindungsrate k_{on} betrachten. Außerdem müssen freies und gebundenes Substrat nicht voneinander abgetrennt werden.

Anders als bei FRET-Messungen muß hierzu jedoch das unmarkierte Protein als Substrat eingesetzt und zu einer konstanten Menge DNS titriert werden. Die DNS ist wiederum mit einem Farbstoff versehen. Dies ist nötig, da die Rotationszeit linear von der molekularen Masse abhängt und nur dann ein meßbarer Unterschied in der Anisotropie auftritt, wenn die Masse sprunghaft steigt. Umgekehrt müßte man eine ungleich längere DNS verwenden, um den Massenunterschied zu bewerkstelligen. Gleichzeitig hätte man jedoch eine sehr hohe Anisotropie des noch ungebundenen Substrats und zudem mehr als nur eine potentielle Bindungsstelle geschaffen, was die Analyse um ein Vielfaches komplizierter machen würde. Daher ist es vorteilhaft, ein möglichst kurzes Oligomer zu verwenden, so daß dessen Rotationszeit nach dem Binden eines vielfach schwereren Proteins merklich ansteigt.

Quantitativ läßt sich die Änderung der Anisotropie in Abhängigkeit der molekularen Massen mit der Gleichung nach *Perrin* wie folgt beschreiben:

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

Gl. 13

mit der Fluoreszenz-Lebenszeit τ [ns] und der Rotations-Korrelations-Zeit θ [ns], die wie folgt definiert ist:

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} = \frac{\eta M}{RT} (\bar{v} + h)$$

Gl. 14

mit folgenden Parametern:

η : Viskosität der Lösung (8.88 P bei 25° C) [*Poise* = Pa × s]

M : molekulare Masse des Objekts $\left[\frac{g}{mol}\right]$

R : allg. Gaskonstante $\left[\frac{J}{mol \times K}\right]$

T : Temperatur [K]

v : spezifisches Volumen des Objekts (typisch: 0.73) $\left[\frac{ml}{g}\right]$

h : Hydratation (typisch: 0.23) $\left[\frac{ml}{g}\right]$

Bei einer fundamentalen Anisotropie von 0.4, die nur wenige Farbstoffe besitzen, entscheidet bei den gegebenen Parametern wie der Viskosität des Lösemittels (η), der Temperatur (T) und der Hydrathülle, ausgedrückt durch $(\nu + h)$, hauptsächlich die molekulare Masse (M) sowie die Fluoreszenzlebenszeit des Farbstoffs (τ) über die erwartete Anisotropie. Eine graphische Darstellung der Anisotropie in Abhängigkeit der molekularen Masse des untersuchten Objekts bzw. Komplexes ist in Abb. 14 gezeigt.

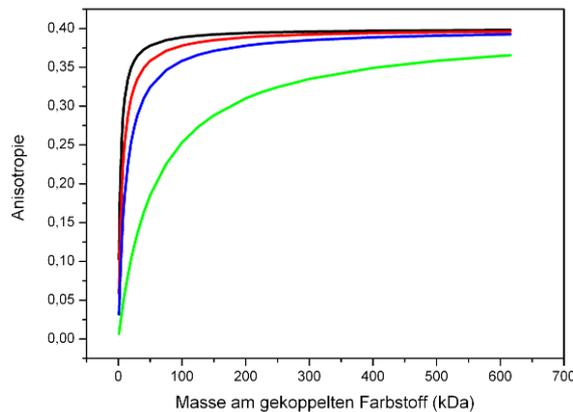


Abb. 14: Verlauf der Fluoreszenz-Anisotropien vier ausgewählter Fluoreszenz-Lebenszeiten.

Die fundamentale Anisotropie $r_0 = 0.4$ wird in Abhängigkeit der molekularen Masse des am Farbstoff gekoppelten Substrats unterschiedlich schnell erreicht.

farbliche Legende der Fluoreszenz-Lebenszeiten: 1 ns schwarz, 2 ns rot, 4 ns blau, 20 ns grün.

Es werden vier unterschiedliche Fluoreszenz-Lebenszeiten (1 ns, 2 ns, 4 ns, 20 ns) bei Standardbedingungen (25° C) verwendet. Man sieht, daß ein Farbstoff wie Cy3 mit einer Fluoreszenz-Lebensdauer von etwa 0.3 ns[172, 173] (vgl. Abb. 14, schwarze Kurve 1 ns) praktisch keine Anwendung im Bereich der Anisotropie-Bestimmung finden kann, da die Rotationsdiffusionszeiten der meisten Biomoleküle mindestens zehn Mal länger sind und so bereits ab 10 kDa Masse 90 % der fundamentalen Anisotropie erreicht wäre. Dagegen sind Farbstoffe wie 5-Carboxytetramethylrhodamin TAMRA oder Alexa 546 mit Fluoreszenz-Lebenszeiten von 2.2 ns[174] bzw. 4.1 ns[175] besser geeignet. Zudem dürfen die Farbstoffe keine unabhängige freie Rotation aufweisen, sondern müssen fest am gebundenen DNS-Strang binden. Untersuchungen an TAMRA haben dies gezeigt[176, 177], weswegen dieser Farbstoff primär eingesetzt werden soll. Andererseits wurde auch festgestellt, daß TAMRA eine heterogene Verteilung an Fluoreszenz-Lebenszeiten aufweist[174], seine Fluoreszenz von benachbarten Guanosin-Basen im DNS-Strang ausgelöscht wird[178] und er in wenigstens drei unterschiedlich gebundenen Konformationen vorliegt[162]. Daher wird auch auf Alexa 546 zurückgegriffen, der jedoch weitaus weniger gut charakterisiert ist.

4. Experimenteller Aufbau

Die in den folgenden Kapiteln 6ff angesprochenen biophysikalischen Fragestellungen erforderten den unbedingten Einsatz einer hochempfindlichen Meßmethode, deren Anforderungen optimal durch die Einzelmolekül-Mikroskopie erfüllt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde also ein Mikroskop-System aufgebaut, das speziell auf derartige hochempfindliche in vitro Untersuchungen angepaßt ist, aber dennoch einen weiten Anwendungsbereich abdeckt.

4.1. Übersicht des Aufbaus

Die folgende Abbildung (Abb. 1) zeigt schematisch den Aufbau der Apparatur. Das System wurde vollständig selbst gebaut und basiert nicht auf einem kommerziell erhältlichen, invertierten Fluoreszenz-Mikroskop. Der auffälligste Unterschied ist deswegen die optische Achse, die parallel zur Tischoberfläche verläuft.

4.1.1. Anregungsstrahlengang

▪ Anregungsquellen

Als kontinuierliche Anregungsquellen wurden ein diodengepumpter Festkörperlaser (Calypso, Cobolt) mit 50 mW bei 491 nm, ein frequenzverdoppelter Nd-YAG-Laser (Excelsior 532-100, Spectra-Physics) mit 100 mW bei 532 nm sowie ein Diodenlaser (CUBE 635-25C, Coherent) mit 25 mW bei 637 nm verwendet. Alle Laser sind in ihrer Leistung regelbar, wobei die Hersteller die technischen Spezifikationen nur bei der angegebenen Nennleistung garantieren. Messungen mit einem Leistungsmeßgerät ergaben aber, daß die Laser selbst bei 10 % ihrer maximalen Nennleistung nur Schwankungen unterhalb 0.1 % in einem Zeitraum von einer Minute aufwiesen und deshalb als ausreichend stabil angesehen werden konnten. Der 532 nm Laser wird direkt über ein Potentiometer geregelt, welches eine Spannung variiert, die als externes Signal in das Netzteil des Lasers eingespeist wird. Dieses Bauteil war jedoch nicht Bestandteil, sondern mußte erst zusätzlich gebaut werden. Problematisch war hierbei die unzureichende Dokumentation seitens des Herstellers.

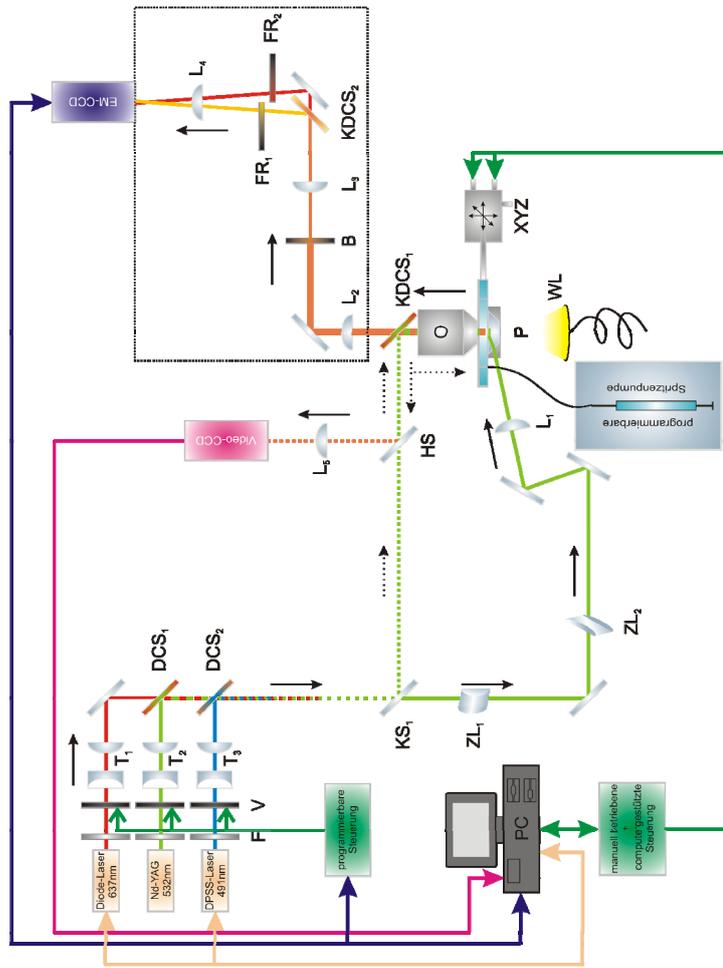


Abb. 15: Schematische Darstellung des TIRF-Mikroskops.

Das Mikroskop verfügt über 3 Anregungsquellen (491 nm, 532 nm, 637 nm), die über programmierbare Verschlussblenden (V) alternierend betrieben werden können. Die Strahlen werden in Teleskopen (T_1 - T_3) kollimiert, dann mit Hilfe von dichroischen Spiegeln räumlich überlagert (DCS₁ u. DCS₂). Der Anregungsstrahl wird über zylindrische Linsen (ZL₁ u. ZL₂) elliptisch aufgeweitet und über die Linse L₁ im überkritischen Einfallswinkel auf das Prisma (P) fokussiert. Das evaneszente Feld regt Moleküle an, die Fluoreszenz wird vom Objektiv (O) gesammelt und auf eine EM-CCD-Kamera abgebildet. Die Strahlen werden zuvor spektral aufgetrennt (KDCS₂) und von Anregungslicht gefiltert (FR₁ u. FR₂). Mit der Blende B in der Bildebene zwischen Linse L₂ und L₃ wird der Strahl beschnitten, um beide Fluoreszenzbereiche gleichzeitig auf eine Kamera abzubilden. Eine Video-CCD-Kamera dient zur Weitfeld-Mikroskopie über einen halbdurchlässigen Spiegel (HS) bei Weislicht-Anregung (WL). Zur Fokussierung der Probenkammer können zwei Spiegel eingesetzt werden (KS₁ u. KDCS₁). Die Probenkammer ist motorisiert und kann vom Rechner aus gesteuert werden. Zur Probenbeladung wird eine programmierbare Spritzenpumpe verwendet.

Die Laser bei 491 nm und 637 nm dagegen verfügen über Verbindungen zum Meßrechner und können so sehr komfortabel ferngesteuert werden. Zu Beginn dieser Arbeit wurden zwei leistungsschwächere Laser eingesetzt, für 532 nm Wellenlänge ebenfalls ein frequenzverdoppelter Nd-YAG-Laser (GCL-50-L, Crystalaser), jedoch nur mit 50 mW sowie ein Helium-Neon-Laser (Uniphase) mit lediglich 10 mW bei 633 nm.

Alle drei Laser passieren jeweils einen Filter zur Aufreinigung der emittierten Laserlinie (jeweils Chroma D490/20x für 491 nm, D540/20m für 532 nm und HQ635/10x für 637 nm) sowie die jeweilige Verschußblende V (LS6ZM2, UniblitZ). Die Verwendung eines Anregungsfilters ist insbesondere für den Diodenlaser mit 637 nm Wellenlänge unerläßlich, da er ein extrem schlechtes, weil breites Spektrum aufweist mit substantiellen Anteilen bis hinab zu 580 nm, was laut Hersteller aber innerhalb der Fertigungstoleranzen liegt. Da alle drei Laser über völlig unterschiedliche Strahlprofile sowie Durchmesser verfügen, müssen die Strahlen jeweils über galileische Teleskope (T_1 u. T_3 : $2\times$, $f = -50$ mm und 100 mm, T_2 : $1.5\times$, $f = -50$ mm und 75 mm) aufgeweitet und kollimiert werden. Der Strahlendurchmesser beträgt nach der Aufweitung einheitlich 1 mm. Anschließend werden die Strahlengänge mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln DCS_1 (Z532RDC, Chroma) bzw. DCS_2 (Z488RDC, Chroma) räumlich überlagert.

▪ **Blendensteuerung**

Mit Hilfe der Verschußblenden ist es möglich, die einzelnen Laser individuell ein- bzw. auszuschalten, sowie zwei der drei Laser in einer programmierbaren Sequenz zu betreiben. Hierzu wurde eine Steuerung entwickelt, die entweder im einfachsten Fall die Laserlinien in einer alternierenden Sequenz schaltet oder auch vordefinierte Alternativen zuläßt. So kann die Wiederholrate einer der beiden Laser um Potenzen von zwei gedrosselt werden, d.h. es sind Sequenzen von $2^0 = 1$, also Laser1-Laser2-Laser1 über $2^1 = 2$ (Laser1-Laser1-Laser2-Laser1) bis hin zu $2^9 = 512$ möglich. Aufeinanderfolgende Abschnitte des Shutters für Laser1 bewirken kein zwischenzeitliches Schließen, er bleibt durchgehend geöffnet. Dies wirkt sich vorteilhaft aus, wenn zum Beispiel Systeme mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen untersucht werden, bei denen einer wesentlich geringere Stabilität aufweist und leicht photoinduziert zerstört werden kann. Zum anderen wäre denkbar, daß während einer Messung nur der Standort bzw. die Anwesenheit eines Farbstoffs nachgewiesen werden muß, nicht aber etwaige Schwankungen in seiner Fluoreszenz.

Darüber hinaus bietet eine Sequenz, die nicht alternierend ist, auch Vorteile in zeitaufgelösten Messungen. Da die Verschußblenden laut Hersteller über eine Latenzzeit von etwa 1.7 ms zum Öffnen und 0.8 ms zum Schließen verfügen, während das minimale Intervall in der offenen Stellung weitere 0.8 ms beträgt, könnten die Shutter zwar theoretisch mit einer Frequenz um 300 Hz angesteuert werden. Aufgrund der immensen Wärmeentwicklung gibt der Hersteller jedoch nur eine maximale Frequenz von 150 Hz im Pulsbetrieb und 20 Hz im Dauerbetrieb an. Die Spezifikationen für den Pulsbetrieb erlauben aber nur Auf-

nahmen von höchstens vier Sekunden, was weit unterhalb des minimal erforderlichen Zeitraums von etwa 200 Sekunden liegt, da ansonsten thermisch bedingte Aussetzer auftreten. Außerdem würde eine Integrationszeit der Kamera von beispielsweise 10 Millisekunden nur eine effektive Belichtungszeit von 7.5 ms zur Folge haben, da andernfalls die Beleuchtung durch Laserlicht der jeweils anderen Wellenlänge mit aufgezeichnet würde, zumal die Verschlussblende noch nicht vollständig geschlossen wäre. Das wiederum bedeutet, daß zu 25 % der Integrationszeit kein eigentliches Signal, sondern nur Rauschen aufgezeichnet werden kann, da keine Anregung stattfindet. Die Alternative wäre, daß der Integrationsprozeß der Kamera die Latenzzeiten berücksichtigt, was aber zu einer höheren effektiven Zeit der Anregung der Probe führt. Würde man statt dessen eine nicht-alternierende Sequenz wählen, könnte ein Shutter für beispielsweise zwei Abschnitte durchgehend geöffnet bleiben, was durch die sehr geringe Latenzzeit der Kamera gerechtfertigt werden kann, während die jeweils andere Verschlussblende effektiv mit der halben Frequenz angesteuert würde. Damit würde man unter geringem Informationsverlust mit relativ simplen Mitteln Integrationszeiten von 40 Hz erreichen, ohne die Shutter mechanisch oder thermisch zu überlasten. Bedenkt man die minimale Integrationszeit der Kamera, die bei Ausnutzung aller Pixel bei knapp 30 Millisekunden liegt, wäre dies mehr als ausreichend.

Die Verschlussblenden werden über die Kamera selbst gesteuert, die ein Startsignal (TTL-Trigger) synchron mit dem Beginn der Integration an einen Verteiler sendet, der die Abfolge der Shuttersequenz bestimmt. Dieser Verteiler wiederum liefert ein Signal an die jeweilige Shuttersteuerung, die als Spannungsquelle dient und den Shutter mit Strom versorgt.

▪ **Fokussierung**

Nur für die Justage bzw. zur Fokussierung nach dem Einbau einer Meßkammer werden die beiden kinematisch gelagerten Spiegel KS_1 sowie $KDCS_1$ (Z532RDC) benötigt, die eine Beleuchtung der Oberfläche des Objektträgers von hinten durch das Objektiv ermöglichen. Zur Fokussierung kann die Probenkammer mit Hilfe des Mikrometertischs XYZ (MDE122, Elliot Scientific) in Richtung der optischen Achse (hier: y-Achse) verschoben werden. Hierzu wird eine Verstellschraube (MDE216, Elliot Scientific) mit einer Sensitivität von nur 20 nm bei zwei Millimetern Verstellweg verwendet.

▪ **Experimentalstrahl**

Nach der Fokussierung können die beiden kinematischen Spiegel wieder entfernt werden, wobei der dichroitische Spiegel $KDCS_1$ optional auch beibehalten werden kann. Zwar werden 3 - 5 % des Signals im Transmissionsbereich der verwendeten Fluorophore absorbiert, dafür kann gleichzeitig der Bildausschnitt auf der Video-CCD-Kamera bei Durchlicht betrachtet werden. Das ist hilfreich, wenn Fluoreszenz-Messungen kombiniert werden mit nicht-fluoreszierenden Objekten wie beispielsweise Polystyrol-Kugeln. Dazu kann optional eine glasfaser-gekoppelte Weißlichtquelle WL (OSL1-EC, Thorlabs) unter Verwendung geeigneter Filter zur Abschwächung auf die Probe gerichtet werden.

Der Strahlengang passiert im Meßbetrieb als nächstes die beiden zylindrischen Linsen ZL_1 (plan-konvex, LJ1703L1, $f = 75$ mm, Thorlabs) und ZL_2 (plan-konkav, $f = -300$ mm, Thorlabs), die den Strahl anamorph aufweiten. Es stellte sich nämlich heraus, daß beim Fokussieren des Laserstrahls auf das Prisma bzw. die Probe der im Idealfall fokussierte Punkt entlang einer Dimension gestreckt wird, was die Ausleuchtung der Probe elliptisch erscheinen läßt. Die Kombination der zylindrischen Linsen wirkt dem durch eine Streckung des Laserstrahls senkrecht dazu entgegen.

Der Strahl wird zuletzt mit der Linse L_1 ($f = 75$ mm) auf die Probenkammer fokussiert, sodaß die detektierte Abbildung der Oberfläche vollständig ausgeleuchtet wird. Da die Intensität des Laserstrahls gaußförmig verteilt ist, kann keine homogene Beleuchtung erfolgen, wenn der Strahl maximal fokussiert wird. Daher wird die Linse soweit vom Brennpunkt entfernt, bis eine homogen verteilte Intensität über die gesamte Abbildung erzielt wird, was in der Praxis einige Millimeter bedeuten. Das heißt aber auch, daß der eigentlich beleuchtete Bereich leicht größer ist als der beobachtete. Jedoch ist dies in soweit vernachlässigbar, da die Probenkammer variabel verschoben werden kann und man dementsprechend noch völlig unbeleuchtete Abschnitte auswählen kann.

Der Strahlengang muß an dieser Stelle durch die beiden Spiegel vor Linse L_1 möglichst flach in Richtung Probenkammer gelenkt werden, um einen möglichst hohen kritischen Winkel zur Erzeugung der totalen internen Reflexion zu erreichen.

4.2. Meßkammer

4.2.1. Strahlengang und kritischer Winkel

Die Einkopplung des Laserstrahls erfolgt über ein auf dem Objektträger montiertes Prisma (PS991, Thorlabs), in das auch der reflektierte Strahl wieder eingekoppelt wird. Dies ist notwendig, da bei direktem Einfall des Laserstrahls auf das Quarzglas das Licht zuerst zum Lot hin gebrochen wird, der Winkel dementsprechend stark abnimmt und somit unter den kritischen Winkel fällt. Außerdem wird das totalreflektierte Licht vollständig wieder aufgenommen und streut nicht an der Grenzfläche des Objektträgers, was einen diffusen und hohen Hintergrund erzeugen würde.

Das Prisma besteht aus dem Material BK7 mit einem Brechungsindex von 1.52, wobei die zum Strahl gerichtete Seite in einem Winkel $\alpha = 45^\circ$ zum Lot steht. Der effektive Einfallswinkel θ beträgt also 30° , wenn der ursprüngliche Winkel $\varepsilon = 15^\circ$ zur Meßkammer bzw. 75° zum Lot beträgt. Damit verkleinert sich der Winkel φ im Prisma auf 19.2° , wodurch der Strahl mit einem Einfallswinkel $\sigma = 64.2^\circ$ auf den Objektträger aus Quarzglas (Index: 1.46)

fällt. Dadurch steigt der Winkel ρ des erneut gebrochenen Strahls wieder auf 69.6° . Beim letzten Übergang auf das wäßrige Medium sinkt der Brechungsindex nochmals auf 1.33, weshalb bei gegebenem Winkel $\rho = \psi = 69.6^\circ$ dort die totale interne Reflexion auftritt. Die Abb. 16 verdeutlicht noch einmal den Strahlengang sowie die auftretenden Winkel.

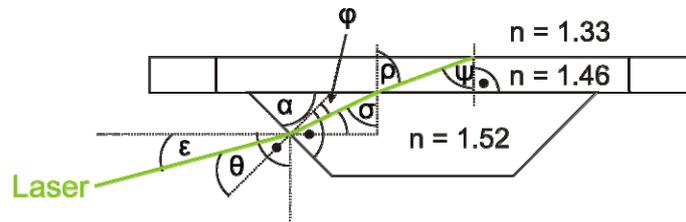


Abb. 16: Darstellung des Strahlengangs und des Einfallswinkels beim Prisma.

Der Strahl verläuft mit einem Winkel ϵ von 15° in Richtung Glasoberfläche bzw. 75° zum Lot. Die Prismenoberfläche steht 45° (α) zur Oberfläche der Meßkammer. Der effektive Einfallswinkel θ auf das Prisma ist 30° . Durch den Übergang auf den Brechungsindex $n = 1.52$ wird der Winkel auf 19.2° (φ) verkleinert. Der Einfallswinkel auf die Quarzglas-Oberfläche ist dann $\sigma = 64.2^\circ$. Der Brechungsindex wechselt von 1.52 auf 1.46 und verändert den Winkel ρ bzw. ψ auf 69.6° .

4.2.2. Probenkammer

Der Probenraum entsteht durch eine Sandwich-Bauweise aus einem Quarzglas-Objektträger (75 x 25 mm, G. Finkenbeiner bzw. H. Baumbach), einem Stück zurechtgeschnittenem Nescofilm, der später einen Kanal (50 x 3 mm) bzw. den eigentlichen Probenraum bildet und einem Deckglas (24 x 60 mm, Dicke #1, Marienfeld). Die Abb. 17 verdeutlicht die Bauweise.

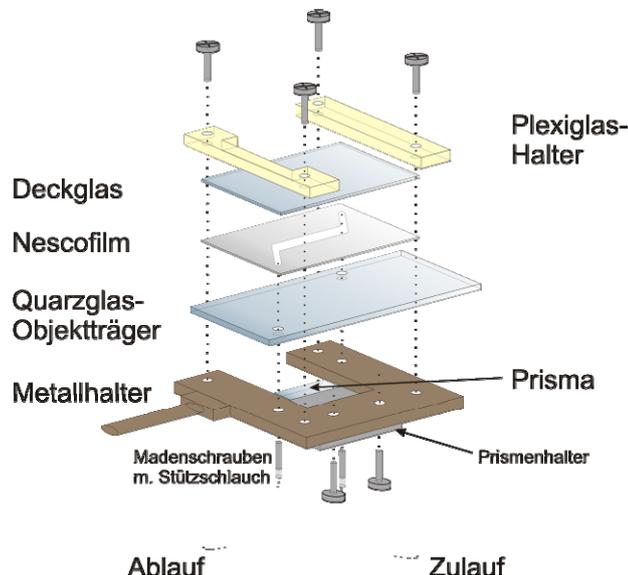


Abb. 17: Schematischer Aufbau der Probenkammer.

Auf einem Metallhalter wird eine Probenkammer mit Plexiglas-Haltern befestigt. Die Probenkammer entsteht durch Sandwich-Bauweise aus einem durchbohrten Quarzglas-Objektträger, einem ausgeschnittenen Stück Nescofilm und einem Deckglas. Von der gegenüberliegenden Seite wird ein Prisma auf einem Halter mit Klebstoff befestigt und montiert. Zu- und Ablaufschläuche werden über Madenschrauben in die Bohrlöcher angebracht.

Alternativ dazu hätte auch ein Quarzglas-Prisma verwendet werden können, an dem direkt der Nescofilm und das Deckglas angebracht worden wären. Die Spezialanfertigung der Prismen wäre jedoch weitaus kostenintensiver und mit wesentlich mehr Aufwand für deren Reinigung verbunden gewesen, wenn sie hätten wiederverwendet werden sollen. Ein Objektträger hingegen kann bei Bedarf oder auch regelmäßig relativ kostengünstig ersetzt werden. Obendrein muß bei der Justage des Einfallswinkels genauer vorgegangen werden, da nur ein Wechsel des Brechungsindex auftritt und dieser den kritischen Winkel vorgibt.

Die Herausforderung dabei besteht in beiden Fällen darin, den Abstand der beiden Glasplatten so gering wie möglich zu halten. Zum einen sollte ein möglichst geringes Volumen entstehen, zum anderen muß der Arbeitsabstand des Objektivs eingehalten werden, der sich zwischen 0.13 und 0.19 mm variieren läßt. Ein Deckglas alleine weist bereits eine Dicke zwischen 0.13 und 0.16 mm auf, während Nescofilm etwa 0.12 mm dick ist. Durch Aufheizen und Zusammendrücken der beiden Glasplatten wird der dazwischen liegende Nescofilm weich und viskos und kann so bis auf 100 µm zusammengepreßt werden. Beim Abkühlen härtet der Film wieder, verbindet beide Glasplatten und dichtet den Probenraum nach außen hin ab. Zuvor muß der Objektträger an zwei Stellen durchbohrt werden (\varnothing : 0.75 mm), um den Probenraum später befüllen zu können.

Die Meßkammer wird in eine speziell angefertigte Halterung eingespannt und mit zwei Streben aus Plexiglas arretiert. Die Bohrlöcher im Objektträger sind genau auf entsprechende Gewindebohrungen im Halter eingepaßt, damit von der gegenüberliegenden Seite Zu- und Ablaufschläuche montiert werden können, indem sie über zuvor ausgehöhlte Madenschrauben in die Halterung geschraubt werden. Wegen ihres geringen Innendurchmessers benötigen die Schläuche (Innen- \varnothing : 0.58 mm, Außen- \varnothing : 0.96 mm, SIMS Portex) jedoch übergestülpte Stützschräume (Innen- \varnothing : 0.8 mm, Außen- \varnothing : 2.4 mm, Saint-Gobain Verneret) zur Stabilisierung in den Schrauben und zur Abdichtung der Bohrungen. Von der gleichen Seite wird auch das Prisma zur Erzeugung des kritischen Winkels auf den Halter montiert. Hierzu wird das Prisma auf seine Halterung geklebt und auf Höhe des Probenkanals im Nescofilm mit der Halterung der Meßkammer verschraubt. Um einen nahtlosen Übergang des Laserstrahls vom Prisma zum Objektträger zu gewährleisten, wird Immersionsöl verwendet, das einen zum Prisma identischen Brechungsindex (n : 1.52) aufweist.

4.2.3. Reinigung und Beschichtung der Oberfläche

Vor der Beschichtung der Quarzglas-Oberflächen zur spezifischen Immobilisierung der Probenmoleküle muß zuerst eine überaus gründliche Reinigung erfolgen. Unglücklicherweise existieren hierzu beinahe ebenso viele Protokolle wie es Arbeitsgruppen gibt, die auf Einzelmolekülebene Messungen durchführen. Es wird für die Arbeit eine Prozedur durchgeführt, die einen extremen Reinheitsgrad der Oberflächen gewährleistet und damit auch

fluoreszente Verunreinigungen aus vorangegangenen Messungen beseitigt. Somit können Oberflächen mehrmals wiederverwendet werden, ohne sie irreversibel anzugreifen und damit zu zerstören.

Die Beschichtung der Oberflächen hat zweierlei Nutzen. Zum einen können die zu untersuchenden Probenmoleküle spezifisch immobilisiert werden. Sie befinden sich damit automatisch innerhalb des evaneszenten Feldes, das durch Anregung erzeugt wird. Zum anderen dient sie der Passivierung und des Abblockens unerwünschter nicht-spezifischer Bindungen von zugegeben Molekülen wie beispielsweise Proteinen.

Seit einigen Jahren hat sich hierbei die Verwendung langkettiger Polyethylenglycol- bzw. Polyethenoxid-Ketten durchgesetzt, die aufgrund ihrer neutralen Ladung, ihres hydrophoben Charakters und auftretender sterischer Abstoßung in der Lage sind, die Bindung von Proteinen an Oberflächen zu verhindern[179]. Dieselbe Vorgehensweise soll auch hier praktiziert werden. Zuvor müssen die Quarzglas-Oberflächen aber noch für die spezifische Bindung des Polyethylenglycol (PEG) durch eine Silanisierung modifiziert werden. Zusammenfassend und schematisch erklärt Abb. 18 den Ablauf.

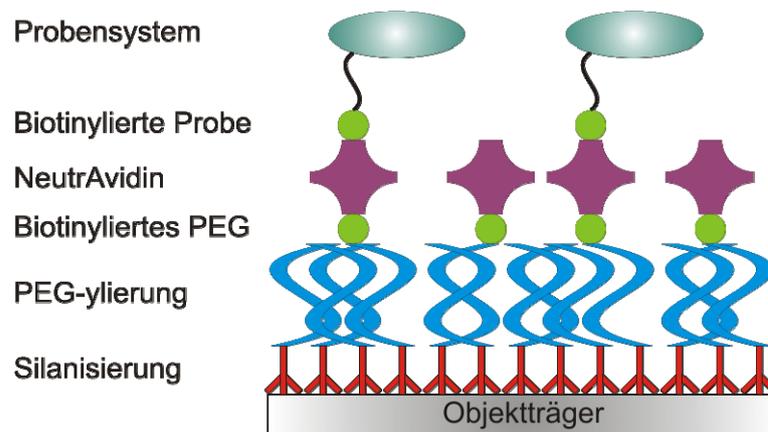


Abb. 18: Schematische Darstellung der Oberflächen-Beschichtung.

Auf den silanisierten Objekträger wird kovalent PEG gebunden. Teilweise heterofunktionalisiertes PEG mit Biotin-Gruppen bindet NeutrAvidin. Die zu untersuchende Probe ist selbst biotinyliert und bindet an das NeutrAvidin.

Die Silanisierung erfolgt über eine Kondensationsreaktion mit einem Amin-funktionalisierten Silan in wasserfreiem Medium, an welches speziell mit einer N-Hydroxysuccinimid-Gruppe modifiziertes, kommerziell erhältliches PEG analog zur Proteinmodifikation gebunden wird. Bei der sogenannten PEGylierung wird zu einem geringen Prozentsatz (1 – 2 %) auch bifunktionalisiertes PEG zugefügt, das darüber hinaus eine Biotin-Gruppe trägt. Die Ketten des PEG legen sich ungleich der schematischen Darstellung zufällig verteilt auf die Oberfläche. Dabei ist zu beachten, daß eine gewisse Dichte gewährleistet wird, um eine unspezifische Proteinbindung ausreichend zu minimieren[179]. Auf die Biotin-funktionalisierte Oberfläche wird Avidin bzw. NeutrAvidin gebunden, welches aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität einen stabilen und mit biochemischen Applikatio-

nen kompatiblen Ankerpunkt darstellt. Seinerseits binden daran wiederum die mit Biotin-Gruppen modifizierten Proben- oder DNS-Moleküle und werden dadurch immobilisiert. Durch die starke Anbindung der Probe ist es möglich, Pufferwechsel durchzuführen bzw. Reaktanden einzuleiten, ohne die Probe dabei von der Oberfläche abzulösen.

4.2.4. Probenpositionierung und Befüllung

Die Halterung kann anschließend mit Hilfe einer Stange auf dem Mikrometer-Tisch befestigt werden. Dieser läßt sich mit Hilfe zweier Motoren (ZST13B, Thorlabs) in beiden senkrecht zur optischen Achse verlaufenden Richtungen verstellen. Die Motoren können wahlweise manuell über eine Steuereinheit oder computergestützt verfahren werden. Dies erfolgt schrittweise über eine Distanz von 2 mm mit einer minimalen Schrittweite von etwa 50 nm und einer maximalen Geschwindigkeit von 0.5 mm/s. Parallel zur optischen Achse wird, wie zuvor angesprochen, über eine manuelle Verstellerschraube fokussiert, die eine absolut stufenlose und vor allem direkte Einstellung ermöglicht. Mit Hilfe der Motoren kann indes die Meßkammer nach einem vordefinierten Muster verfahren werden, um gezielt noch nicht beleuchtete Bereiche auswählen zu können. Die drei Achsen des Mikrometer-Tisches verlaufen völlig unabhängig voneinander, wodurch eine präzise Verschiebung in nur eine Raumrichtung gewährleistet wird.

Eine Schwierigkeit im Einbau der Halterung zeigt sich jedoch in der nötigen Refokussierung nach dem Verfahren der Probenkammer zu noch unbeleuchteten Bereichen. Aufgrund der Bauweise des Mikroskops konnte kein kommerziell erhältlicher Probentisch oder eine Plattform verwendet werden mit der die Meßkammer hätte bewegt werden können. Daher muß beim Einsetzen jeder neuen Halterung darauf geachtet werden, daß die Ausrichtung der Achsen jeweils senkrecht zur optischen Achse verläuft. Üblicherweise können bis zu zehn aufeinanderfolgende Bildausschnitte bzw. Oberflächenbereiche ohne neue Fokussierung betrachtet werden. Dies ist um so wichtiger, wenn wenig photostabile und damit schnell bleichende Farbstoffe betrachtet werden sollen.

Das Befüllen der Kammer kann entweder per Hand und Gravitation geschehen oder über eine im Aufbau integrierte Spritzenpumpe (PHD 22/2000, Harvard Apparatus). Die Pumpe wird im Saugmodus betrieben, da beim Pumpen die Gefahr einer Undichtigkeit der Meßkammer größer ist. Für Zu- und Ablauf werden Schläuche mit sehr geringem Innendurchmesser (0.58 mm, SIMS Portex) verwendet, um die Totvolumina (jeweils 60 - 80 µl) so gering wie möglich zu halten. Spülvorgänge der Kammer können dadurch bei sehr niedrigem Verbrauch an Puffer durchgeführt werden. Die Latenzzeit eines Pumpvorgangs kann zudem aufgrund der sehr geringen Schlauchlänge von maximal 15 cm minimal gehalten werden, wobei lediglich das Volumen des Zulaufschlauchs zur Wartezeit beiträgt.

4.3. Fluoreszenzdetektion

4.3.1. Abbildung der Oberfläche

Das Fluoreszenzsignal wird von einem Objektiv O (CFI Plan Apo VC60WI, Nikon) mit 60-facher Vergrößerung gesammelt und zur Detektion weitergeleitet. Das Objektiv ist speziell angepaßt, da es über einen weiten Wellenlängenbereich (405 - 660 nm) achromatisch arbeitet. Anfangs wurden auch Experimente mit einem älteren Vorgängermodell (CFI Plan Apo 60WI, Nikon) durchgeführt, das jedoch nicht hinreichend chromatisch korrigiert war. Die numerische Apertur beträgt 1.2, um möglichst viel der Fluoreszenz einfangen zu können. Als Immersionsmedium wird Wasser und nicht Öl verwendet, da bei vergleichbaren Arbeitsabständen weniger oder keine sphärischen Abberationen auftreten. Zwar sinkt die numerische Apertur von 1.4 auf 1.2, andererseits werden weder spezielle, kostenintensive Deckgläser mit hohem Brechungsindex benötigt noch birgt Wasser die Gefahr der Autofluoreszenz.

Mit Hilfe eines Rändelrads am Objektiv läßt sich die Arbeitstiefe auf visuellem Weg fein einstellen, die von den verwendeten Deckgläsern sowie der Präparation der Meßkammern selbst abhängt, die durch das Zusammenpressen einer gewissen Toleranz in Hinsicht auf deren Dicke unterliegen. Nach dem Austritt aus der hinteren Apertur des Objektivs verläuft der weitere Strahlengang unter einer speziell angefertigten Abdeckung, die unerwünschtes Restlicht von der Detektion fernhält, zu erkennen in der Abbildung (Abb. 16) an der gestrichelten schwarzen Linie. Sämtliche folgenden optischen Bauteile befinden sich innerhalb dieser Box bis auf die EM-CCD-Kamera selbst, die nahtlos an diese Box anschließt. Es führt dazu ein Verbindungsstück aus dem Inneren der Box an die Kamera heran und fungiert gleichzeitig als ihre Halterung.

Das Fluoreszenzlicht wird durch die Linse L_2 ($f = 200$ mm), auch Tubuslinse genannt, fokussiert, deren Brennpunkt in der hinteren fokalen Ebene des Objektivs positioniert wird. Im folgenden wird der Strahl in der Bildebene durch eine rechteckige Blende beschnitten, da er bis hier eine zirkuläre Form hat und über eine Blende den Dimensionen des CCD-Chips der Kamera angepaßt werden muß. Darüber hinaus erlaubt die Blende im weiteren Verlauf, einen Teil des Strahls komplett zu blockieren und so den entsprechenden Teil der Kamera unbeleuchtet zu belassen. Somit kann diese ungenutzte Fläche zur gleichzeitigen Detektion eines anderen Spektralbereichs verwendet werden. Die Blende selbst verfügt über Feingewinde zur Positionierung des Spalts in der Bildebene.

Nach der Blende dient zunächst Linse L_3 ($f = 100$ mm) zur erneuten Kollimation, worauf das Fluoreszenzsignal durch einen kinematisch gelagerten dichroitischen Spiegel (645DCXR, Chroma) in zwei spektrale Bereiche aufgeteilt wird.

Alle Wellenlängen unterhalb 650 nm werden reflektiert und auf eine Seite des Kamera-chips gelenkt. Der übrige Anteil des Spektrums wird transmittiert und fällt ebenfalls auf die EM-CCD-Kamera, aber räumlich getrennt daneben. Dieser Spiegel läßt sich je nach Applikation einfach durch andere dichroitische Spiegel ersetzen oder auch vollständig entfernen, wenn das gesamte Spektrum von Interesse sein sollte.

Als nächstes werden die Strahlen durch Bandpaßfilter auf den zu untersuchenden Spektralbereich begrenzt und so von gestreutem Anregungslicht gefiltert, wozu an dieser Stelle je ein Filterrad (FR₁ u. FR₂) mit bis zu sechs verschiedenen Filtern eingebaut ist. Für die Messungen mit SSO1653 und Rad26 kamen hier zwei Bandpaßfilter von 550 - 610 nm (550-610, 3RD Millennium) sowie von 660 - 760 nm (660-760, 3RD Millennium) zum Einsatz. Für die Abbildung auf die Kamera wurde die letzte Linse L₄ (f = 200 mm) genutzt, die in Verbindung mit Linse L₃ ein keplersches Teleskop bildet und zu einer Vergrößerung der Abbildung um den Faktor zwei führt. Zusammen mit der Vergrößerung des Objektivs ergibt sich also eine 120-fach vergrößerte Abbildung der Oberfläche, da eine wie vom Hersteller des Objektivs empfohlene Brennweite der Tubuslinse eingesetzt wird. Wie im weiteren Verlauf beschrieben wird, wiesen die EM-CCD-Kameras jeweils Pixel der Kantenlänge 16 µm auf. Daraus ergibt sich bei gegebener Vergrößerung eine effektive Pixelgröße von 133.3 nm, was experimentell mit einem Testmuster nachgewiesen werden konnte. Durch die spektrale Aufteilung des Signals und dem dafür notwendigen Blocken des Strahls halbiert sich die betrachtete Fläche in einer Dimension, was zu einer effektiven Abbildung von etwa 70 x 35 µm² führt.

4.3.2. Detektionssystem

Zur Detektion wurde eine EM-CCD-Kamera (DU897-BV, Andor) eingesetzt, die ebenfalls im Laufe dieser Arbeit ein älteres Modell (DU887-BV, Andor) ersetzte. Ausschlaggebend für diesen Umbau waren das um 10 °C verbesserte Kühlvermögen des Kamera-Chips auf -85 °C, eine linear verlaufende Verstärkung sowie die optionale Kombination mit einem akustisch-optisch-einstellbaren Filter (AOTF). Grundsätzlich unterscheiden sich diese Elektronen-verstärkenden Kameras von anderen CCD-Kameras in ihrer ultrasensitiven Detektion, die sogar in der Lage ist, einzelne Photonen zu registrieren. Dazu bedient sich diese Art der CCD-Kameras des gleichen Grundprinzips, daß Photonen beim Auftreffen auf einen Halbleiter Elektronen freisetzen, worauf diese Ladungen rasterartig Zeile für Zeile in ein Ausleseregister verschoben werden, um im letzten Schritt digitalisiert zu werden. Im Anschluß an dieses Register wird, ungleich herkömmlicher Kameras, eine Hochspannung (≈ 40 - 60 V) angelegt, die zu einer lawinenartigen Vervielfachung der Einzelladungen führt. Dieser stochastisch ablaufende Prozeß erzeugt zwar selbst Rauschen, dafür übersteigt dieses verstärkte Signal nun das wesentlich größere intrinsische Rauschen des eingebauten

Vorverstärkers, selbst bei einem ehemals schwachen Signal hervorgerufen durch einzelne Photonen. Hier kann beim aktuelleren Kamera-Modell eine lineare Verstärkung (gain-factor) zwischen zwei und 300 zugeschaltet werden, während in der älteren Ausführung noch ein Verlauf auftrat, der mathematisch durch eine exponentielle Funktion angenähert werden mußte. Dies machte auch weitergehende Berechnungen wie gemessene Photonen-zahl ohne zuvor genau bestimmten Verstärkungsfaktor unmöglich, was bei der neuen Kamera komfortabel direkt einstellbar ist und außerdem temperaturunabhängig verläuft. Hier wurde ein Wert von 225 für die neue bzw. 200 bei der alten Kamera gewählt, der in beiden Fällen zu einer Verstärkung um den Faktor 200 führt. Bei der Linearisierung der neuen Kamera wurde scheinbar kein 1:1 Verhältnis zwischen Verstärkung und gewähltem Parameter eingebaut, sondern eine leicht geringere Steigung, während beim Vorgängermodell nur rein zufällig die beiden Werte identisch sind. Der Maximalwert von 300 bzw. 255 wurde nicht gewählt, da nur der dynamische Bereich weiter eingeschränkt worden wäre ohne zusätzlichen Gewinn durch die Elektronen-Verstärkung.

Obwohl aufgrund der Erzeugung der Elektronenlawine das Rauschen des Vorverstärkers nicht mehr ausschlaggebend ist, existieren dennoch weitere Faktoren, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis negativ beeinflussen können, insbesondere das Auftreten von Elektronen, die nicht durch Auftreffen eines Photons auf die Kamera verursacht wurden, allen voran thermisch erzeugte Elektronen. Auch sie würden durch die Technik der Elektronen-Verstärkung ein meßbares Signal hervorrufen, weshalb die Kamera mittels Peltier-Elements auf ultra-niedrige Temperaturen gekühlt werden muß. Hier spielt die neue Kamera ebenfalls ihre Vorteile aus, indem sie den Chip bei gleichen Umgebungsbedingungen 10° C niedriger auf -85° C kühlen kann. Für einen stabilen Temperaturwert ist auch hier eine Luftkühlung durch einen Ventilator vollkommen ausreichend, weshalb nie der aufwendige Umbau für eine Wasserkühlung in Betracht gezogen wurde.

Eine weitere Ursache, die das Rauschen verändern könnte, ist die Ausleserate der Kamera. Dazu lassen sich sowohl die Geschwindigkeiten der Parallelverschiebung in Richtung des Registers (vertical shift speed) wie auch dessen sequentielles Auslesen (horizontal readout rate) verändern. Generell gilt bei letzterem, je höher die gewünschte Ausleserate gewählt wird, desto höher wird auch das dabei auftretende Rauschen. Die Parallelverschiebung dagegen ist in ihrem Einfluß auf das Rauschen komplizierter zu beurteilen. Auf der einen Seite reduziert eine möglichst schnelle Verschiebung der Ladung, die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung von Sekundärelektronen (clock induced charge), die dann als Intensitätsspitzen auftreten würden. Auf der anderen Seite deuteten bereits die Daten des Herstellers darauf hin, daß diese Art des Rauschens nur bei extrem hohen Verstärkungsfaktoren (Hersteller: 1000 x) im Zusammenhang mit Einzelphotonzählung tatsächlich zum Problem werden könnten, was die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Messungen nur bestätigten. Zudem verringert sich die Effizienz des Ladungstransfers, was sich in einem

„Verschmieren“ des Signals über mehrere Pixel in Richtung des Registers äußert. Dem kann zwar mit einer Erhöhung der Spannungsamplitude (vertical clock voltage amplitude) entgegengesteuert werden, was aber letzten Endes kontraproduktiv wirkt, da hier erneut Sekundärelektronen erzeugt werden können. Darüber hinaus verringert sich auch der dynamische Bereich, weshalb der Parameter auf dem voreingestellten Wert (3.3 μ s) belassen wurde. Auf die Auslesegeschwindigkeit hätte eine Änderung ohnehin nur bei extrem kleinen Integrationszeiten unter 10 Millisekunden Einfluß ausgeübt.

Die Auslesegeschwindigkeit des Registers zeigt dagegen weit mehr Einfluß auf die Qualität der Messung. Es kann zwischen zwei unterschiedlichen Analog-Digital-Wandlern ausgewählt werden, die über vier verschiedene Datenraten verfügen. Da sämtliche Messungen mit Integrationszeiten von 100 Millisekunden und länger durchgeführt wurden, wurde der A/D-Wandler mit 3 MHz ausgewählt, zumal die Alternativen mit 1 MHz nur Belichtungszeiten von 200 Millisekunden und länger erlauben, während 5 und 10 MHz erstens höheres intrinsisches Rauschen aufweisen und zweitens bei der älteren Kamera nicht über die gleiche Sensitivität verfügten. Bei 3 MHz konnte nämlich der Vorverstärkungsfaktor (pre-amplifier gain), im Prinzip die Angabe der Empfindlichkeit, auf einen beinahe doppelt so hohen Wert (4.6) gestellt werden als er bei den höheren Datenraten (jeweils 2.4) zur Verfügung stand. Damit wird zwar ebenfalls auf Kosten der Dynamik die Sensitivität erhöht, andererseits führt dies nicht wie bei der Elektronen-Verstärkung zu einem zusätzlich verursachten Rauschen. Somit kann sowohl eine für die Messungen mehr als ausreichende Integrationszeit gewählt werden, gleichzeitig aber auch das Rauschen auf einem Minimum gehalten werden.

Die Blenden werden wie vorher beschrieben über die Kamera selbst betrieben, indem sie synchron mit dem Start jeder neuen Belichtungsphase über einen Ausgang (fire) einen Impuls an einen Verteiler zur Ansteuerung der Shutter sendet.

4.4. Anwendungsbereiche des Aufbaus

Neben dem erfolgreichen Einsatz im Rahmen dieser Arbeit konnte der Aufbau noch für weitere Messungen und Untersuchungen verwendet werden. Dazu gehört im besonderen die Aufklärung des Wegs der entstehenden m-RNS aus der Struktur der RNS-Polymerase II [2]. Dafür wurden ähnlich wie in dieser Arbeit Einzelmolekül-FRET-Messungen durchgeführt, die das Ziel hatten, die bis dahin noch unbekanntes Aufenthaltsort der m-RNS im Elongationskomplex herauszufinden. Dazu wurden die Distanzen des fluoreszenzmarkierten 5'-Endes von verschiedenen langen RNS-Strängen zu drei bekannten Positionen im Komplex bestimmt und mit Hilfe einer Triangulationsmethode aus diesen Abständen der wahr-

scheinlichste Punkt für das Ende der jeweiligen RNS errechnet. Mit der erfolgreichen Bestimmung der endständigen Basen der RNS konnte ein früher postulierter Weg in Form eines Tunnels endgültig bestätigt werden. Darüber hinaus lieferten die Untersuchungen erstmals Informationen über mögliche Interaktionspunkte der RNS mit der RNS-Polymerase II selbst. So ist es langen RNS-Strängen (26 Basen und 29 Basen) möglich, an die sogenannte Dockdomäne zu binden, was möglicherweise die Anbindung des Co-Faktors TFIIB während der Elongation verhindert. Für noch längere Konstrukte der RNS wurde eine Bindung an die C-terminale Domäne (C-terminal domain CTD) der sich wiederholenden Sequenzmotive festgestellt, an der für gewöhnlich Enzyme für den Abschluß des 5'-Endes der RNS oder andere RNS verarbeitende Enzyme binden.

Außerdem wurde diese eben erwähnte Methode der Triangulation unter Verwendung von Meßergebnissen verfeinert, die mit Hilfe des hier beschriebenen Aufbaus erzielt wurden[180]. Dazu wurde eine wahrscheinlichkeitstheoretische Methode entwickelt, die Ergebnisse aus Einzelmolekül-FRET-Messungen mit Daten aus der Röntgenstrukturanalyse kombiniert. Daraus läßt sich sodann die wahrscheinlichste Position des Farbstoffmoleküls errechnen sowie eine drei-dimensionale Wahrscheinlichkeitsverteilung zur Veranschaulichung der experimentellen Genauigkeit. Mit dieser neuartigen Methode können Einzelmolekül-FRET-Messungen als ein quantitatives Hilfsmittel verstanden werden, um die Position und die Dynamik flexibler Domänen innerhalb makromolekularer Komplexe zu bestimmen. Die Methode wurde ebenfalls angewandt, um die Position des 5'-Endes der m-RNS beim Verlassen des Elongationskomplexes näher zu untersuchen sowie den Einfluß des Transkriptionsfaktors TFIIB darauf.

Des Weiteren fand der Aufbau Verwendung in einem dritten Experiment, bei dem der Weg der nicht-transkribierten DNS sowie die Positionen der stromaufwärts liegenden Basen bestimmt wurden. Dazu wurden abermals Einzelmolekül-Messungen, wahrscheinlichkeitstheoretische Rechnungen und kristallographische Modellierungen kombiniert. Es konnten die Bestandteile der RNS-Polymerase II identifiziert werden, mit denen die nicht-transkribierte DNS interagiert, während sie die inneren Bereiche des Proteins verläßt. Aus Vergleichsdaten ließ sich erschließen, daß der Elongationskomplex von Prokaryonten zu Eukaryonten konserviert ist und, daß die stromaufwärts liegende DNS während des Übergangs von der Initiation zur Elongation umgeordnet wird[181].

5. Datenauswertung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente produzierten umfangreiche Datenmengen, die allein aufgrund ihrer schieren Fülle eine manuelle Analyse unmöglich gemacht hätten. Dabei würde man die Art der Auswertung noch nicht einmal in Betracht ziehen, die ohne Computerunterstützung jeden erdenklichen Zeitrahmen gesprengt hätte.

Die hierzu verwendeten Analyseprogramme automatisierten jedoch nicht sämtliche Vorgänge. Auf dieser Basis wurden jedoch weitergehende Entwicklungen unternommen, die den gesamten Auswertungsprozeß automatisieren sollten, von der Aufnahme bis zur Erstellung der endgültigen Übersicht. Hierzu folgen im Anschluß eine Übersicht der Funktionsweise der einzelnen Komponenten und die Angabe der verwendeten theoretischen Grundlagen.

5.1. Theoretischer Hintergrund zur Ensemble-Auswertung

Zu Beginn sollen die mathematischen Grundlagen erläutert werden, die zur Berechnung einer FRET-Effizienz auf Basis von Fluoreszenzspektren nötig sind. Es werden die Vorteile der gewählten Methode im Vergleich zu alternativen Herangehensweisen aufgezeigt. Zum Schluß folgt die Vorstellung des Auswerteprogramms.

Bei Ensemble-Experimenten bieten sich verschiedene Möglichkeiten, aus der Betrachtung der aufgezeichneten Fluoreszenz-Spektren die FRET-Effizienz zu bestimmen. Hauptsächlich unterscheiden sie sich darin, ob in der Frequenz- oder Zeitdomäne gemessen wird.

Erstens kann die FRET-Effizienz über Veränderungen der Quantenausbeute des Donors berechnet werden, die in Anwesenheit eines Akzeptors und bei hohem Energietransfer sinkt. Diese Methode eignet sich besonders beim Einsatz von Fluoreszenzlöschern (Quencher) als Akzeptoren, da dann nur die Fluoreszenz des Donors zu berücksichtigen ist. Die Quantenausbeuten müssen selbstverständlich bekannt sein, die je nach Umgebung des Farbstoffs und seinen Eigenschaften oft hohen Schwankungen ausgesetzt sind und zudem aufwendig bestimmt werden müssen. Außerdem müssen die Markierungseffizienzen sowohl des Donors als auch des Akzeptors gemessen werden.

Alternativ dazu kann die FRET-Effizienz aus der Verringerung der Fluoreszenz-Lebenszeit des Donors errechnet werden. Analog zur Quantenausbeute öffnen sich in Anwesenheit eines Akzeptors Wege, die die Energie schneller übertragen als sie über Photonen wieder ausgesendet werden kann. Hier werden zwar überhaupt keine Spektren benötigt, sondern nur Lebenszeitmessungen, allerdings erfordert die Methode Instrumentarium mit ausgezeichneter zeitlicher Auflösung, um geringe Unterschiede in den Fluoreszenzlebenszeiten unterscheiden zu können. Dafür bietet diese Methode den Vorteil, nicht-vollständig markierte Proben messen zu können, da bei genügend hoher Amplitude ein biexponentielles Verhalten der Fluoreszenzlebenszeiten verfolgt werden kann. Dies gilt aber nur für den Fall, daß die Lebenszeit des verwendeten Donorfarbstoffs einem monoexponentiellen Zerfall gehorcht[143].

Eine weitere experimentelle Herangehensweise ist die Änderung der Fluoreszenzanisotropie zu verfolgen, die einhergehend mit Verringerung der Fluoreszenz-Lebenszeit ebenfalls in Anwesenheit eines Akzeptors zunimmt. Aufgrund der Molekularbewegung bei Raumtemperatur sollte bei Einstrahlung polarisierten Lichts die Fluoreszenz im Normalfall depolarisiert werden und in alle Raumrichtungen gleich wahrscheinlich abgegeben werden. Findet dagegen vorzeitig eine Energieübertragung auf einen Akzeptor statt, wird um so weniger Fluoreszenz in einer anderen als der eingestrahnten Polarisation ausgestrahlt werden können. Abgesehen von dieser Einschränkung gehen diese Messungen mit der höchsten Ungenauigkeit einher, da die Orientierung der beiden Farbstoffe einen großen und zum Teil komplizierten Einfluß auf die Anisotropie zeigt.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf der Messung der Fluoreszenzzunahme des Akzeptors. Hierbei muß nur die Markierungseffizienz des Donors bekannt sein, weder die Quantenausbeuten noch die Konzentration des Akzeptors spielen eine Rolle. Die Extinktionskoeffizienten beider Farbstoffe müssen hingegen bestimmt werden.

Die mathematische Grundlage für die verwendete Auswertungsmethode lieferte *Clegg*, der darlegte, wie die beobachtete Fluoreszenz in zwei Anteile, die des Donors und die des Akzeptors, aufgespaltet werden kann[143]. Das gesamte Fluoreszenzsignal $F_{total}(v, v')$, das durch die Anregung bei einer Wellenlänge v' hervorgerufen wird und die Emission bei einer anderen Wellenlänge v beschreibt, unterliegt mehreren Prozessen. Wenn $[S_{d^+a^+}] = [S]_{d^+a^+}$ die Konzentration eines Substrates mit Donor- und Akzeptorfarbstoff definiert und gleichzeitig $[S_{d^+a^-}] = [S]_{d^+a^-}$ diejenige Konzentration für Substrat ohne Akzeptor, dann kann die gesamte Fluoreszenzemission $F_{total}(v, v')$ durch folgende Gleichung beschrieben werden.

$$F_{total}(v, v') = \underbrace{\{[S]e^D(v')\Phi^A(v)d^+a^+\}}_{F_{Em}^A(v, v')} \times E + \{[S]e^A(v')\Phi^A(v)a^+\} + \underbrace{\{[S]e^D(v')\Phi^D(v)d^+\}}_{F_{Em}^D(v, v')} \times \{[1 - E]a^+ + a^-\}$$

Gl. 15

mit S : Konzentration des untersuchten Makromoleküls

ε^D und ε^A : Extinktionskoeffizienten des Donors bzw. Akzeptors

ν : Emissionswellenlänge

ν' : Anregungswellenlänge

d^+ : Markierungseffizienz des Donors

a^+ : Markierungseffizienz des Akzeptors

a^- : kein Akzeptor vorhanden, nur Donor

Φ^D und Φ^A : Quantenausbeute des Donors bzw. Akzeptors

E : FRET-Effizienz

Hier wird erstmals deutlich, daß die Emission des Akzeptors $F_{Em}^A(\nu, \nu')$ aus mehreren zusammenhängenden Komponenten besteht, nämlich dem Energietransfer des Donors und der direkten Anregung des Akzeptors $F_{Em}^A(\nu, \nu')$ sowie dem spektralen Übersprechen des Donors (Crosstalk) $F_{Em}^D(\nu, \nu')$, was eine Bestimmung der FRET-Effizienz letztendlich davon abhängig macht, wie genau die einzelnen Bestandteile getrennt werden können. Dazu bedarf es der Aufnahme jeweils einzelner Fluoreszenz-emissions- bzw. Fluoreszenzanregungsspektren, die durch die folgenden Terme beschrieben werden.

Donor-Emissionsspektrum:

$$F_{Em}^D(\nu, \nu') = \{[S]\varepsilon^D(\nu')\Phi^D(\nu)d^+\} \times \{[1-E]a^+ + a^-\} \quad \text{Gl. 16}$$

Akzeptor-Emissionsspektrum:

$$F_{Em}^A(\nu, \nu') = \{[S]\varepsilon^D(\nu')\Phi^A(\nu)d^+a^+\} \times E + \{[S]\varepsilon^A(\nu')\Phi^A(\nu)a^+\} \quad \text{Gl. 17}$$

Donor-Anregungsspektrum:

$$F_{Ex}^D(\nu, \nu') = \{[S]\varepsilon^D(\nu')\Phi^A(\nu)d^+a^+\} \times E + \{[S]\varepsilon^D(\nu')\Phi^D(\nu)d^+\} \times \{[1-E]a^+ + a^-\} \quad \text{Gl. 18}$$

Akzeptor-Anregungsspektrum:

$$F_{Ex}^A(\nu, \nu') = \{[S]\varepsilon^A(\nu')\Phi^A(\nu)a^+\} \quad \text{Gl. 19}$$

Im ersten Schritt erfolgt die Bereinigung der Gesamtemission um den Anteil, der durch Crosstalk entstanden ist, durch einfache Subtraktion eines Spektrums einer ausschließlich Donor-markierten Probe gemäß folgender Gleichung.

$$F_{Em}^A(\nu, \nu') = F_{total}(\nu, \nu') - F_{Em}^D(\nu, \nu') \quad \text{Gl. 20}$$

Das entsprechende Spektrum muß jedoch bei Wellenlängen aufgenommen werden, bei denen der Akzeptor keinen Einfluß ausübt. Man erhält so ein Spektrum, das folgender Gleichung genügt.

$$F(\nu, \nu') = F_{Em}^A(\nu, \nu') \propto \{[S]\varepsilon^D(\nu')\Phi^A(\nu)d^+a^+\} \times E + \{[S]\varepsilon^A(\nu')\Phi^A(\nu)a^+\} \quad \text{Gl. 21}$$

Die Subtraktion ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn die Spektren unter identischen Bedingungen erzielt wurden, daher ist bei der Durchführung der FRET-Messungen darauf zu achten, daß gleiche Konzentrationen vorliegen oder diese zumindest bekannt ist, um eine Skalierung durchzuführen.

Im darauffolgenden Schritt muß die Fluoreszenzintensität normalisiert werden, um letztendlich die Gleichung unabhängig von Akzeptor-Konzentration und Quantenausbeute zu machen. Hierzu wird das folgende Verhältnis gebildet, wobei eine zweite Anregungswellenlänge ν'' gewählt wird.

$$\text{normierte Akzeptor-Emission: } \frac{F_{Em}^A(\nu_1, \nu')}{F_{Em}^A(\nu_2, \nu'')} = E \times d^+ \frac{\varepsilon^D(\nu')}{\varepsilon^A(\nu'')} + \frac{\varepsilon^A(\nu')}{\varepsilon^A(\nu'')} \quad \text{Gl. 22}$$

wenn gilt: $\varepsilon^D(\nu'')=0$ und $\nu_1 = \nu_2 = \nu$

Wird die die Anregungswellenlänge ν'' so gewählt, daß der Donor dabei nicht angeregt werden kann, so muß die Probe nicht ausschließlich mit Akzeptor markiert sein, sondern darf auch Donor enthalten. Werden die Ausdrücke $F_{Em}^A(\nu_1, \nu')$ und $F_{Em}^A(\nu_2, \nu'')$ mit den Termen für die jeweiligen Spektren ersetzt, ergibt sich folgender Ausdruck.

$$\frac{F_{Em}^A(\nu, \nu')}{F_{Em}^A(\nu, \nu'')} = \frac{\{[S]\varepsilon^D(\nu')\Phi^A(\nu)d^+a^+\} \times E + \{[S]\varepsilon^A(\nu')\Phi^A(\nu)a^+\}}{\{[S]\varepsilon^A(\nu')\Phi^A(\nu)a^+\}} \quad \text{Gl. 23}$$

Die Auflösung nach E liefert folgenden Zusammenhang.

$$E = \frac{F_{Em}^A(\nu, \nu')\varepsilon^A(\nu'')}{F_{Em}^A(\nu, \nu'')\varepsilon^D(\nu')d^+} - \frac{\varepsilon^A(\nu')}{\varepsilon^D(\nu')d^+} \quad \text{Gl. 24}$$

Neben den bereits erwähnten Vorteilen können bei dieser Methode Proben mit sehr geringer Farbstoffkonzentration gemessen werden, die für Absorptionmessungen ungeeignet wären.

$F_{Em}^A(\nu, \nu')$ beinhaltet aber weiterhin die direkte Anregung des Akzeptors durch Absorption bei der Anregungswellenlänge ν' des Donors nach folgender Gleichung.

$$F_{Em}^A(\nu, \nu') = F_{FRET}^{DA}(\nu, \nu') + F_{direkt}^{DA}(\nu, \nu') \quad \text{Gl. 25}$$

Die Gesamtemission des Akzeptors ist daher bei diesen Experimenten nicht direkt zugänglich. Da außerdem die Messung der Extinktionskoeffizienten mit Fehlern behaftet sein kann, wurde eine weitere Umformung und Vereinfachung nach *Ebright* durchgeführt[182]. Um den Crosstalk und die direkte Anregung zu eliminieren, wird zudem kein Standardspektrum vom eigentlichen Gesamtspektrum subtrahiert, sondern es werden lediglich Korrekturterme eingeführt.

Gemäß folgender Gleichung Gl. 26 setzt sich demnach die Gesamtfluoreszenz einer doppeltmarkierten Probe (DA) zusammen aus dem durch Energietransfer hervorgerufenen Anstieg der Fluoreszenz des Akzeptors, dem Crosstalk sowie der direkten Anregung des Akzeptors bei der Wellenlänge ν' .

$$F_{total}^{DA}(\nu, \nu') = F_{FRET}^{DA}(\nu, \nu') + F_{Crosstalk}^{DA}(\nu, \nu') + F_{direkt}^{DA}(\nu, \nu')$$

Gl. 26

Das spektrale Übersprechen des Donors bei der Wellenlänge ν in einer mit Donor und Akzeptor markierten Probe gehorcht folgender Relation.

$$F_{Crosstalk}^{DA}(\nu, \nu') = F_{Em}^{DA}(\dot{\nu}, \nu') \frac{F_{Em}^D(\nu, \nu')}{F_{Em}^D(\dot{\nu}, \nu')}$$

Gl. 27

Wird $\dot{\nu}$ dabei so gewählt, daß der Akzeptor dort nicht emittiert, nach $F_{Em}^A(\dot{\nu}, \nu') = 0$, gibt das Verhältnis der Donor-Fluoreszenz bei den beiden unterschiedlichen Emissionswellenlängen ν und $\dot{\nu}$ den prozentualen Anteil des Crosstalks in der doppelt-markierten Probe an. Meßtechnisch wird hierzu ein Emissionsspektrum einer nur mit Donor markierten Probe aufgezeichnet und an beiden Emissionswellenlängen ν und $\dot{\nu}$ mit sich selbst verglichen. Sofern die Donor-Fluoreszenz nicht vom biologischen Substrat abhängt, reicht die einmalige Berechnung des Skalierungsfaktors. Dennoch wurde sicherheitshalber dieser Wert für jede Probe einzeln bestimmt. Abschließend wurde jedoch festgestellt, daß es sich in der Tat um einen konstanten Parameter handelt.

Analog dazu verfährt man mit der direkten Anregung des Akzeptors, die ebenfalls durch folgende Relation beschrieben werden kann, wobei das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten auf der rechten Seite auch in diesem Fall eine Skalierung darstellt.

$$F_{direkt}^{DA}(\nu, \nu') = F_{Em}^{DA}(\nu, \nu'') \frac{\varepsilon^A(\nu')}{\varepsilon^A(\nu'')}$$

Gl. 28

Analog darf hier der Donor nicht absorbieren, weshalb gelten muß: $\varepsilon^D(\nu'') = 0$

Aus dieser Forderung ergibt sich, daß sich die doppelt-markierte Probe bei Anregung mit der Wellenlänge ν'' identisch zur Gesamtemission des Akzeptors nach Clegg verhält.

Folglich muß gelten:

$$F_{Em}^A(\nu, \nu'') = F_{Em}^{DA}(\nu, \nu'')$$

Gl. 29

Die Gleichung für die Gesamtemission des Akzeptors kann ebenfalls neu formuliert werden.

$$F_{Em}^A(\nu, \nu') = F_{FRET}^{DA}(\nu, \nu') + F_{Em}^{DA}(\nu, \nu'') \frac{\varepsilon^A(\nu')}{\varepsilon^A(\nu'')}$$

Gl. 30

Aufgrund des folgenden Zusammenhangs ist das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten bei den Wellenlängen ν und ν'' durch simple Aufnahme zweier Emissionsspektren anhand einer nur mit Akzeptor markierten Probe bestimmbar.

$$\frac{\varepsilon^A(\nu')}{\varepsilon^A(\nu'')} = \frac{F_{Em}^A(\nu, \nu')}{F_{Em}^A(\nu, \nu'')}$$

Gl. 31

Der Anteil der Akzeptor-Fluoreszenz, der durch FRET hervorgerufen wird, läßt sich somit durch Umformung der Gleichung Gl. 31 und gleichzeitiger Substitution beider Korrekturterme wie folgt beschreiben.

$$F_{FRET}^{DA}(\nu, \nu') = F_{total}^{DA}(\nu, \nu') - F_{Em}^{DA}(\nu, \nu') \frac{F_{Em}^D(\nu, \nu')}{F_{Em}^D(\nu, \nu'')} - F_{Em}^{DA}(\nu, \nu'') \frac{F_{Em}^A(\nu, \nu')}{F_{Em}^A(\nu, \nu'')}$$

Gl. 32

Voraussetzung dafür ist, daß sich die doppelt markierte Probe identisch zu denjenigen verhalten, die nur mit einem der beiden Farbstoffe markiert wurden. Der Crosstalk und die direkte Anregung dürfen nicht von der Anwesenheit des jeweils anderen Farbstoffs abhängen, was in der Praxis meist gewährleistet ist.

Die FRET-Effizienz wird nun auch durch Einsetzen der beiden Ausdrücke für die Gesamtemission des Akzeptors zugänglich.

Man erhält:

$$E = \frac{F_{FRET}^{DA}(\nu, \nu') \varepsilon^A(\nu'')}{F_{Em}^{DA}(\nu, \nu'') \varepsilon^D(\nu') d^+}$$

Gl. 33

Die Extinktionskoeffizienten wurden der Literatur entnommen und mittels zweier Anregungsspektren den jeweiligen Anregungswellenlängen angepaßt, zumal abseits des Absorptionsmaximums angeregt wurde.

5.2. Einfluß der statistischen Markierungsverhältnisse

Für die Berechnung der FRET-Effizienz ist die Kenntnis der genauen Markierungseffizienz mit Donor-Farbstoff essentiell. Aufgrund der parallelen Umsetzung des SSO1653 mit Donor und Akzeptor zugleich, ergeben sich selbst im Idealfall bei vollständiger Kopplung der Farbstoffe an das Protein mehrere Konstellationen der Anbindung. Entweder hängen an beiden Domänen des Enzyms jeweils nur Donor- oder nur Akzeptor-Farbstoffe oder aber das Protein ist doppelt-markiert. Für letzteren Fall existiert eine doppelt so hohe

Wahrscheinlichkeit wie für die Einzelmarkierungen, da es in der Praxis nicht entscheidend ist, an welcher Domäne der Donor bzw. der Akzeptor gebunden ist. Entscheidend ist dabei jedoch, daß nur bei Markierung mit beiden Farbstoffen ein Energietransfer stattfinden kann. Die Wahrscheinlichkeit, ein Proteinmolekül sowohl mit Donor als auch mit Akzeptor anzutreffen, ist gegeben durch:

$$P^{DA} = \frac{d^+}{2} \times \frac{a^+}{2} \times 2$$

Gl. 34

Die Markierungseffizienzen beziehen sich hierbei auf eine Bindungsstelle bzw. pro Cystein und gehen von einer idealen Umsetzung aus. Zusätzlich erschwerend käme hinzu, daß bei unvollständiger Markierung noch weitere Spezies entstünden, die ebenfalls nicht zu FRET geeignet wären. Selbstverständlich hat dies auch Auswirkungen auf die von *Clegg* formulierte Beschreibung der Akzeptor-Emission.

$$\frac{F_{Em}^A(v, v')}{F_{Em}^A(v, v'')} = \frac{\frac{1}{2} \{ [S] \varepsilon^D(v') \Phi^A(v) d^+ a^+ \} \times E + \{ [S] \varepsilon^A(v') \Phi^A(v) a^+ \}}{\{ [S] \varepsilon^A(v') \Phi^A(v) a^+ \}}$$

Gl. 35

Damit ändert sich auch die nach der FRET-Effizienz aufgelöste Gleichung folgendermaßen.

$$E = 2 \frac{F_{Em}^A(v, v') \varepsilon^A(v'')}{F_{Em}^A(v, v'') \varepsilon^D(v') d^+} - 2 \frac{\varepsilon^A(v')}{\varepsilon^D(v') d^+}$$

Gl. 36

Werden diese Veränderungen in die nach *Ebright* vereinfachte Formel übertragen, ergibt sich für die FRET-Effizienz folgende Gleichung.

$$E = 2 \frac{F_{FRET}^{DA}(v, v') \varepsilon^A(v'')}{F_{Em}^{DA}(v, v'') \varepsilon^D(v') d^+}$$

Gl. 37

5.3. Berechnung der Extinktionskoeffizienten

Zur Berechnung der FRET-Effizienzen müssen auch die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Farbstoffe bekannt sein. Prinzipiell ließen sich die Herstellerangaben verwenden, nur fand die tatsächliche Anregung für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren nicht bei der gleichen Wellenlänge statt, an der die Extinktionskoeffizienten bestimmt wurden. Statt dessen wurde leicht verschoben dazu angeregt, um die Anregung des jeweils anderen Farbstoffs weitgehend zu minimieren. Die absolute Bestimmung der Koeffizienten ist nicht trivial, da im Prinzip der Farbstoff eingewogen werden muß bzw. man die Konzentration

anders als durch UV-VIS Spektroskopie zu bestimmen hat. Da Meßungenauigkeiten hierbei auftreten können, wurden die Koeffizienten relativ zur Herstellerangabe bestimmt anhand folgender Gleichung.

$$\varepsilon(\nu') = \frac{F_{Ex}(\nu, \nu')}{F_{Ex}(\nu, \nu'_{Ref})} \times \varepsilon(\nu'_{Ref})$$

Gl. 38

Es wurden somit Fluoreszenz-Anregungsspektren von nur mit Donor oder Akzeptor markierten Enzymen aufgezeichnet, wonach die Intensität am Maximum mit dem Intensitätswert der jeweils für die Emissionsspektren genutzten Wellenlänge verglichen wurde. Mit dieser Relation wurde der vom Hersteller angegebene Extinktionskoeffizient dann skaliert. Für den Donor wurde dazu ein Anregungsspektrum von 500 nm bis 560 nm bei einer Emissionswellenlänge von 570 nm aufgenommen, während für den Akzeptor die Anregungswellenlänge von 500 bis 660 nm bei einer Emissionswellenlänge von 670 nm variiert wurden.

5.4. Notwendige Korrekturen

Im Vorfeld der Messungen fiel auf, daß das eingesetzte Fluoreszenz-Spektrometer einige gerätespezifische Eigenschaften aufwies, die die Ergebnisse stark hätten verfälschen können, wenn nicht eine umfassende Korrektur vorgenommen worden wäre.

5.4.1. Bestimmung der Anregungsintensität

Erstens werden im Rahmen der Analyse nach *Ebright* zwei Emissionsspektren miteinander in Relation gesetzt, die nicht mit der gleichen Anregungswellenlänge aufgenommen werden. Gleiches gilt für die Bestimmung der direkten Anregung des Akzeptors mit Hilfe eines Anregungsspektrums. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, die Leistung, mit der die Anregung stattfindet, konstant zu halten oder zumindest Kenntnis darüber zu besitzen. Dies war besonders notwendig im Hinblick auf die als Strahlungsquelle eingesetzte Xenon-Kurzbogenlampe, die sehr inhomogene Intensitätswerte aufwies, sowohl spektral gesehen als auch im zeitlichen Verlauf.

Eine mögliche Vorgehensweise hierbei ist, den Anregungsstrahl über eine Referenzdiode zu regeln bzw. zu skalieren. Im Idealfall sollte sie dazu im optischen Strahlengang unmittelbar vor der Probe angebracht sein, um eine möglichst realistische Messung zu gewährleisten. Konkret befand sich jedoch die Referenzdiode im verwendeten Spektrometer noch vor dem Anregungspolarisator, womit dessen Einfluß bzw. wellenlängenabhängige Transmission nicht bestimmt werden konnte. Außerdem existierten keinerlei Daten über eine etwa-

ge Kalibrierung oder über die intrinsische Gerätefunktion der Diode selbst. Es mußte also eine Referenzmessung durchgeführt werden, die den Intensitätsverlauf der Lampe sowie den Einfluß des Monochromators und des Polarisators erfaßte. Hierzu wurde ein kalibriertes Leistungsmeßgerät im Probenraum angebracht, manuell ein Wellenlängenbereich von 480 nm bis 700 nm abgerastert und die Leistungswerte notiert. Abb. 19 zeigt den Intensitätsverlauf der Anregung bei einem Polarisationswinkel von 90° . Es zeigte sich, daß sich die Intensitäten im verwendeten Wellenlängenbereich zwischen 530 nm und 630 nm um mehr als 50 % unterschieden. Eine Streuprobe konnte nicht eingesetzt werden, da im Emissionsstrahlengang weitere optische Bauelemente wie Monochromator und Polarisator wellenlängenabhängig transmittieren und auch der Detektor Einfluß ausübt. Für die Kalibrierung und die späteren Messungen mußte die eingebaute Referenzdiode also ausgeschaltet bleiben.

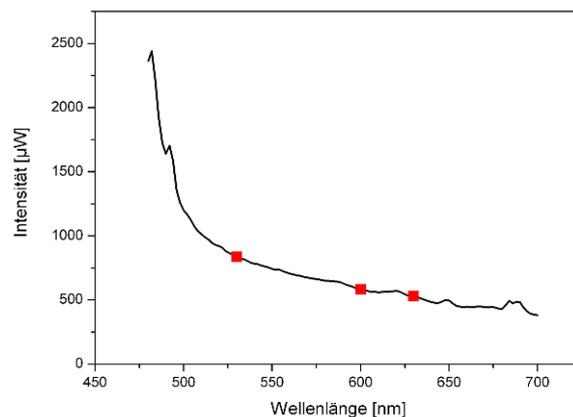


Abb. 19: Darstellung des Intensitätsverlaufs der Anregungsquelle (Xe-Kurzbogenlampe) in Abhängigkeit der Wellenlänge.

Man sieht, daß eine starke Korrelation vorherrscht, besonders im verwendeten Wellenlängenbereich zwischen 530 nm und 630 nm. Die relativen Intensitäten können zur Korrektur angewendet werden.

5.4.2. Intensitätsabhängige Nichtlinearität der Detektion

Der Detektor selbst stellte aber einen weiteren Schwachpunkt des Systems dar. Zwar handelte es sich dabei um einen Photomultiplier (PMT), der sogar einzelne Photonen registrieren kann, doch wird diese hohe Sensitivität erkaufte mit einer relativ hohen Latenzzeit. Während dieser Zeit kann kein weiteres Photon detektiert werden, was effektiv den dynamischen Bereich eingrenzt. Dies führt dazu, daß immer größer werdende Lichtintensitäten, nicht wie zu erwarten wäre, linear detektiert werden können, sondern sich einem Sättigungswert annähern. Dies konnte mit Hilfe einer Konzentrationsreihe bestätigt werden, die nachfolgend in Abb. 20 gezeigt wird. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe des Farbstoffs Alexa 647 erstellt, der auch in den Messungen an SSO1653 zum Einsatz kam. Somit mußte das Sättigungsverhalten nicht an einem Vergleichssystem bestimmt werden.

Die Intensitätswerte im Wellenlängenbereich von 660 - 665 nm, also um das Maximum der Fluoreszenz, wurden gemittelt und ihr Kurvenverlauf konnte mit Hilfe einer Exponentialfunktion angenähert werden.

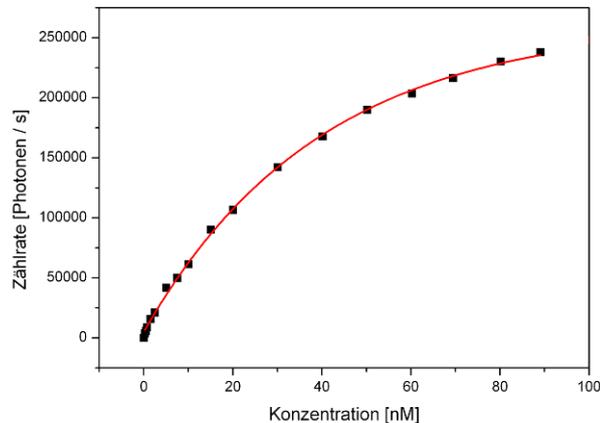


Abb. 20: Darstellung der Zählrate des Detektors in Abhängigkeit der Konzentration eines Fluorophors.

Im Prinzip sollte die Zählrate linear ansteigen. Aufgrund der Latenzzeit durch das Single Photon Counting nähert sich die Zählrate einem Sättigungswert. Der Verlauf läßt sich mit einer Exponentialfunktion beschreiben, um die gemessenen Daten zu korrigieren.

Die Funktion gehorcht dem folgenden Zusammenhang:

$$I = a \times (1 - e^{-bx})$$

Gl. 39

mit $a = 258.156$ und $b = 0.02687$ für b .

Eine lineare Zunahme der Fluoreszenz wäre jedoch zu erwarten gewesen, hingegen tritt eine starke Krümmung der Kurve spätestens ab etwa 100.000 Photonen pro Sekunde auf. Dies hätte abermals die Berechnungsmethode nach *Ebright* beeinträchtigt, da nur zwei linear zusammenhängende Spektren in Relation gebracht werden dürfen. Die Alternative, nur Konzentrationen im relativ linearen Bereich unter 100.000 Photonen pro Sekunde einzusetzen, hätte höhere Fehler in der Intensitätsbestimmung verursacht.

Es mußte also eine Normierung der Spektren durchgeführt werden, die das Sättigungsverhalten des Detektors berücksichtigte. Dazu mußte Gleichung Gl. 39 nach der Konzentration x aufgelöst werden.

$$x = -\frac{\ln\left(1 - \frac{I}{a}\right)}{b}$$

Gl. 40

Trotz der Anwendung dieser Korrektur wurde die Konzentration der Proben jederzeit so gewählt, daß 120.000 Photonen pro Sekunde nicht überschritten wurden.

5.4.3. Einfluß der Monochromatoren

Im Prinzip sollten die Monochromatoren laut Hersteller des Fluoreszenz-Spektrometers die Auswertung nicht beeinflussen, vor allem da ihre Schrittmotoren eine Genauigkeit von etwa 0.2 nm bieten. Dennoch lieferten die Messungen oftmals Spektren, die eine Verschiebung des Maximums der Fluoreszenz-Intensität aufwiesen. Da keine Korrelation mit der Probenzusammensetzung gefunden werden konnte und dies sehr unregelmäßig auftrat, kam die Vermutung auf, daß die Schrittmotoren zumindest im Dauereinsatz doch Aussetzer bzw. Sprünge aufwiesen, zumal die Spektren bis zu 5 nm zueinander verschoben waren. Das Auswerteprogramm korrigiert dies, muß dazu aber an den Rändern der Spektren Daten wegfallen lassen, um die Maxima aufeinander anzupassen.

5.4.4. Einfluß der Polarisierung

Wegen der polarisationsabhängigen Transmissionseffizienz eines Monochromators ist das aufgezeichnete Signal meist nicht proportional zur Gesamtintensität $I_{||} + 2I_{\perp}$, sondern zu einer anderen Kombination aus $I_{||} + I_{\perp}$. Das heißt die gemessene Intensität hängt ab von der Polarisierung des eingestrahnten Lichts und der Eigenschaften der Monochromatoren. Um diesen störenden Einfluß zu umgehen, können unabhängig von der Polarisierung der Probe Polarisatoren eingesetzt werden, die dann zusammen im magischen Winkel zur Probe stehen. Der Anregungspolarisator wird dafür in vertikale Ausrichtung gebracht, während der Emissionspolarisator um einen Winkel von 54.7° dazu ausgerichtet wird. Der Grund dafür ist, daß die Wahrscheinlichkeit eines Moleküls, polarisiertes Licht zu absorbieren, durch $\cos^2 \theta$ beschrieben werden kann, wobei θ der Winkel ist zwischen dem Absorptionsdipol des Moleküls und dem einfallenden Licht. Der magische Winkel von 54.7° zwischen den Polarisatoren führt zu einer Bevorzugung der senkrecht stehenden Intensität I_{\perp} gegenüber der Intensität $I_{||}$ um den Faktor zwei, da $\cos^2(54.7) = \frac{1}{3}$ und $\cos^2(90-54.7) = \frac{2}{3}$. Somit gilt für die Gesamtintensität wieder $I_{||} + 2I_{\perp}$.

5.4.5. Mittelung der Korrekturspektren

Obwohl während der Analyse alle Spektren einen Filter durchlaufen, um ihren Verlauf zu glätten, kann es vorkommen, daß aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen die Fluoreszenz-Intensitäten in den Spektren stark schwanken. Dies beeinflußt selbstverständlich auch das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis negativ, was sich wiederum in einer größeren Ungenauigkeit der unterschiedlichen FRET-Effizienzen auswirkt. Deswegen wurde die Analyse der Daten in der Hinsicht angepaßt, daß nicht für jede Probenzusammensetzung entsprechende individuell aufgenommene Korrekturspektren verwendet wurden.

In der Praxis wurden die nötigen Spektren der einzeln markierten Proteine zwar aufgezeichnet, aber nur um aus einer repräsentativen Zahl von etwa 150 Stück jeweils normalisierte, übergreifend einsetzbare Spektren zu berechnen. Zuvor wurde natürlich sichergestellt, daß sie sich höchstens in einer Verschiebung ihres Maximums, wie zuvor beschrieben, unterschieden, nicht aber in ihrer Form. Letzteres wäre ein Hinweis darauf gewesen, daß doch photophysikalische Prozesse oder die Versuchsbedingungen die eigentliche Ursache für die Verschiebung der Fluoreszenzspektren gewesen sein könnten. Die Vorteile liegen im einheitlichen Gebrauch von Korrekturspektren, die die Schwankungen individueller Spektren ausgleichen und so eine mögliche Fehlerquelle ausschließen. Berechnungen zeigten nämlich, daß die Anwendung eines kollektiven Korrekturspektrums deutlich geringere Schwankungen der FRET-Effizienz (2.8 % i. Vgl. 14.7 %) über den gesamten betrachteten Wellenlängenbereich hervorrief als der Einsatz individueller Spektren. Wie im folgenden erläutert wird, gilt ein stabiler Wert für die Transfereffizienz als Kriterium für die Qualität der Ergebnisse.

5.5. Auswertung der Fluoreszenzspektren

Eine in MATLAB programmierte Routine bot die Möglichkeit, alle nötigen Spektren einzulesen sowie die notwendigen Korrekturen vorzunehmen, um dann die Ergebnisse in Form mehrerer Datensätze auszugeben und zu speichern.

Bereits voreingestellt sind die Parameter für die Normierung der Intensitäten zur Behebung des Sättigungsverhaltens des Detektors. Eingabefelder lassen aber auch Veränderungen der Werte zu. Über weitere Schaltflächen lassen sich die jeweiligen Spektren einlesen. Beispielsweise kann mit „Load Donor only Emission Spectrum“ das Emissionsspektrum der nur mit Donor markierten Probe selektiert werden. Der zuvor gezeigte Intensitätsverlauf der Anregungsquelle (Abb. 19) kann ebenfalls geladen werden. Die Extinktionskoeffizienten für Donor (Cy3, $150.000 M^{-1}cm$) und Akzeptor (Cy5, $250.000 M^{-1}cm$) sind in den dazugehörigen Eingabefenstern bereits eingetragen, können aber bei Bedarf (Alexa 647, $239.000 M^{-1}cm$) ebenfalls angepaßt werden. Die Markierungseffizienz wird in einem eigenen Eingabefeld eingestellt, wobei im Fall des SSO1653, zusätzlich die statistische Markierung wegen des damit verbundenen Maximalwerts von 50 % berücksichtigt werden muß. Die Analyse liefert im Anschluß eine Datei mit dem Ergebnis und zwei weitere zur Verifizierung der Meßungenauigkeiten.

5.5.1. Bestimmung der FRET-Effizienz

Nachdem aus allen Spektren die Gerätefunktionen des Fluoreszenz-Spektrometers beseitigt wurden, wurde die FRET-Effizienz mit Hilfe der Funktionen nach *Clegg* und *Ebright* errechnet. Dazu wurden die Fluoreszenz-Intensitäten aller möglichen Kombinationen an Wellenlängenpaaren der Emission verwendet. Die FRET-Effizienz hängt im Prinzip nicht von den untersuchten Emissionswellenlängen ab, d.h. solange zwei Wellenlängen für Donor bzw. Akzeptor gewählt werden, die repräsentativ sind, also innerhalb ihres Spektrums mit ausreichendem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis liegen, können die entsprechenden Intensitäten in die Gleichung Gl. 37 eingesetzt werden. Es wäre also ausreichend, nur das Wellenlängenpaar am Fluoreszenzmaximum zu untersuchen. Dennoch wurde immer das gesamte zur Verfügung stehende Spektrum ausgewertet, um auf der einen Seite mögliche Fehler durch Mittelung mehrerer Effizienzen aus verschiedenen Wellenlängenpaaren zu minimieren. Auf der anderen Seite sollten die FRET-Effizienzen ohnehin wenig auseinander liegen, egal welches Wellenlängen-Paar ausgesucht würde. Die spektrale Auftrennung ermöglicht es jedoch, alle Wellenlängen-Paare zu vergleichen und so mögliche Artefakte auszuschließen, die durch die Bereinigung des spektralen Überlapp des Donors oder der direkten Anregung des Akzeptors entstanden sein könnten. Darüber hinaus können so FRET-Effizienzen über einen größeren spektralen Abschnitt berechnet werden, um feine Schwankungen und Rauschen auszugleichen. Die Aussagekraft des Ergebnisses läßt sich so besser einschätzen.

Hierzu wurden alle Emissionswellenlängen ν von 540 nm bis 630 nm variiert, während ν von 640 nm bis 700 nm verändert wurde. Die verlässlichsten Werte sollten die Kombinationen niedriger Wellenlängen für den Crosstalk und relativ hoher Wellenlängen für die Akzeptor-Emission darstellen, da mit steigendem Abstand der Einfluß des jeweils anderen Farbstoffs geringer wird und so die spektralen Anteile besser getrennt werden können. Zudem liegen mit 530 nm respektive 630 nm die Anregungswellenlängen nur unweit entfernt, wodurch auch der Einfluß von Streulicht bestimmt werden kann.

Wird die resultierende FRET-Effizienz graphisch in Abhängigkeit der Akzeptorwellenlänge dargestellt, dann ergibt sich aufgrund der ebenfalls variierten Donor-Emissionswellenlänge eine Kurvenschar. Im äußersten Idealfall liegen alle Kurven übereinander und ergeben eine Gerade, d.h. die FRET-Effizienz ist konstant und unabhängig vom betrachteten Wellenlängenpaar. In Abb. 21 ist die FRET-Effizienz anhand eines ausgewählten Beispiels exemplarisch in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge des Akzeptors abgebildet.

Zu sehen ist eine Kurvenschar, bei der jede Kurve eine Donor-Emissionswellenlänge repräsentiert. Rauschen aufgrund einer endlichen Integrationszeit oder auch eine nicht ausreichend korrigierbare Wellenlängenabhängigkeit des Photodetektors sind Gründe dafür,

warum die Kurven keine flache Linie über den gesamten Emissions-Wellenlängenbereich des Akzeptors ergeben.

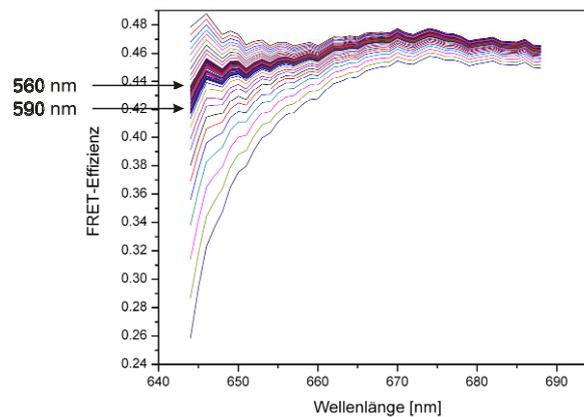


Abb. 21: Darstellung der FRET-Effizienzen in Abhängigkeit der Donor- und Akzeptorwellenlängen.

Im Idealfall ergibt sich eine übereinanderliegende, geradlinige Kurvenschar. Entlang der Abszisse zeigen die Akzeptorwellenlängen eine starke Korrelation mit der FRET – Effizienz nur für Donorwellenlängen, bei denen die Korrekturterme nicht vollständig funktionieren. (unterhalb 560 nm, überhalb 590 nm). Zur Auswertung kommen alle Werte von 565–575 nm kombiniert mit 665–685 nm.

Man sieht bei niedrigen Emissionswellenlängen des Akzeptors sowohl eine zunehmende Aufspaltung der Kurven wie auch einen Anstieg zu höheren FRET-Effizienzen. So sind in den Randbereichen der Donor-Emission (bis 560 nm oberer Pfeil, ab 590 nm unterer Pfeil) die FRET-Effizienzen wesentlich breiter verteilt, was zur starken Aufspaltung der Kurven führt. Analog dazu liefern die Daten des Akzeptors einen Anstieg der FRET-Effizienzen (von 640 nm bis 665 nm). Bei genauer Betrachtung der absoluten Streuung der Daten stellt man fest, daß die Standardabweichung über alle Donor-Wellenlängen (565 - 575 nm) bei etwa 0.006 % absoluter FRET-Effizienz (relative Abweichung für Abb. 21 ca. 0.01 %) liegt. Der Fehler über die gemittelten Akzeptor-Wellenlängen (665 - 685 nm) beträgt etwa 0.3 % absolut bzw. 0.6 % relativ. Dieser Bereich spiegelt nun genau die zuvor angesprochenen Wellenlängen wieder, die besser spektral aufgeteilt werden können.

Faßt man jedoch diese zwei Bereiche zusammen, so verläuft die FRET-Effizienz extrem stabil mit Schwankungen von höchstens 2 % der absoluten FRET-Effizienz. Deswegen wurden die FRET-Effizienzen nicht nur anhand eines Wellenlängen-Paars errechnet, sondern ein Mittelwert aus diesem Bereich erstellt. Wie bei der Vorstellung der Ergebnisse noch ersichtlich werden wird, wurden die abschließenden FRET-Effizienzen jeder einzelnen Probenzusammensetzung aus drei unabhängigen Meßreihen gebildet. Unterschiedliche Proteinpräparationen führten indes zu ungleichmäßigen Konzentrationen an aktivem Protein, weshalb auf die Transfereffizienz der Probe mit nur DNS alleine normiert wurde.

5.5.2. Abzug des Crosstalks und der direkten Akzeptoranregung

Neben den FRET-Effizienzen werden zwei Dateien ausgegeben, die Auskunft darüber geben, in wie weit die Maxima der Spektren verschoben wurden und folgerichtig die Korrektur des Crosstalks und der direkten Anregung des Akzeptors funktionierte. Dazu werden sowohl die unkorrigierten als auch die korrigierten Spektren ausgegeben sowie die Korrekturspektren selbst.

Eine der beiden Dateien beinhaltet den spektralen Verlauf der doppelt-markierten Probe bei Anregung des Donors (Abb. 22A, schwarz). Hiervon wird das ebenfalls abgebildete Spektrum der nur mit Donor markierten Probe (grün) subtrahiert, um für den Crosstalk zu korrigieren. Der Anteil der Akzeptor-Emission durch Nebenanregung (magenta) ist auch dargestellt. Es zeigt sich eine sehr gute Abstimmung der Maxima, was eine zuverlässige Korrektur gewährleistet. Das vollständig korrigierte Spektrum ist zur Überprüfung in blau abgebildet.

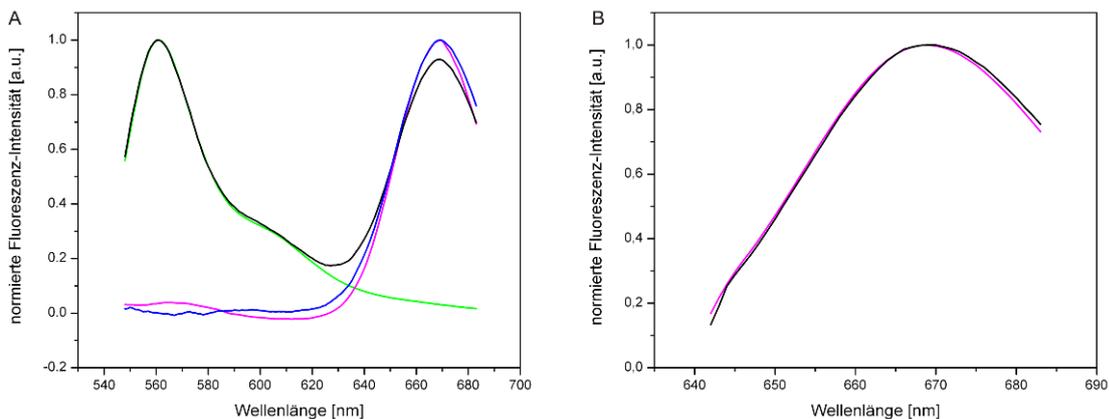


Abb. 22: Darstellung der Korrekturspektren im Vergleich zur Messung.

Je besser die Überlappung, desto genauer funktioniert die Verwendung der Korrekturterme. (A) Die Messung (schwarz) überlappt hervorragend mit den Korrekturspektren für den Crosstalk (grün) und der Nebenanregung des Akzeptors (magenta). Beim korrigierten Spektrum (blau) wurden beide Anteile herausgerechnet. (B) Die direkte spezifische Akzeptoranregung (magenta) überlappt sehr genau mit den Meßwerten (schwarz).

In der anderen Datei befinden sich dagegen zwei Spektren (Abb. 22B), das der doppelt-markierten (rot) und das der nur mit Akzeptor markierten (magenta) Probe, die beide bei direkter spezifischer Anregungswellenlänge des Akzeptors (630 nm) aufgenommen wurden. Man sieht die hervorragende Überlappung der beiden Kurven, was sich wiederum auch positiv auswirkt auf den Abzug der direkten Anregung des Akzeptors durch die Anregungswellenlänge des Donors (530 nm). Alle Spektren sind auf den Maximalwert der Emission des Akzeptors normiert.

5.5.3. Anwendungsmöglichkeiten der Software

Neben der Aufklärung der dynamischen Konformationsänderung des Enzyms SSO1653 konnten auch Vorexperimente mit anderen Proteinen erfolgreich durchgeführt werden. So bestätigten Ensemble-Experimente beispielsweise die Dimerbildung des SMC-Proteins in Anwesenheit von DNS und BeCl_2 . Auch für die Einzelpaar-FRET-Messungen zur Bestimmung des Wegs der m-RNS aus der RNS-Polymerase II wurden die entsprechenden Konstrukte zuerst im Ensemble auf deren generelle Eignung hin untersucht. Generell kann das Programm für jedwede Berechnung der FRET-Effizienz eingesetzt werden, wenn die Ensemble-Technik in Kombination mit dem theoretischen Hintergrund von *Clegg* und *Ebright* verwendet werden soll. Solange die generellen Voraussetzungen, wie hohe Markierungseffizienz und Kenntnis der Extinktionskoeffizienten, gegeben sind, können alle weiteren Parameter beliebig verändert werden.

5.6. Extraktion der Einzelmolekül-Intensitäts-Zeitspuren

In der Erstellung dieses Bestandteils des Auswerteprogramms wurde die grundlegende Entwicklung kollektiv von mehreren Wissenschaftlern im Arbeitskreis durchgeführt. Als Plattform für das Auslesen der Intensitätsverläufe aus den Einzelpaar-FRET-Aufnahmen wurde MATLAB (V7.0 - V7.9, Mathworks) eingesetzt. Es folgt nun eine schrittweise Erklärung des Programmablaufs.

Für den Fall, daß nur Messungen mit einem spektralen Bereich durchgeführt wurden, vereinfacht sich die Extraktion, da nur Signale eines Kanals bzw. von einem Teil der Kamera ausgelesen werden müssen. Bei den hier gezeigten FRET-Messungen mußte jedoch vorab erst für jedes Molekül eine Korrelation hergestellt werden zwischen den entsprechenden Signalen in den jeweiligen Kanälen. Per Hand werden dazu auf einem definierten Muster je zwei exakt korrelierende Punkte in beiden Kanälen definiert und daraus eine polynomische Funktion errechnet, die sämtliche Koordinaten einliest und auf neuem abbildet.

Zu diesem Zweck werden fluoreszierende Partikel mit breitbandigem Emissions-Spektrum, das in beiden Kanälen detektiert werden kann, in einer Meßkammer immobilisiert und aufgezeichnet. Zwei aus mindestens fünf dieser Partikel müssen dann manuell im Analyseprogramm selektiert werden, worauf deren Koordinaten zur Berechnung des relativen Versatzes ausgelesen werden, d.h. konkret wie viele Pixel Abweichung in x- und y-Richtung zwischen den beiden Kanälen besteht. Gleichzeitig werden die Koordinaten sämtlicher Signale der Partikel sowohl für den Donor- wie auch für den Akzeptorkanal gesucht

und subpixelgenau bestimmt. Nur wenn im folgenden Schritt die Differenz der gefundenen Koordinaten in einem eingeschränkten Bereich um den zuvor berechneten Versatz schwankt (± 4 Pixel), werden diese beiden Signale tatsächlich als Paar gewertet und gespeichert. Mindestens fünf dieser Koordinatenpaare werden anschließend zur Berechnung einer Transformationsfunktion eingesetzt. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, daß der Aufbau nicht subpixelgenau justiert werden muß, da die Korrelation dies kompensieren kann. Auch Verzerrungen durch nicht einwandfreie optische Elemente werden ersichtlich und trotzdem ausgeglichen. Es empfiehlt sich jedoch eine derartige Korrelationskarte (map) in regelmäßigen Abständen aufzuzeichnen, im besten Fall sogar bei jeder Messung. Je nach Qualität der Meßdaten kann aber auch das Meßvideo selbst als Karte dienen.

Im zweiten Schritt wird die Dunkelzählrate der Kamera abgezogen, indem das absolute Minimum im gesamten Meßvideo subtrahiert wird. Für die eigentliche Suche der Signale werden die Mittelwerte der beiden Kanäle berechnet, indem im Akzeptorkanal der Durchschnitt aus den ersten 25 Bilderfolgen genommen wird, während im Donorkanal die Bilder 16 bis 38 dazu ausgewählt werden. Diese Werte wurden empirisch festgestellt. Kürzer lebende Signale, die ohnehin nur weniger Informationen liefern könnten, werden durch ihren geringeren Mittelwert somit im weiteren Verlauf aussortiert.

Als nächstes wird ein lokaler Hintergrund ermittelt, indem zuerst mit Hilfe eines 16x16 Pixel großen Rasters der jeweilige Kanal nach dem lokalen Minimum abgetastet wird, worauf dieses grobmaschige Muster an lokalen Minima über einen 20x20 Pixel großen Bildfilter (imfilter) homogenisiert und von der eigentlichen Messung abgezogen wird. Nach einer Skalierung der Intensitäten in einem Bereich von Null bis 255 wird ein Schwellenwert gesetzt. Die vorausgegangene Normierung dient einer einfacheren Berechnung dieses Grenzwerts. Zu Beginn der Analyse kann die relative Höhe dieser Schwelle ausgewählt werden, die zwischen 95 % und 99,5 % aller höchsten vorkommenden Intensitätswerte gesetzt wird. Hierzu werden zunächst die Intensitäten aller Pixel der Größe nach sortiert und indiziert. Dann wird die Intensität des Pixels mit dem entsprechenden Index ausgelesen und als Schwelle selektiert. Diese Methode führt zu einem wesentlich homogeneren und unabhängigeren Grenzwert, der nur durch sehr viele, sehr helle Pixel beeinträchtigt werden könnte. Ein derartiges Signal würde jedoch vielmehr auf Schmutz als auf ein Molekül von Interesse hindeuten, weshalb solche Messungen ohnehin verworfen worden wären.

Im nächsten Schritt wird das Bild pixelweise abgetastet und alle Intensitäten unterhalb des Schwellenwerts und in einem fünf Pixel breiten Außenrand auf 0 gesetzt. Da die Intensitäten überhalb des Grenzwerts unberührt bleiben, entsteht so eine quasi-binäre Maske, anhand der die Koordinaten der Signale extrahiert werden. Hierzu rastert ein 7x7 Pixel großer Kasten die Maske ab und sucht dabei nach lokalen Maxima, wobei automatisch ihr Signalmittelpunkt ermittelt wird. Um die Signale der eigentlichen Moleküle von Schmutzpartikeln abzugrenzen, werden sie sowohl auf Kreisform als auch auf ihre Größe und ihren

relativen Abstand zueinander hin untersucht. Dazu wird eine kreisförmige, binäre Maske mit einem Durchmesser von sieben Pixeln auf den Mittelpunkt gelegt, darin der Mittelwert des Signals bestimmt und mit dem Mittelwert der Intensitäten aus einem ein Pixel großen Rand um diese Maske herum verglichen. Nur wenn der innere Mittelwert um mehr als drei Standardabweichungen des Randbereichs höher liegt als die höchsten Intensitäten des Rands selbst, handelt es sich wirklich um ein isoliertes Molekül. Die Koordinaten des Signals werden anschließend ausgelesen und über die polynomische Funktion auf den Donorkanal abgebildet.

Zuletzt werden die Signale an den Pixelpaaren entlang der Zeitachse extrahiert, d.h. anhand der Koordinaten in Donor- und Akzeptorkanal werden die jeweiligen Intensitäten aus jedem Bild ausgelesen und abgespeichert. Mit Hilfe der gleichen Maske, die für die Aussortierung verwendet wurde, werden die Signalintensitäten in einem sieben Pixel großen Kreis aufsummiert und in einer Datei ausgegeben. Zu jedem Molekül bzw. seinem Signal wird zusätzlich der lokale Hintergrund bestimmt. Dies ermöglicht im Nachhinein die Qualität der Intensitäts-Zeitspur zu beurteilen, die durch benachbarte Moleküle oder aufgrund von diffundierenden Molekülen beeinträchtigt werden kann. Die Intensitäten im Bereich um das eigentliche Signal herum sollten identisch verlaufen, da ein isoliertes Molekül auch mehr als zwei Pixel weit entfernt vom Signalmittelpunkt noch meßbares Signal liefert. Dies würde zwar nicht die Signalintensität des Moleküls innerhalb der Summierungsmaske verfälschen, jedoch die Bestimmung des lokalen Hintergrunds beeinträchtigen. Ein neu bindendes Molekül oder ein Bleichschritt eines benachbarten würde den Hintergrund nämlich sprunghaft verändern. Aus diesem Grund werden in einem zwei Pixel breiten Rand um die Maske herum der Mittelwert der Intensitäten sowie deren Standardabweichung berechnet. Aus allen Werten, die dann diesen Mittelwert nicht mehr als drei Standardabweichungen übertreffen, wird der Durchschnitt gebildet und als lokaler Hintergrund in einer separaten Datei ausgegeben. Diese Vorgehensweise wird für jeden Zeitschritt einzeln durchgeführt, was den Vorteil hat, daß Bereiche in denen zu Beginn der Messung Störsignale auftreten, zu einem späteren Zeitpunkt wieder integriert werden können. In einer dritten Datei werden sämtliche Koordinaten der gefundenen Signale gespeichert.

5.7. Analyse der Einzelmolekül-Intensitäts-Zeitspuren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zeitspuren sowohl manuell als auch automatisch ausgewertet anhand der folgenden Berechnungen.

5.7.1. Bestimmung der FRET-Effizienz

Die Einzelmolekül-Technik bietet gegenüber Ensemble-Methoden den entscheidenden, wenn auch trivialen Vorteil, daß ausschließlich doppelt markierte Moleküle, also mit Donor und Akzeptor, analysiert werden können. Es muß keine Markierungseffizienz bekannt sein, denn nur Moleküle, die auch Signal in beiden spektralen Kanälen zeigen, werden ausgewertet. Solche mit nur einem der beiden Farbstoffe fallen entweder bereits bei der Extraktion weg oder sind direkt anhand der Intensitätsverläufe erkennbar.

Somit ist die FRET-Effizienz bei Einzelpaar-FRET-Messungen über folgende Gleichung gegeben (Gl. 41).

$$E = \frac{\text{Intensität des Akzeptors}}{\text{Gesamtintensität}} = \frac{I_A - \beta I_D}{I_A - \beta I_D + \gamma I_D}$$

Gl. 41

I_D und I_A repräsentieren hierbei die Donor- bzw. Akzeptorintensitäten. Abhängig von den jeweiligen Fluoreszenz-Quantenausbeuten (Φ_A, Φ_D) sowie der instrumentellen Detektionseffizienzen (η_A, η_D) muß ein Korrekturfaktor γ eingesetzt werden, der wie folgt definiert ist.

$$\gamma = \frac{\eta_A \Phi_A}{\eta_D \Phi_D} - \beta$$

Gl. 42

Dieser Faktor ist keineswegs stabil oder innerhalb einer Probe einheitlich, da die Quantenausbeuten (Φ_A, Φ_D) von verschiedenen Bedingungen abhängen, wie pH-Wert, Temperatur oder biologischem Substrat. Die Detektionseffizienzen (η_A, η_D) auf der anderen Seite werden durch optische Komponenten, der Justage sowie dem eingesetzten Detektionsapparat beeinflusst, sind aber konstant, solange der Aufbau selbst unverändert bleibt. Obendrein wird der Korrekturfaktor γ und damit auch die FRET-Effizienz beeinflusst vom spektralen Übersprechen (crosstalk) der Fluoreszenz des Donors in den Akzeptorkanal, ausgedrückt durch β , sowie von der Fluoreszenz des Akzeptors aufgrund seiner Absorption bei der Anregungswellenlänge des Donors (a). Beides führt zwangsläufig zu einer Erhöhung der Akzeptor-Intensität I_A und dementsprechend zu einer zu hohen FRET-Effizienz E .

Aus diesem Grund sollten alle Parameter individuell für jedes Molekül bestimmt werden, anhand der folgenden Gleichungen:

$$\gamma = \frac{\bar{I}_A - \bar{I}'_A}{\bar{I}_D - \bar{I}'_D} = \frac{\Delta \bar{I}_A}{\Delta \bar{I}_D}$$

Gl. 43

und

$$\beta = \frac{\bar{I}'_A}{\bar{I}'_D}$$

Gl. 44

sowie

$$a = \bar{I}''_A$$

Gl. 45

Dazu werden aus Zeitspuren, bei denen der Akzeptor vor dem Donor bleicht, jeweils die Mittelwerte der Donor- bzw. Akzeptorintensitäten vor (\bar{I}_A, \bar{I}_D) und nach (\bar{I}'_A, \bar{I}'_D) dem Bleichschritt des Akzeptors berechnet, veranschaulicht in Abb. 23.

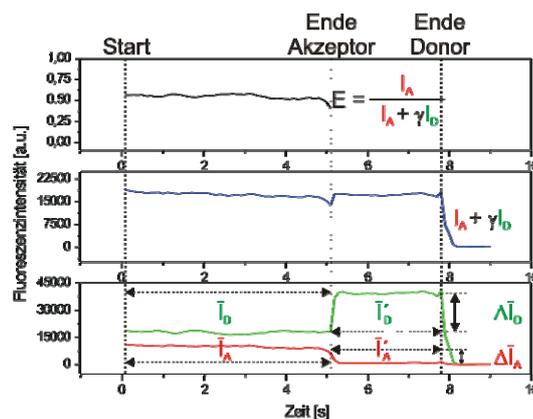


Abb. 23: Darstellung einer typischen Intensitäts-Zeitspur eines doppelmarkierten Moleküls.

Zur Berechnung der FRET-Effizienz und des Korrekturfaktors γ müssen der Startwert (Start) und der Punkt des Akzeptorbleichens (Ende Akzeptor) selektiert werden. Der Korrekturfaktor β wird nach Selektion des Bleichschritts des Donors berechnet. Die Gesamtintensität (blau) und die FRET-Effizienz (schwarz) verlaufen stabil.

Zur Überprüfung der korrekten Berechnung kann die totale Intensität, also der Nenner der ursprünglichen Gleichung (Gl. 41), im zeitlichen Verlauf betrachtet werden. Man sieht wie deren Verlauf der FRET-Effizienz folgt bis kurz vor dem Bleichschritt des Akzeptors. Das Sinken hierbei ist auf einen photophysikalischen Prozeß im Akzeptor zurückzuführen. Nach dem Bleichen erreicht die Gesamtintensität wieder den Ursprungswert, was die Korrektur mittels Vorfaktoren eindrucksvoll zeigt. Für β , dem Korrekturfaktor für den Crosstalk, werden hierzu aus der gleichen Zeitspur (Abb. 23) die Mittelwerte der Donor- und Akzeptorintensitäten nach dem Bleichschritt des Akzeptors (\bar{I}'_A, \bar{I}'_D) errechnet.

Auch hier sollte die Berechnung individuell für jedes einzelne Molekül stattfinden. Eine individuelle Bestimmung der Korrekturfaktoren β und γ macht es aber erforderlich, daß ausschließlich Intensitäts-Zeitspuren verwendet werden, in denen zuerst der Akzeptor bleicht, was auch in den Messungen durchwegs der Fall war.

Andernfalls hätte ein global eingesetzter Wert bestimmt werden müssen, der aber nicht der Situation in jedem Molekül gerecht geworden wäre. Die Werte für γ bewegten sich beispielsweise zwischen 0.5 und 1.5 bei der Verwendung des oft genutzten Paares TAMRA / Alexa 647, während β größtenteils zwischen 0.05 und 0.125 lag.

Der Faktor a , der die unerwünschte Anregung des Akzeptors durch die Anregungswellenlänge des Donors beschreibt, kann jedoch im Prinzip nur aus mittleren Intensitäten \bar{I}_A'' berechnet werden, bei denen zuerst der Donor bleicht. Die Fluoreszenz, die dann noch im Akzeptorkanal sichtbar bliebe, müßte bei der Bestimmung der FRET-Effizienz direkt von der Akzeptor-Intensität subtrahiert werden. Da aus diesem Grund nicht alle Korrekturfaktoren an einem einzigen Molekül bestimmt werden können und ein globaler Wert für den Parameter a eine zusätzliche unberechenbare Fehlerquelle darstellt, wurde auf seine Anwendung gänzlich verzichtet. Zudem weisen die Herstellerangaben der verwendeten Farbstoffe auf einen Einfluß unter 3 % hin, was die Vernachlässigung ebenfalls rechtfertigte.

5.7.2. Manuelle Auswertung

Die extrahierten Signalintensitäten wurden mit Hilfe eines Programms ausgewertet, bei dem manuell jede Zeitspur visuell auf Eignung untersucht werden mußte.

Nach der Abfrage der Datenstruktur, kann die Breite eines Filters mit gleitendem Durchschnitt angegeben werden. Je höher dieser Wert gesetzt wird, desto stärker wird Rauschen durch Mittelung minimiert. Gleichzeitig kann aber auch auftretende Dynamik nicht mehr aufgelöst werden. Es obliegt dem Benutzer hier abzuwägen, wobei es zu bedenken gilt, daß sich die Filterbreite auf die Mindestlänge der Zeitspuren auswirkt. Die Abb. 24 zeigt die graphische Erscheinung des in MATLAB erstellten Programms. Die Intensität des Donors erscheint grün, die des Akzeptors wird rot angezeigt. Bei alternierenden Anregungswellenlängen wird zudem in Magenta die Fluoreszenz des Akzeptors bei direkter Anregung abgebildet. Jederzeit wird die aktuelle Nummer des gezeigten Signals oberhalb des Datenfensters angezeigt sowie seine Koordinaten.

Nach dem Öffnen der gewünschten Intensitätsverläufe können drei Zeitpunkte graphisch selektiert werden. Um nicht durch Ungenauigkeiten in der Darstellung die Analyse zu verfälschen, wurden Hilfsmittel und Fehlerabfragen eingebaut. Nach der Bestimmung des Endes wird im gleichen Datenfenster die nun gemittelten Zeitspuren angezeigt sowie zusätzlich die Gesamtintensität (blau) und die FRET-Effizienz (schwarz). Bei schwierig erscheinenden Fällen kann es hilfreich sein, sich hier zusätzlich den lokalen Hintergrund um

das Molekül anzeigen zu lassen, der ebenfalls zugeschaltet werden kann. Die Anzeige funktioniert jedoch nur für das gewählte Molekül, da eine Daueranzeige von vornherein sehr unübersichtlich und überladen wirken würde und besser manuell an- und abgeschaltet wird.

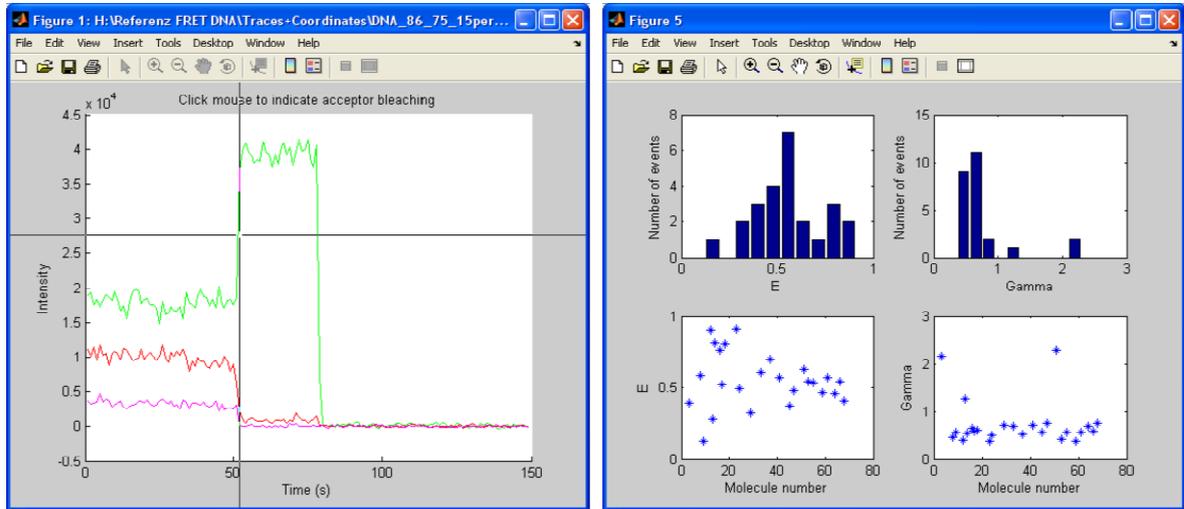


Abb. 24: Darstellung des graphischen Erscheinungsbildes zur manuellen Selektion der Bleichschritte (links) mit anschließender Zusammenfassung (rechts).

Links: Graphisch können die Punkte des Donor- und Akzeptorbleichens erfasst werden. Rechts: Bei Beendigung des Programms erscheint ein Überblick aller ausgewählten Moleküle. Es wird ein Histogramm der FRET – Effizienzen (oben links) und der Werte für den Korrekturfaktor γ (oben rechts) erstellt. Alle Werte werden auch individuell (untere Reihe) den Molekülen zugeordnet.

Bei ordnungsgemäßem Beenden nach der Analyse aller Zeitspuren wird das Ergebnis für jeden Datensatz in drei einzelnen Dateien ausgegeben. In der ersten Datei werden alle Intensitäten sowie die FRET-Effizienz aller selektierten Moleküle für jeden Zeitpunkt spaltenweise gespeichert. Zur Erstellung eines statistischen Histogramms werden in der zweiten Datei die gleichen Daten zeilenweise aneinandergereiht, jedoch nur für den Zeitraum bis zum Bleichschritt des Akzeptors, also dort, wo tatsächlich Energietransfer stattfand.

In der dritten Datei werden die für alle Zeitpunkte gemittelten FRET-Effizienzen, ihre Standardabweichungen, alle Korrekturfaktoren, alle Signalintensitäten im Durchschnitt und die ermittelte zeitliche Länge des Energietransfers und der Zeitspur selbst zeilenweise für jedes Molekül abgespeichert.

Während des Speichervorgangs erfolgt noch eine Übersicht der Ergebnisse zum eben ausgewerteten Datensatz, siehe Abb. 24, rechts. Links oben werden die gefundenen FRET-Effizienzen in einem Histogramm zusammengefaßt, während links unten diese individuell für jedes Molekül zu sehen sind. Analog ist rechts oben und unten der ermittelte Korrekturfaktor γ gezeigt.

5.7.3. Vorsortierung der Datensätze

Im Zuge der laufenden Weiterentwicklung des manuellen Programms wurde nicht zuletzt deutlich, daß häufig ungeeignete Intensitäts-Zeitspuren aus den Meßvideos extrahiert wurden.

Meßtechnisch kann dem begegnet werden, wenn mit alternierenden Anregungswellenlängen gearbeitet wird. Jedoch ist es auch leicht möglich, daß Zeitspuren zwar beide Farbstoffe zeigen, aber der Verlauf der Intensitäten auf Artefakte hinweist. Nur wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind, wie stufenartiges Bleichen oder stabile Intensitätsverläufe, kann eine Zeitspur in die Auswertung mit aufgenommen werden, weshalb im Vorfeld eine weitreichende Sortierung und Einordnung vorgenommen werden sollte. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, die Kriterien, wonach ein menschlicher Benutzer entscheidet ob eine Zeitspur analysiert werden kann, in mathematische Vorgänge zu fassen.

Die Voraussetzungen werden im folgenden zusammengefaßt und der jeweils gewählten mathematischen Grundlage zur Detektion gegenübergestellt.

- stabiles, ausreichend langes Fluoreszenzsignal des Akzeptors (keine photophysikalischen Prozesse)
- Bleichen des Akzeptorsignals in einem stufenartigen Schritt (nur ein Akzeptormolekül)
- gleichzeitiges anti-korreliertes Verhalten des Donors (Berechnung des Faktors γ)
- stabiles, ausreichend langes Fluoreszenzsignal des Donors (Berechnung des Faktors β , γ)
- Bleichen des Donorsignals in einem stufenartigen Schritt (nur ein Donormolekül)

Dazu müssen folgende Berechnungen an den Intensitäts-Zeitspuren durchgeführt werden.

- 1) Glätten der Intensitätsverläufe über Median-Filter
- 2) Normierung und Differenzierung der Zeitspuren
- 3) Detektion der lokalen Maxima und Minima in der 1.Ableitung der Donor- und Akzeptorintensitäten
- 4) Abgleich des anti-korrelierten Verhaltens des Donors zum Akzeptor
- 5) Nur bei alternierender Anregung:
 - Verifizierung des potentiellen Bleichschritts durch korreliertes Verhalten des Akzeptors bei beiden Anregungswellenlängen oder
 - Bestätigung des Akzeptors durch Detektion eines Bleichschritts bei direkter Anregung
- 6) Überprüfung des Verlaufs des Akzeptorsignals zeitlich nach potentielltem Bleichschritt
- 7) Bestimmung des Bleichschritts des Donors anhand der 1.Ableitung
- 8) Überprüfung des Verlaufs des Donorsignals vor und nach seinem Bleichen
- 9) Überprüfung der Gesamtintensität

Für die Intensitäten in den unterschiedlichen Zeitintervallen können zudem individuelle Qualitätskriterien, wie beispielsweise Standardabweichungen gewählt werden.

5.7.4. Automatisches Auswerteprogramm

Bei der Anfertigung eines Filterprogramms für die Aussortierung ungeeigneter Datensätze wurden derart umfangreiche Informationen ausgelesen bzw. anhand der Zeitspuren errechnet, daß auch eine vollautomatische Analyse ermöglicht wurde.

Diese Möglichkeit wurde genutzt, um die Extraktion der Signalintensitäten (vgl. Kapitel 5.6) sowie die Analyse zu einem Software-Gesamtpaket zu verbinden. Eine Übersicht des Erscheinungsbildes ist in Abb. 25 gegeben. Anders als bei der manuellen Analyse sind sämtliche Funktionen direkt über das Hauptfenster aufrufbar.

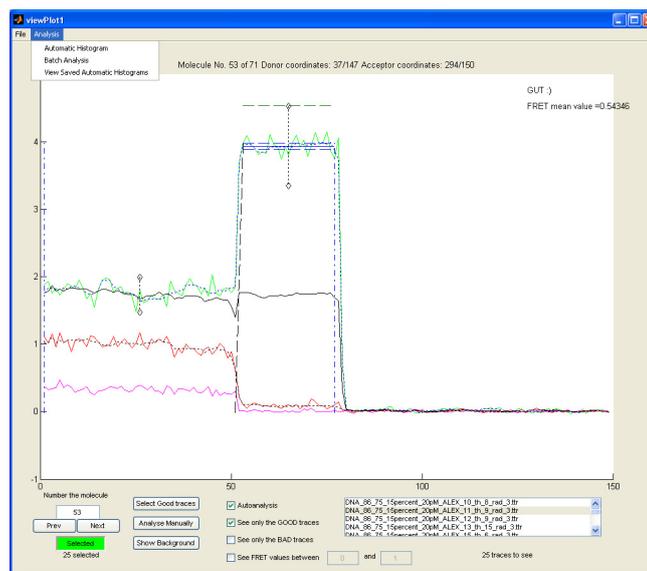


Abb. 25: Darstellung des graphischen Erscheinungsbildes zur automatischen Selektion der Bleichschritte.

Die Analyse kann auf 3 Arten erfolgen: Manuell über graphische Selektion (*Analyse Manually*), halbautomatisch über die Schaltfläche (*Autoanalysis*) und anschließender manueller Überprüfung oder vollautomatisch über den Menüpunkt *Automatic Histogram*.

Im Datenfenster erscheint die Darstellung identisch zur manuellen Auswertung (vgl. Kapitel 5.7.2). Außerdem werden mit vertikalen, gestrichelten Linien die Bezugspunkte angezeigt, blau für den Anfangs- und Endpunkt, schwarz für den Bleichschritt. Darüber hinaus wird über horizontale Linien (blau) der errechnete Mittelwert für den Bereich der Donorfluoreszenz nach dem Bleichen des Akzeptors beschrieben. Rauten, die über schwarze gestrichelte Linien miteinander verbunden sind, geben die erlaubten Standardabweichungen vom Mittelwert an. Die gemittelten Zeitspuren werden ebenfalls anhand gestrichelter Linien dargestellt. Bei der Vorsortierung erfolgt eine Eingrenzung des Datensatzes, so daß nur noch zwischen geeigneten Moleküle hin- und hergeschaltet werden muß.

Unabhängig davon kann jederzeit die automatische Bestimmung der Bleichschritte außer Kraft gesetzt werden, worauf die manuelle Analyse gestartet wird, womit eine Vorstufe der halbautomatischen Auswertung umgesetzt wird. Die vorsortierten Zeitspuren können

aber auch in eine Auswertungsroutine eingespeist werden, die das jeweilige Endergebnis oben rechts im Datenfenster anzeigt. Es können außerdem gezielt nur Moleküle mit FRET-Effizienzen in bestimmten Bereichen ausgesucht werden.

Die Dateistruktur ist bei der Analyse einzelner Datensätze identisch zur manuellen Auswertung. Bei der automatischen Methode werden alle Informationen in eine Datei gespeichert. Daher wurde die Struktur leicht verändert und um zusätzliche Informationen wie der Nummer des analysierten Moleküls ergänzt. So ist es möglich, schneller ein Molekül von Interesse erneut zu analysieren oder es in den Rohdaten wiederzufinden.

5.7.5. Überblick und Aussichten der Datenanalyse

Ein großes Teilgebiet dieser Arbeit befaßte sich mit der Analyse und der daraus folgenden Interpretation der erzielten Daten. Anfangs wurden dazu bereits bestehende Programme verwendet, die im Laufe dieser Forschung kontinuierlich weiterentwickelt wurden.

Auf der einen Seite stehen dabei die Programme, die für Ensemble-Messungen eingesetzt wurden, dabei aber nur begrenzte Datenmengen bearbeiten mußten, während auf der anderen Seite die Einzelmolekül-Messungen ein Vielfaches mehr an Daten lieferten, die es auszuwerten galt. Daher erscheint es nur logisch, daß auf die Analyse der zuletzt genannten größeres Augenmerk fiel. Im Prinzip wurden Programme immer dann eingesetzt, wenn manuelles Einlesen, Bearbeiten und Auswerten weitaus mehr Zeit beansprucht hätte als die Programmierung einer Routine. Das galt besonders für die Ensemble-Messungen, bei den Einzelmolekül-Messungen wurden trotz computergestützter Datenextraktion Großteile der Auswertung weiterhin manuell durchgeführt, bedenkt man nur die einzelne Selektion der Intensitäts-Zeitspuren. Daher war es um so mehr geboten, auch hier die Analyse weiter zu automatisieren, nicht nur der immensen Zeitersparnis wegen. Benötigte die manuelle Auswertung einer Datenreihe aus mehreren Hundert Molekülen mindestens einige Stunden, so konnte dies durch die vollautomatische Methode auf wenige Minuten reduziert werden. Selbst die halbautomatische Variante, bei der das Auswerteprogramm die Datensätze nach vordefinierten Kriterien sortierte, dauerte selbst bei vielen zu analysierenden Zeitspuren keine volle Stunde mehr. Die Unterschiede in der Selektion der geeigneten Zeitspuren lassen sich schwer beziffern, wobei die Zahl der falsch-negativen eindeutig überwiegen. Dies läßt sich leicht begründen mit der Tatsache, daß ein menschlicher Benutzer nur ungefähr abschätzen kann, in welchem Maß eine Intensitäts-Zeitspur schwankt und daher oftmals auch solche auswählt, die durch einen definierten Grenzwert ausgeschlossen worden wären. Eine ungefähre Schätzung läge etwa zwischen 5 % und 10 %. Weitaus weniger oft und somit nur vereinzelt wählt das Programm dagegen Daten, die ein menschlicher Benutzer

nicht gewählt hätte. Diese Vorgehensweise begünstigt die Aufnahme sehr hoher Datenmengen, da nur wenige falsch-positive Zeitspuren keine Artefakte bilden können.

Trotz aller Zeitersparnis sollte eine Auswertung immer offen und durchschaubar sein, weshalb die vollautomatische Auswerteroutine auf einfachen und intuitiven, aber auch gleichzeitig effektiven Kriterien beruht, die jederzeit angepaßt werden können.

Da die untersuchten Proben und Enzyme keinerlei Dynamik aufzeigten, wurde die Auswertung auch nur für statische Intensitätsverläufe optimiert. Für die Zukunft wäre es aber durchaus vorstellbar und nützlich, das Programm so weiter zu entwickeln, daß auch dynamische Systeme untersucht werden könnten. In dieser Hinsicht ist zu aller erst eine abschnittsweise Bestimmung der FRET-Effizienz nötig, um den Vorteil der Einzelmolekül-Messungen voll und ganz ausnützen zu können. In wie weit dies Überschneidungen mit beispielsweise Hidden-Markov-Modelling ergeben würde, bleibt abzusehen. In dieser Arbeit wurde Wert darauf gelegt, die Analyse bereits sichtbarer Zustände hauptsächlich zu vereinfachen und zu beschleunigen. Dies wurde mit Erfolg bewerkstelligt.

6. SSO1653

Das untersuchte Enzym SSO1653 gehört zur Familie der SWI2/SNF2 Enzyme, die im allgemeinen trotz ihrer Verschiedenheit in der Herkunft und Funktion gleiche Strukturbereiche aufweisen, die beispielsweise zur Bindung von ATP sowie der ATP-Hydrolyse nötig sind.

Kristallographische Untersuchungen an SSO1653 lieferten bereits einen Hinweis auf den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus, konnten ihn aber letzten Endes nicht unter Beweis stellen. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie wurden darauf aufbauend Experimente, größtenteils im Ensemble, durchgeführt, die diese Strukturänderung nachvollziehen sollten. Die Einzelmolekül-Spektroskopie wurde hierbei zur Verfeinerung und zur Kontrolle eingesetzt.

6.1. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das SSO1653 (SsoRad54cd) im Hinblick auf seinen zugrundeliegenden Mechanismus der ATP-Hydrolyse untersucht werden. Das Enzym zeigt wie die anderen Vertreter seiner Subfamilie die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse in Anwesenheit doppelsträngiger DNS. Die Kristallstruktur des katalytischen Kerns des Enzyms lag sowohl mit als auch ohne gebundener DNS (Abb. 26A) vor[63], wies aber nahezu keine Unterschiede auf, was jedoch einige Fragen aufwarf, die im folgenden adressiert werden sollen. Das Protein weist zwei Hauptdomänen (gelb: 1, blau: 2) auf, die jeweils eine Subdomäne (hellgelb: 1A, violett: 2A) vom Typ RecA besitzen sowie zwei Subdomänen (dunkelgelb: 1B, blau: 2B) ohne strukturelle Homologie zu bereits untersuchten Helikasen. Die Sequenzanalyse zeigt, daß sich die sieben klassischen Motive der Helikasen auf die beiden RecA-ähnlichen Domänen aufteilen. Die Motive I, Ia, II sowie III befinden sich in Domäne 1A, während Domäne 2A die Motive IV-VI beherbergt.

Zwischen beiden Hauptdomänen befindet sich eine tiefe Spalte, in der die DNS gebunden werden kann. Zwar könnte aus dieser strukturellen Ähnlichkeit des SSO1653 mit anderen Helikasen gefolgert werden, daß es auch nach demselben Mechanismus arbeitet. Bemerkenswert ist jedoch, daß die beteiligten Motive zu weit auseinander liegen, als daß sie eine Bindungsstelle für ATP bilden könnten. Die vier Motive in Subdomäne 1A sind zur

Spalte hingewandt, während die restlichen drei Motive auf der Außenseite des Proteins sitzen.

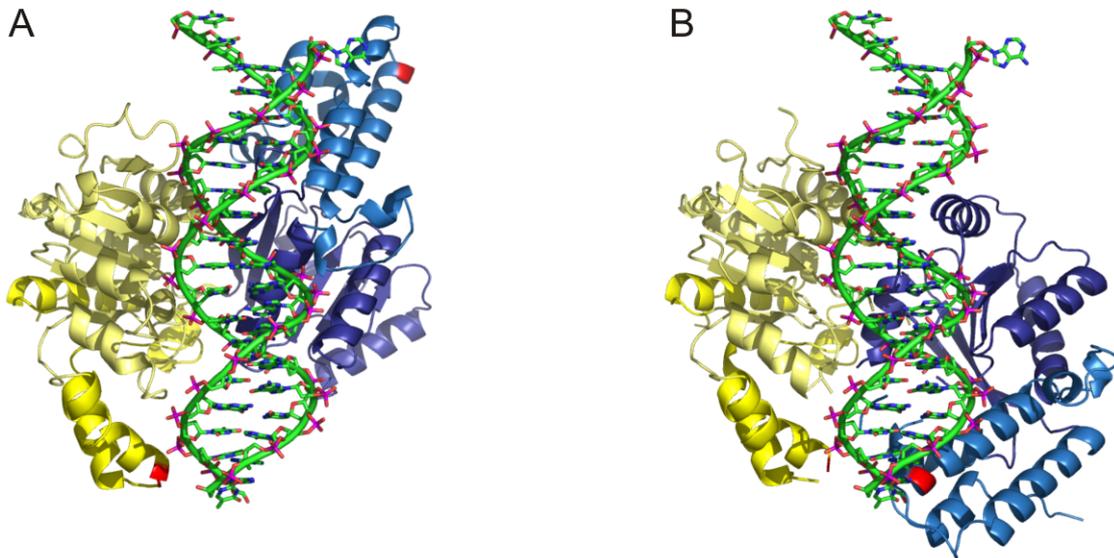


Abb. 26: Kristallstruktur des SSO1653-Mutante 2X im Komplex mit DNS (grün) in offener Konformation (A) und geschlossener Konformation (B).

(A) Abstand der beiden eingeführten Cysteine (rot) in Subdomäne 1B und 2A: $\approx 75 \text{ \AA}$. (B) Abstand der Cysteine (rot) nach postulierter Rotation von Domäne 2 (blau) um $180^\circ \approx 15 \text{ \AA}$. farbliche Legende der Domänen: 1 gelb, 2 blau. Subdomänen: 1A hellgelb, 1B dunkelgelb, 2A violett, 2B blau.

Dürr *et. al* schlugen daher ein Modell vor, in dem das an DNS gebundene Protein durch die Bindung von ATP eine Konformationsänderung vollzieht und so die zur Aktivität benötigten Domänen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden[63]. Ein Modell dieser postulierten Struktur findet sich in Abb. 26B. Hierzu wurden die beiden Domänen unabhängig voneinander mit den jeweiligen äquivalenten Strukturen von PcrA und NS3 überlagert. Dabei würde die Domäne 2 eine Rotation um 180° vollziehen und die DNS in Richtung des aktiven Zentrums schieben, worauf die Hydrolyse des ATP die Struktur wieder entspannen würde. Die beiden Domänen würden an neuen Bindungsstellen entlang der DNS anlagern, während ADP aus dem Protein entfernt wird. Das Resultat dieses Mechanismus wäre eine raupenähnliche Translokation entlang der DNS. Die vollständige Basenpaarung laut Kristallstruktur beweist auch hier, daß die DNS nicht aufgetrennt wird wie es bei einer Helikase üblich wäre. Die Konformationsänderung von einer geöffneten zu einer geschlossenen Struktur könnte vielmehr Teil einer Hubbewegung sein, eines sogenannten power strokes, der die Translokation ermöglicht. Der entscheidende Schritt in diesem Modell ist die Bindung des ATP, was letztendlich zu einer dramatischen Distanzverringerung der beiden Domänen 1B und 2B führt. Diesen Unterschied gilt es nun durch ein Experiment nachzuweisen. Stillschweigend wird dabei angenommen, daß das Protein zur effizienten Nutzung der freiwerdenden Energie einen katalytischen Kreislauf durchläuft.

Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer kurz FRET, konnte bereits erfolgreich genutzt werden, um Strukturen und Komplexe aus Proteinen und DNS zu untersuchen[183-185].

In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine adaptierte Methode auf Basis von FRET verwendet. Das grundlegende Prinzip dahinter ist, an zwei definierten Stellen im Protein zwei unterschiedliche Farbstoffe anzubringen, die zum Energietransfer fähig sind. Die beiden Positionen müssen so ausgewählt werden, daß sie in der offenen Konformation maximal weit von einander entfernt sind, in der geschlossenen Konformation jedoch so nah wie möglich. Die erwarteten FRET-Effizienzen würden sich genau invertiert verhalten und so größtmögliche relative Unterschiede aufweisen.

Es muß dabei aber betont werden, daß nicht die absoluten Distanzen von Interesse sind, da so nämlich auch im Ensemble gearbeitet werden kann. Hier können auf einfachem Weg die physiologischen Bedingungen des Wirtsorganismus des SSO1653 nachgestellt werden, zu denen in erster Linie eine Reaktionstemperatur von 60 °C zählt, die mit Einzelmolekül-Techniken wesentlich schwieriger darzustellen ist. Weil die eingangs erwähnte statistische Mittelung über dynamische Systeme und heterogene Populationen dieser Methode inhärent ist, müssen die verschiedenen Stufen des katalytischen Kreislaufs simuliert und eingefangen werden. Jeder dieser möglichen Schritte, die zu einer weiteren Konformationsänderung führen könnte, muß spektroskopisch zugänglich gemacht werden. Dazu lassen sich die Konditionen so wählen, daß das Enzym bestimmte Stadien bevorzugt, so daß zumindest Tendenzen hinsichtlich des Verhaltens individueller Moleküle erkennbar werden.

Letzten Endes sollen die vorgestellten Methoden dazu beitragen, einen Einblick in den mechano-chemischen Zyklus des SSO1653 zu gewinnen. Obwohl die Auflösung der Kristallstruktur bereits Pionierarbeit in dieser Hinsicht darstellt, kann sie keine Aussagen über eine mögliche Dynamik treffen. Durch Überlagerung der Struktur mit verwandten Enzymen der SWI2/SNF2-Klasse wurde aber gezeigt, daß eine Konformationsänderung ein unabdingbarer Teil seiner Aktivität sein muß. Genau hier setzt diese Arbeit an und versucht die bis jetzt noch ungeklärte Strukturänderung des SSO1653 spektroskopisch nachzuvollziehen.

6.2. Expression und zielgerichtete Mutagenese

Am SSO1653 mußte zur spezifischen Markierung der Subdomänen 1B und 2B jeweils ein Cystein an definierten Positionen (Abb. 26A u. B, Abb. 27 jeweils in rot) über zielgerichtete Mutagenese eingeführt werden. Die modellierte Struktur nach der Rotation der Domäne 2 um 180° zeigt eine zu erwartende Distanzänderung der beiden gewählten Aminosäuren von vormals 75 Ångstrom auf nur mehr 15 Ångstrom.

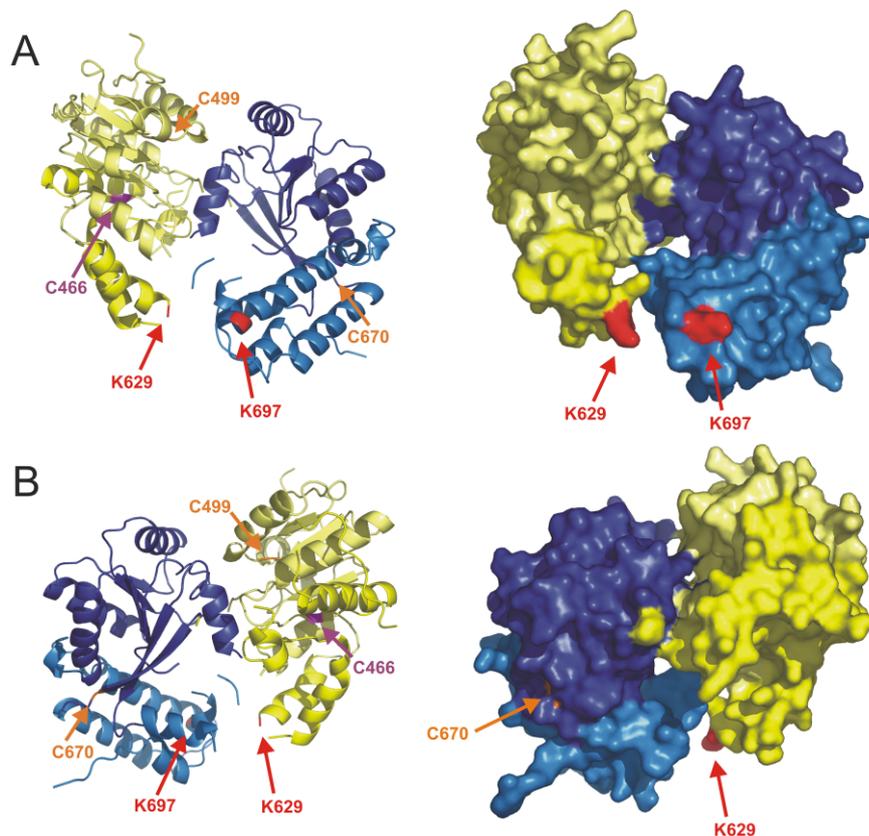


Abb. 27: Darstellung der spezifischen Bindungsstellen als Cartoon-Modelle (links) und Oberflächen-Modelle (rechts).

Eingeführte Cysteine (rot) sind von außen leicht zugänglich. Native Cysteine (orange, violett) liegen im Inneren des Enzyms, sichtbar nur in Cartoon-Modellen. Zwei Cysteine (orange) wurden bei der Mutante 4X entfernt. Das dritte Cystein (violett) wurde beibehalten außer bei der Mutante 5X. (A) Frontansicht des SSO1653-Mutante 2X. (B) Rückansicht des SSO1653-Mutante 2X. farbliche Legende der Domänen: 1 gelb, 2 blau. Subdomänen: 1A hellgelb, 1B dunkelgelb, 2A violett, 2B blau.

Da das SSO1653 auch über drei, wenn auch im Inneren gelegene und daher schwerer zugängliche, nativ vorhandene Cysteine verfügt (siehe Abb. 27 in orange) und eine Anbindung dort nicht ausgeschlossen werden konnte, mußte deren Einfluß unter Zuhilfenahme weiterer Mutanten überprüft werden. Dabei sollten mindestens zwei bzw. alle drei Cysteine durch ähnlich strukturierte Serine ersetzt werden. Nur so konnten die Ergebnisse auf Verfälschungen durch Markierung dieser nativen Cysteine überprüft werden. Negative Auswirkungen, wie verringerte Stabilität oder eingeschränkte Geschwindigkeit der ATP-

Hydrolyse, mußten jedoch dabei vermieden werden, da der zu untersuchende Konformationswechsel mit der ATPase-Aktivität einhergeht. Alle Cystein-Mutanten konnten im Prinzip mit einer Mutation der DExx-Box kombiniert werden, wodurch der ATP-gebundene Zustand zugänglich gemacht wurde. Die Mutation einer hochkonservierten Aminosäure im Walker B-Motiv von Glutaminsäure E zu Glutamin Q, also von DExx zu DQxx, führte zur vollständigen Desaktivierung der ATP-Hydrolysefähigkeit, wobei davon aber nicht die Bindung des ATP betroffen war.

Überblickend wurden also die fünf folgenden Variationen des Enzyms exprimiert und eingesetzt:

- Wildtyp (Referenz)
- Mutante 2X (jeweils 1 Cystein neu eingeführt in Domäne 1 und 2)
- Mutante 4X (Mutante 2X mit 2 ersetzten nativen Cysteinen)
- Mutante 5X (Mutante 2X mit 3 ersetzten nativen Cysteinen)
- Mutante EQ (Mutante 4X in Kombination mit DExx→DQxx-Box Mutation)

Mit Erfolg konnten so für die Mutante 2X Lysine an den Resten K629 sowie K697 ersetzt werden. Der Wildtyp verfügt jedoch bereits über drei nativ vorkommende Cystein-Reste, die im Inneren des Proteins liegen. Eine weitere Mutante 4X, in der zwei dieser drei Cysteine (C499, C670) zu Serinen getauscht wurden, wurde für zahlreiche Kontrollexperimente eingesetzt. So konnte der Einfluß dieser Aminosäuren bestimmt werden, vorausgesetzt an sie würde Farbstoff binden. Die Mutation des letzten verbliebenen Cysteins (C466) in Mutante 5X stellte sich jedoch als unbrauchbar heraus, da die Stabilität des gesamten Proteins extrem beeinträchtigt wurde. Für weiter gehende Messungen wurde daher nicht darauf zurückgegriffen. Die Mutante EQ als eine Fortführung der Mutante 4X, in der zusätzlich die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse deaktiviert wurde, konnte dagegen erfolgreich eingesetzt werden.

Ein unüberwindbarer Nachteil dieser Vorgehensweise blieb jedoch bestehen. Mit der Maleimid-Gruppe stand nur ein Reaktionstyp zur Verfügung. Folglich konnten nicht zwei Ankerpunkte mit chemisch voneinander verschiedener Reaktivität genutzt werden, weshalb die Markierung gleichzeitig und statistisch erfolgen mußte. Dabei entstanden nicht nur die gewünschte doppelt-markierte Spezies des Proteins, sondern auch Nebenprodukte, die aber aufgrund ihrer praktisch identischen chemischen wie physikalischen Eigenschaften nicht abgetrennt werden konnten. Somit erreichte man selbst im Idealfall, bedingt durch das statistische Markieren, nur eine maximale Effizienz von 50 % eines mit Donor und Akzeptor markierten Proteins. Jeweils ein Viertel der Population trug nur einen Farbstoff, dafür aber an beiden möglichen Positionen. In der Praxis wurden noch weitere Kombinationen ermöglicht, allein dadurch, daß keine vollständige Umsetzung erfolgte.

Dem mußte entgegnet werden durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen, wie einer Erhöhung der Reaktionstemperatur oder einer Anpassung des pH-Werts.

Angesichts der bereits extremen physiologischen Lebensbedingungen des Wirtsorganismus und der damit verbundenen erhöhten Stabilität des Proteins erschien dies relativ gefahrlos für die Strukturintegrität des Proteins.

6.3. Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Drei verschiedene Farbstoffe wurden an zuvor definierten und mutierten Aminosäureresten des Proteins (K629C und K697C) angebunden, deren relative Position eine größtmögliche Änderung erfahren sollte, sobald das Enzym seine aktive Konformation einnimmt.

Es stellte sich heraus, daß sechs Äquivalente an Donor Cy3 und zehn Äquivalente an Akzeptor Cy5 oder Alexa 647 eine homogene Markierung von durchschnittlich 90 % an beiden Farbstoffen ermöglichte. Beide eingeführten Cysteine waren sehr reaktiv, es reichte also aus, einen leicht alkalischen pH-Wert von 8.0 während der Reaktion einzustellen. Die Reaktionstemperatur wurde auf 37 °C eingestellt, was nach Aufreinigung zu einer Gesamtausbeute von nahezu 95 % führte. Nicht umgesetzter Farbstoff konnte mit Hilfe der Size-Exclusion-Chromatographie vollständig bzw. unterhalb der Nachweisgrenze (Absorption < 0.02) abgetrennt werden. Die Markierungseffizienzen wurden spektrometrisch anhand der Absorption des Proteins und der Farbstoffe bestimmt (siehe Kapitel A.4). Die vorgestellten Bedingungen wurden also nach Gesichtspunkten optimiert, die einerseits eine hohe Rückgewinnung des Proteins bei gleichzeitig hoher Markierungseffizienz mit beiden Farbstoffen erzielten. Somit konnte man für die spätere Analyse von einer rein statistischen Verteilung der Farbstoff-Paare ausgehen. Durch die erfolgreiche Anbindung zweier unterschiedlicher Donor-Akzeptor-Paare konnte auch deren Einfluß auf den FRET-Prozeß untersucht werden.

Andere Farbstoffe wie Atto532, Alexa 546 oder Atto647N erwiesen sich in der Anbindung als weniger tauglich, weshalb auf ihren weiteren Einsatz für die Ensemble-FRET-Messungen verzichtet wurde. Scheinbar war die chemische Struktur inkompatibel, was zu hohen Verlusten an Protein (> 80 %) bei der Markierungsreaktion führte.

Außerdem zeigte sich, daß, vermutlich zurückzuführen auf das größere konjugierte π -Elektronensystem und somit der Struktur der Akzeptoren, die Anbindung bei Gebrauch gleicher Äquivalente an Farbstoff meist in Markierungsverhältnissen zu Gunsten des Donors resultierte. Der hohe Umsetzungsgrad war nicht zuletzt zurückzuführen auf eine vor den jeweiligen Markierungsreaktionen vorgeschaltete Aufreinigung mit Hilfe der Size-Exclusion-Chromatographie (siehe Kapitel A.4). Ohne Aufreinigung konnten bei identischen Reaktionsbedingungen nur verhältnismäßig niedrige Ausbeuten (40 - 60 %) erzielt

werden, wobei auch die Markierungseffizienz deutlich sank ($< 70\%$ pro Farbstoff). Als mögliche Erklärung für die verringerte Markierungseffizienz mag unvollständig abgetrenntes DTT stehen, das nach dem Zellaufschluß und während der Aufreinigung des Proteins zugesetzt wurde, was selbst als reaktiver Partner für die Maleimid-Gruppe dienen kann. Daß ein Großteil des eingesetzten Proteins verloren ging, kann es jedoch nicht erklären. Die Erhöhung der Temperatur kann ebenfalls nicht ausschlaggebend sein, da das Protein im Wirtsorganismus üblicherweise Temperaturen größer als 60 °C ausgesetzt ist. Die Aufreinigung beinhaltet sogar eine zehninütige Erwärmung auf 65 °C (Hitzeschritt) zur Abtrennung endogener Proteine aus *E. coli*. Ein alternatives Abzentrifugieren bei $20.000 \times g$ führte dagegen nicht zum Erfolg, was gegen eine Agglomeration des Enzyms spricht. Lediglich die Erhöhung des pH-Werts von 5.5 bei nativen Bedingungen zu 8.0 könnte ursächlich sein. Dagegen ist anzuführen, daß bei Vorschaltung einer Aufreinigung dies keinen Einfluß zeigte und auch die Kristalle von *Dürr et al.* zum Teil bei Bedingungen zwischen 7.0 und 8.5 erzeugt worden waren[63]. Möglich ist auch, daß das Protein während des Schockgefrierens mittels flüssigen Stickstoffs an Stabilität verlor, was jedoch noch kein makroskopisches Ausfällen der Proteinlösung hervorrief.

6.4. Aktivitätstests

Die Verwendung von Biomol Green verspricht zwar eine schnelle und verlässliche Methode zur Bestimmung der Phosphatkonzentration zu sein, jedoch nur bei strikter Einhaltung der vom Hersteller vorgeschriebenen Protokolle. Diese sehen aber eine gewisse Grundkenntnis vor in Bezug auf die zu bestimmende Menge an Phosphat. Das liegt hauptsächlich an der Natur des eingesetzten Farbstoffs und seiner Reaktion mit freien Phosphationen [186]. Der während der Reaktion entstehende Komplex aus Phosphomolybdat und Farbstoff muß durch Detergenzien wie Tween-20 oder Sterox in Lösung gehalten werden, da er andernfalls präzipitiert. Analog dazu wird die Sensitivität eingeschränkt, wenn das Verhältnis von Farbstoff- zu Phosphatmenge wächst. Das bedeutet, daß nur in einem bestimmten Bereich linear gemessen werden kann, wodurch bei der Untersuchung von noch unbekanntem Proteinen daher zwangsweise erst Vorexperimente durchgeführt werden müssen, um die eigentlichen Testbedingungen sowie ein entsprechendes Protokoll erstellen zu können.

Die Mindestmenge und der anschließende lineare Bereich hängen in erster Linie vom Verhältnis des eingesetzten Volumens des Reagenz zur Phosphatmenge ab. Laut Hersteller kann bei 1 ml verwendetem Reagenz und einem Probenvolumen von $100\text{ }\mu\text{l}$ eine Phosphatmenge von 0.5 nmol bis 8 nmol linear aufgelöst werden.

Weniger zugesetztes Biomol Green, nämlich 100 μl bei einem Probenvolumen von 50 μl lassen die Sensitivität folglich steigen auf Kosten der Dynamik. Der lineare Bereich verläuft dann von minimal 31.25 pmol bis maximal 2 nmol Phosphat-Ionen. Die Angabe der Stoffmenge anstelle der realen Konzentrationsverhältnisse dient der Verallgemeinerung für unterschiedliche Probenvolumina, erfordert aber eine relativ genaue Kenntnis der umgesetzten Menge ATP zu ADP und Phosphat-Ionen, damit die zugesetzte Menge an Reagenz korrekt eingestellt werden kann. Es muß noch erwähnt werden, daß bei kleinen eingesetzten Volumina des Reagenz Ungenauigkeiten im Pipettieren zu großen systematischen Fehlern, bis hin zu 15 %, führen können. Als zuverlässig erwies sich ein Probenvolumen von 50 μl zu dem 500 μl Biomol Green addiert wurde. Die Proteinmenge und Reaktionszeit wurden dann entsprechend variiert.

Generell stellte sich bei dieser Art der Phosphatbestimmung heraus, daß das Reagenz unempfindlich war gegenüber der Probenzusammensetzung und des verwendeten Puffersystems, jedoch korrelierte der Test sehr stark mit der Inkubationszeit des Reagenz mit der Probe bzw. mit freiem Phosphat. Daher mußten sämtliche Experimente zeitlich sehr genau aufeinander und zur Kalibrationskurve abgestimmt werden. Eine derartige Eichgerade ist in der folgenden Abbildung (Abb. 28) zu sehen.

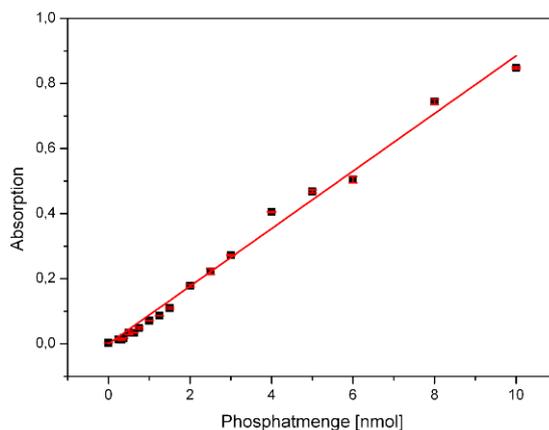


Abb. 28: Kalibrationsgerade von Biomol Green zur Bestimmung der Phosphatmenge.

Die Standardabweichung (2 - 3 %) zweier unabhängiger Messungen wird mit einem Fehlerbalken (rot) dargestellt. Reproduzierbarkeit ist gegeben, aber systematische Fehler treten auf (4 - 6 nmol).

Obwohl einzelne Meßwerte mit einer Standardabweichung zwischen zwei bis drei Prozent reproduziert werden können, weicht ihr absolutes Ergebnis bis zu 7 - 13 % von einer linearen Ausgleichsgeraden ab für mittlere Phosphatmengen von vier bis sechs Nanomol.

Die größtmögliche Aktivität des Enzyms zeigte sich im Vorfeld bei 60 °C und einem pH-Wert von 5.5. Daher sollten diese Bedingungen auch hier primär eingesetzt werden. Dennoch mußte auch im Hinblick auf Einzelmolekül-Experimente die Aktivität bei Raumtemperatur bestimmt werden. Daneben galt es alle Mutanten vor und nach der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen zu prüfen.

Die anschließenden Messungen am Wildtyp des SSO1653 förderten erstaunliche Ergebnisse zu Tage. Es ergaben sich, wie laut Tab. 1 ersichtlich, Aktivitäten von weit mehr als 1000 ATP pro Minute und Proteinmolekül. Bei einer Temperatur von 60 °C war die Aktivität derart hoch, daß das Protein auf so geringe Konzentrationen verdünnt werden mußte, daß ein möglicher Fehler größtenteils von diesem Verdünnungsschritt abhing. Die Hydrolyse einfach kürzer durchzuführen, hätte allein nicht ausgereicht, um im linearen Bereich des Biomol Green zu bleiben.

ATPase-Aktivitäten [ATP min ⁻¹ Proteinmolekül ⁻¹]					
Verhältnis DNS : Protein	Wildtyp	Mutante 2X	Mutante 4X	Mutante 5X	Mutante EQ
20 : 1	1680 ± 70	1250 ± 100	20 ± 5	15 ± 10	≤ 5
≤ 2 : 1	1130 ± 130 (1:2)	190 ± 5 (1:1)	5 ± 5 (2:1)	-	≤ 5 (1:2)

Tab. 1: ATPase-Aktivitäten von SSO1653 und Mutanten hiervon (nicht-markiert, pH 5.5, 60 °C).
Die Einführung von Mutationen führt zur Verringerung der ATPase-Aktivität. Für volle Aktivität muß ein Überschuß an DNS vorhanden sein. Der Fehler ergibt sich aus der Mittelung von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

Dies gilt jedoch ausschließlich für einen pH-Wert von 5.5, der dem Milieu des Wirtsorganismus weitaus besser entspricht als 7.5, bei dem die Aufreinigung des Proteins stattfand. Messungen bei diesem pH-Wert ließen die Hydrolyse-Geschwindigkeit auf unter 100 ATP pro Minute und Protein sinken. Eine Reduzierung auf Raumtemperatur ließ die Hydrolysegeschwindigkeit in beiden Fällen unter die Detektionsgrenze von etwa 5 ATP pro Minute und Protein fallen, weshalb die FRET-Messungen ebenfalls bei 60 °C und einem pH-Wert von 5.5 durchgeführt wurden.

Eine Tendenz, die sich abzeichnete, war der Verlust an Aktivität mit Zunahme der Mutationen im Protein. Zeigte die Mutante 2X noch weitgehend vergleichbare Aktivität gegenüber dem Wildtyp, so führten die beiden zusätzlichen Mutationen in der Mutante 4X zu einem drastischen Einbruch in der Hydrolysegeschwindigkeit um etwa den Faktor 30. Eine Erklärung liefert die unmittelbare Nachbarschaft zum aktiven Zentrum, das anscheinend für seine volle Funktionsfähigkeit auf die beiden Cysteine angewiesen ist. Wie später noch gezeigt wird, wurde die Bindungsaffinität des Proteins jedoch nicht beeinflusst (vgl. Kapitel 6.5). Die Mutation des letzten verbliebenen Cysteins ließ die ATPase-Aktivität dann auf unter 15 ATP pro Minute und Proteinmolekül fallen. Abgesehen davon führte diese Veränderung zu einer starken Einschränkung der Stabilität des Proteins, was durch erhöhte Agglomeration deutlich wurde. Unterschritten wurde seine Aktivität nur noch von der Mutante EQ, die naturgemäß Aktivitäten bis an die Detektionsgrenze lieferte.

Die Aktivität wurde aber auch sehr stark bestimmt vom eingesetzten DNS-Substrat und seiner Konzentration im Verhältnis zum Protein. So ergaben sich generell höhere Umsätze

bzw. Hydrolysegeschwindigkeiten beim Einsatz höherer DNS zu Protein Konzentrationen. Die Ergebnisse in Tab. 1 sind zusammengefaßt für das DNS-Substrat polydA-polydT, das auch in den Fluoreszenz-Messungen verwendet wurde. Abweichend dazu wurden auch Messungen der Aktivität an bakterieller Phagen-DNS (λ -DNS) sowie an einem synthetischen Oligonukleotid mit 100 Basenpaaren durchgeführt. Während sich im Rahmen der Meßgenauigkeit ein identisches Bild für das Oligonukleotid zeigte, so unterschieden sich die Reaktionsgeschwindigkeiten für λ -DNS doch deutlich. Das Protein zeigte durchwegs wesentlich niedrigere Aktivitäten, im Fall des Wildtyps etwa um den Faktor 7 herabgesetzt.

Eine Erklärungsmöglichkeit ist die völlig verschiedene Länge der DNS-Stränge. Bei der poly-dA-polydT-DNS handelt es sich um ein heterogenes Gemisch an einzel- und doppelsträngigen polydA- und polydT-Strängen mit einer mittleren Länge von etwa 230 Basenpaaren. Die λ -DNS hingegen ist eine homogene, zirkuläre, doppelsträngige DNS mit mehr als 48.000 Basenpaaren. Geht man aus von einer identischen Affinität des Proteins zu beiden DNS, so befänden sich auf der λ -DNS über 200-fach mehr Bindungsstellen. Bei einer derart dichten Besiedelung wäre eine gegenseitige Wechselwirkung der Enzyme nicht auszuschließen. Zwei Möglichkeiten bieten sich dabei an, entweder, daß durch Besetzung benachbarter Bindungsstellen die Proteine sich gegenseitig sterisch behindern oder, daß die Aktivität des Proteins verbunden ist mit einer Verwindung oder Verdrehung der DNS, die um so schwieriger und energetisch aufwendiger würde, je mehr Proteine bereits an einem Strang arbeiten würden. Daß sich das rein rechnerische Teilen eines DNS-Strangs durch mehrere Proteinmoleküle negativ auf die Aktivität auswirkt, sieht man auch an den Daten, die mit einer niedrigeren poly-dA-poly-dT-DNS Konzentration im Verhältnis zum Protein erzielt wurden.

Die Aktivität nach der Anbindung der Fluoreszenz-Farbstoffe wurde ebenfalls bei identischen Bedingungen (pH 5.5, 60 °C) untersucht. Da die Messungen nur mit Mutanten und nicht mit dem Wildtyp durchgeführt werden konnten, wurde auf einen Vergleich verzichtet. Die Mutante 2X büßt ihre Aktivität leicht ein auf etwa 1060 ± 70 ATP-Äquivalente pro Minute und Protein, während die Mutante 4X leider etwas mehr fällt auf rund 10 ± 5 ATP pro Minute und Enzym.

Beides läßt sich möglicherweise durch Farbstoff-Anbindung im Inneren des Proteins erklären. Gebundene Farbstoffe an den inneren Cysteinen der Mutante 2X scheinen denselben negativen Effekt auf die Aktivität zu besitzen wie eine Mutation zur Mutante 4X. Analog dazu verhält sich das letzte freie Cystein bei der Mutante 4X. Eine Reaktion daran führt zu ähnlich niedrigen Werten in der Aktivität wie sie die Mutante 5X von vornherein zeigt. Da die Effizienz der Farbstoff-Markierung immer deutlich unterhalb der maximalen 500 % für die Mutante 2X bzw. 300 % für die Mutante 4X lag, kann man davon ausgehen, daß nur ein kleiner Bruchteil der Enzyme mehr als die gewünschten zwei Farbstoffe trug, wobei aber

die Anbindung an die spezifisch vorgesehenen Stellen den größten Anteil an einer Absenkung der Aktivität ausmachte.

Es läßt sich mit Sicherheit feststellen, daß die nativ vorkommenden Cysteine relevante Aufgaben erfüllen und somit essentiell für die Funktion des Enzyms sind. Aus diesem Grund wurde für die Messungen die Mutante 2X eingesetzt, da dort sowohl Veränderungen in der Aminosäuresequenz wie auch die Farbstoff-Anbindung keinen nennenswerten Aktivitätsverlust zur Folge hatten. In Kombination hiermit wurde auch die Mutante EQ verwendet, die Daten speziell aus Nukleotid-gebundenen, aber nicht hydrolysierten Stadien liefern sollte. Die Mutante 4X wurde lediglich verwendet, um Auswirkungen auf die Fluoreszenz-Messungen zu zeigen, die die Farbstoffe im Inneren des Proteins hätten ausüben können. Auf den Einsatz der Mutante 5X wurde wegen ihrer Instabilität und der damit verbundenen außerordentlich niedrigen Aktivität verzichtet.

6.5. Bestimmung einer Bindungskonstante an DNS

Neben der Messung von Fluoreszenz-Spektren, die für die Berechnung der FRET-Effizienzen zwischen den Donor- und Akzeptor-Paaren am Enzym nötig waren, wurden auch Experimente zur Fluoreszenz-Depolarisation bzw. Anisotropie durchgeführt. Der theoretische Hintergrund und somit die Gründe für die Wahl der Methode wurde eingangs der Methodik in Kapitel 3.3 kurz umrissen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 29) werden die Resultate zweier typischer Anisotropiemessungen bei Raumtemperatur und 40 °C unter Verwendung des Farbstoffs TAMRA gezeigt.

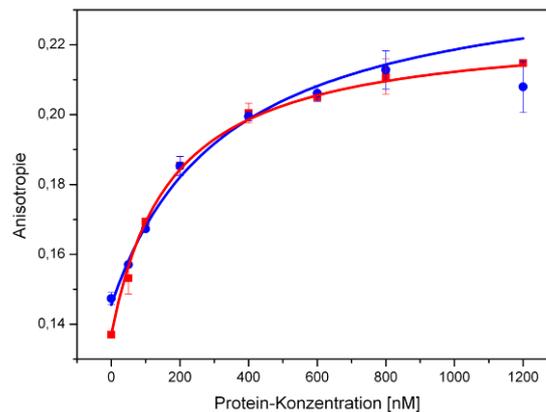


Abb. 29: Darstellung der Anisotropie eines mit TAMRA markierten Oligomers als Funktion der zugegebenen Proteinkonzentration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d .

Die Kurven zeigen charakteristisches Sättigungsverhalten bei hohen Proteinkonzentrationen. Die Dissoziationskonstante sinkt bei einer Temperatur von 40 °C (rot) im Gegensatz zur Raumtemperatur (blau). Die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen wird mit Fehlerbalken dargestellt. Der Verlauf wird beschrieben über Gleichung Gl. 46.

Zur Darstellung wurde der Mittelwert aus zwei jeweils zwei Messungen über sämtliche Anisotropie-Werte im Bereich zwischen 570 nm und 610 nm gebildet. Zumal die Anisotropie nicht von der Emissionswellenlänge abhängt, konnte so der Fehler bedingt durch Signalrauschen aufgrund limitierter Integrationszeit vermindert werden.

Man sieht sofort das Sättigungsverhalten der Kurven bei Zunahme der Proteinkonzentration. Die Messungen wurden mit dem Wildtyp ohne Nukleotide durchgeführt, die Mutante 4X zeigte trotz ihrer wesentlich reduzierten Aktivität das gleiche Verhalten. Jeweils zwei Datensätze flossen in die Analyse ein, deren Ergebnisse dann global mittels einer modifizierten Funktion nach Hill (Gl. 46) beschrieben werden konnten.

$$r_{Probe} = r_{Ref} + \frac{(r_{100\%} - r_{Ref}) \cdot P_{total}^n}{K_d^n + P_{total}^n}$$

Gl. 46

Die Modifizierung wurde notwendig, da bei der gewählten Methode nur eine gemittelte Anisotropie gemessen wird, von welcher die Werte der ungebundenen DNS als Hintergrund abgezogen werden muß. r_{Probe} steht für den Meßwert der untersuchten Probe, r_{Ref} ist konstant und gibt die Anisotropie an, die die Probe vor der Zugabe von Protein aufweist. $r_{100\%}$ wird aus einer Extrapolation erhalten und beschreibt die Proteinkonzentration in der Sättigung. P ist die eingesetzte Protein-Konzentration in nM, K_d ist die gesuchte Dissoziationskonstante und n steht für den Hill-Koeffizienten. Da kein kooperatives Verhalten zu Grunde liegt, wurde der Koeffizient fix auf 1 gestellt. Selbst als freier Parameter wurde sein Wert nie auf mehr als 1.38 berechnet.

Die Dissoziationskonstante bei Raumtemperatur wurde somit auf 334 ± 33 nM bestimmt. Die Abweichung kommt durch die globale Beschreibung zweier unabhängiger Messungen zustande und ist als Maß für die Reproduzierbarkeit aufzufassen.

Es zeigte sich außerdem, daß die Wahl des eingesetzten Farbstoffs eine nicht unerhebliche Rolle für die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d spielte. Während die Anisotropie von freier DNS bei beiden verwendeten Farbstoffen (TAMRA, Alexa 546) ähnliche Werte lieferte, zeigten die Daten mit Alexa 546 trotz seiner höheren Fluoreszenz-Lebenszeit keinerlei Korrelation mit der zugegebenen Menge an Protein, selbst bei Proteinkonzentrationen im Sättigungsbereich.

Hier kann argumentiert werden, daß in der Literatur bereits Strukturen mit TAMRA an DNS aufgeklärt wurden, die eindeutig zeigen, daß eine endständige Positionierung des Farbstoffs zu einer Anlagerung an die DNS ähnlich einer weiteren Base führt[177]. Alexa 546 scheint dazu nicht in der Lage zu sein, daher stammen wohl auch die größere Flexibilität und die daraus resultierende unbeeinflusste Anisotropie. Aus diesem Grund wurden sämtliche Messungen ausschließlich mit TAMRA durchgeführt. Dem ebenfalls bekannten Problem des Fluoreszenz-Auslöschens bei TAMRA durch benachbarte Guanosin-Basen

wurde erfolgreich begegnet durch Verwendung der anderen drei Basen in der Nähe des Befestigungspunkts an der DNS.

Da das Protein bei einer Temperatur von 60 °C seine höchste Aktivität zeigte, mußte auch das Bindungsverhalten bei höheren Temperaturen überprüft werden. Bei dem verwendeten doppelsträngigen Oligomer mit nur 25 Basen Länge erwies sich dies als schwierig, da sich bei Temperaturen über 40 °C erhöhte Fluktuationen in der DNS-Struktur, insbesondere der endständigen Basen bzw. des daran angelagerten Farbstoffs bemerkbar machten. Diese zusätzliche Flexibilität ließ die Depolarisation unkontrollierbar und wenig reproduzierbar werden.

Eine Erklärung wären die Hybridisierungs- bzw. Schmelztemperaturen der DNS-Doppelhelix, die bei ähnlich hohen Temperaturen liegen. Eine theoretische Berechnung zeigte bei Erhöhung der Temperatur dagegen kaum einen Einfluß auf die zu erwarteten Anisotropien, obwohl nach der Gleichung von *Perrin* die Rotations-Korrelations-Zeit mit steigender Temperatur abnimmt (vgl. Methodik Kapitel 3.3). Beispielsweise nimmt die Anisotropie für ein doppelsträngiges Oligomer mit 25 Basenpaaren (16.5 kDa) bei Verwendung von TAMRA (2.2 ns) um durchschnittlich 13.5 % ab, wenn die Temperatur von 25 °C über 40 °C bis hin zu 60 °C erhöht wird. Dabei spielt weniger die absolute Temperaturerhöhung eine Rolle, sondern vielmehr die verringerte Viskosität des Wassers, dessen Parameter in erster Näherung für den eingesetzten Puffer verwendet wurden. Bei höheren Molekulargewichten des Oligomers fällt der Unterschied entsprechend geringer aus.

Der Temperatureinfluß wurde dementsprechend neben Raumtemperatur auch bei 40 °C gemessen. Die Auswirkung der Temperaturerhöhung ist bereits beim Vergleich der Startwerte der Kurven für Raumtemperatur und 40 °C erkennbar. Die DNS rotiert bei höherer Temperatur schneller und verringert wie erwartet die Anisotropie. Zudem erkennt man auch die verringerte Dissoziationskonstante bzw. die erhöhte Bindungsaffinität. Die Berechnung ergab für 40 °C einen Wert von 174 nM \pm 4 nM. Diese Erhöhung bedeutet eine Stimulation der Bindung bei hohen Temperaturen, möglicherweise zusammenhängend mit der archae-bakteriellen Struktur des Proteins, das im Prinzip auf noch höhere Temperaturen hin optimiert ist.

Der Rückgang der Anisotropie bei der höchsten Proteinkonzentration ist zurückzuführen auf eine generelle Tendenz der Agglomeration des Proteins bei der Zugabe sehr hoher Proteinmengen überhalb 1.5 μ M. Dieses Artefakt trat sehr negativ in Erscheinung bei der Zugabe von Nukleotiden, da es nämlich schon bei geringeren Konzentrationen des Proteins weit unterhalb des Sättigungspunkts zur visuell überprüfaren Aggregatbildung kam. Die Aggregate waren aber keinesfalls denaturiertes Protein, da sie durch Zugabe von EDTA (5 mM) reversibel in Lösung gebracht werden konnten. Die Messungen führten jedoch augenscheinlich nicht zu dem oben gesehenen Sättigungsverhalten.

Graphisch wird dieser Vorgang in Abb. 30 gezeigt. Verwunderlich ist dabei, daß sogar der Referenzwert für die Anisotropie des Oligomers, bevor noch Protein zugegeben wurde, unterschritten wird. Möglicherweise ist dieses Verhalten auch das Resultat einer Vergrößerung der optischen Dichte und dadurch bedingter Streuung emittierter Photonen. Untersuchungen lieferten einen linearen Zusammenhang zwischen steigender optischer Dichte und Verringerung der gemessenen Anisotropie[187].

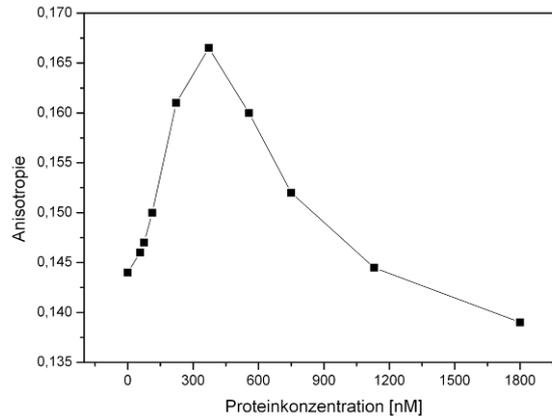


Abb. 30: Darstellung der Anisotropie eines mit TAMRA markierten Oligomers als Funktion der zugegebenen Proteinkonzentration in Anwesenheit von ATP.

Mit zunehmender Proteinkonzentration steigt die Kurve anfangs zwar, fällt dann aber stetig ohne ein Sättigungsverhalten zu zeigen. Bei sehr hohen Konzentrationen wird der Anfangswert (0 nM Protein) unterschritten. Der Verlauf kann nicht über Gleichung Gl. 46 beschrieben werden. Die Meßpunkte wurden nur der besseren Sichtbarkeit halber verbunden.

Um dennoch Dissoziationskonstanten bestimmen zu können, wurde eine alternative Methode entwickelt. Da zumindest noch bei niedrigen Proteinmengen eine Zunahme der Anisotropie verfolgt werden konnte, wurde die Proteinkonzentration innerhalb dieses Bereichs festgesetzt, nämlich bei K_d und bei $0.5 \times K_d$. Gäbe man nun Nukleotide im Überschuß zu, so der Gedanke, wäre eine Zunahme der Bindung und der entsprechende Anstieg der Anisotropie am einfachsten zu verfolgen. Das Protein-DNS Verhältnis bei K_d gilt als sensitivster Punkt, wobei aber immer noch eine ausreichende Dynamik nach oben hin gewährleistet würde, für den Fall, daß Aggregate gebildet würden.

Die so bestimmten Anisotropie-Werte r_{probe} konnten dann in eine Umformung der Hill-Gleichung eingesetzt werden (Gl. 47) unter Beibehaltung der zuvor berechneten Parameter bis auf K_d selbst. Die Proteinkonzentration ist unterdessen bekannt.

$$K_d = \left(\frac{(r_{100\%} - r_{Ref}) \cdot P_{total}^n}{r_{Probe} - r_{Ref}} - P_{total}^n \right)^{1/n}$$

Gl. 47

Alle bestimmten Dissoziationskonstanten mit ihrem aus der mathematischen Beschreibung errechneten Fehler sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Dissoziationskonstanten K_d [nM]		
Eingesetztes Substrat	Wildtyp (25 °C)	Wildtyp (40 °C)
+ DNS	334 ± 33	174 ± 4
+ DNS + ATP	223 ± 33	61 ± 9
+ DNS + ADP	190 ± 9	73 ± 15

Tab. 2: Übersicht aller bestimmten Dissoziationskonstanten des SSO1653-Wildtyp.

Zugabe von Nukleotiden senkt die Dissoziationskonstante genauso wie Erhöhung der Temperatur von 25 °C auf 40 °C.

Die Werte zeigen einen deutlichen Anstieg der Bindungsaffinität nach der Zugabe von ATP und ADP unabhängig von der Temperatur. Das wiederum bedeutet, daß das Protein möglicherweise in Anwesenheit von Nukleotiden zur Bindung an die DNS stimuliert wird, d.h. die Bindungsrate k_{on} würde steigen. Das bedeutet, daß im Mittel mehr Proteine an der DNS gebunden sind, weil ein Teil davon durch einen langsamen Schritt, wie z.B. durch die Abgabe der Phosphatgruppe, von der Trennung gehemmt wird. k_{off} bliebe dabei unverändert.

Möglich wäre auch, daß das Protein gezielt von der Ablösung der DNS gehemmt wird. ADP würde also ein Absenken der Rate k_{off} bewirken. Dies wäre nützlich für ein Protein, das auf der DNS einen gerichteten Prozeß durchführt, wie superhelikale Torsion einzuführen oder um sich auf der DNS fortzubewegen. Durch das verhinderte Weggehen von der DNS bliebe genug Zeit für einen Austausch mit neuem ATP. Andernfalls würde die Prozessivität sinken, da das Protein nach jedem Hydrolysevorgang erneut binden müßte. Eine Verlängerung des eingesetzten DNS-Strangs könnte dieses Problem umgehen. Jedoch müßte dann auf Einzelmolekül-Anisotropie Messungen zurückgegriffen werden, da dort Mehrfachbindungen, die bei den gewählten DNS-Konzentrationen zwangsläufig auftreten, auch als solche detektiert werden können.

6.5.1. Übersicht der Bindungsverhältnisse von Protein zu DNS

Es soll kurz eine Aufstellung (Tab. 3) folgen, die zeigt, wie viele Proteine bzw. wie viel der DNS sich in den einzelnen Meßmethoden im gebundenen Zustand befinden.

Die DNS Konzentration bei den Ensemble-FRET-Messungen beträgt pro Molekül etwa 120 nM. Die Länge der DNS ist jedoch mindestens 230 Basenpaare, was die effektive DNS-Konzentration verneunfacht, da etwa neun Mal mehr Bindungsstellen (min. 25 Basenpaare) vorhanden sind. Daraus resultiert bei den gewählten Bedingungen zwangsläufig eine

Mehrfachbindung an ein und denselben Strang. Daß mehr als zwei Enzyme auf einer DNS binden werden, wird aber um so unwahrscheinlicher für jedes bereits gebundene Protein.

Die Einzelmolekül-TIRF-Mikroskopie kann keine Bindungsverhältnisse nennen, denn es werden nur die Moleküle betrachtet, die ein Signal geben, also gebunden sein müssen. Nominell wären das somit 100 %. Die Einzelmolekül-FRET-Methode sowie die Ensemble-Methode bieten also eher die Möglichkeit, das Protein im gebundenen Zustand zu untersuchen. Technisch bedingt werden bei der Burst-Analyse auch Einzelmoleküle vermessen, weshalb sich hier eine geringere Bindungsquote höchstens im Verhältnis der einzelnen Verteilungen widerspiegelt, aber es nicht zu einem Mittelwert in der Gesamtverteilung kommen wird.

Bindungsverhältnisse in eingesetzten Meßmethoden		
Meßmethode	Anteil gebundenen Proteins	Anteil gebundener DNS
Ensemble-FRET ($K_d \leq 174$ nM, DNS 120 nM, Protein 250 nM)	83 %	173 % ¹
Burst Analyse (K_d 333 nM, DNS 200 nM, Protein 20 pM)	38 %	0,0038 %
Einzelmolekül-FRET (K_d 333 nM, DNS 200 pM, Protein 500 pM)	k. A. ²	k. A. ³

Tab. 3: Übersicht der Bindungsverhältnisse bei den durchgeführten Meßmethoden.

Hohe Anteile an gebundenem Protein sind außer im Ensemble auch bei den Einzelmolekül-TIRF-Messungen möglich, aber nicht quantitativ bestimmbar^{2,3}.

6.6. Ensemble-Messungen

Um den Nachweis zu erbringen, daß das SSO1653 eine Konformationsänderung vollziehen kann, wurden Fluoreszenz-Messungen durchgeführt. Die dabei auftretende strukturelle Veränderung sollte nämlich einhergehen mit einem drastischen Zuwachs an FRET, zumal sich die Distanz zwischen den ausgewählten Ankerpunkten der Farbstoffe größtmöglich verringert.

Es ist klar, daß ein Enzym nur seine katalytische Funktion wahrnehmen kann, wenn es im Laufe der Reaktion wieder in den Ursprungszustand zurückkehrt.

¹ Aufgrund der Länge der eingesetzten polydA-polydT-DNS (≈ 230 bp) ergibt sich automatisch die Möglichkeit einer Mehrfachbindung (min. 25 bp Bindungsstelle).

² Bei Vernachlässigung unspezifischer Wechselwirkungen stammt jedes untersuchte Signal von einem gebundenen Protein.

³ Nur beim Einsatz einer dritten Farbe bestimmbar, was aber den FRET-Prozeß im Protein beeinflussen könnte.

Es müssen also endlich viele Schritte existieren. Außerdem muß vom Protein ein gerichteter Prozeß bzw. eine geordnete Arbeit verrichtet werden, d. h., es kann nicht denselben Weg zurückgehen, über den es für seine Konformationsänderung hergekommen ist. Anders formuliert, kann die postulierte Rotation der Domäne 2 im SSO1653 nicht wieder durch eine einfache Drehung in die Gegenrichtung aufgehoben werden. Es müssen entweder andere Punkte durchlaufen werden oder aber ein Schritt muß irreversibel sein, wie zum Beispiel eine Translokation des Enzyms an der DNS entlang einer Vorzugsrichtung mit anschließender Neuordnung bzw. erneuter Konformationsänderung vor der eigentlichen Rückkehr in den Anfangszustand.

Für eine möglichst weitreichende und umfangreiche Beschreibung der möglichen Zustände des SSO1653 mußten also in erster Linie Fluoreszenz-Emissionsspektren bei verschiedenen ausgewählten Bedingungen aufgezeichnet werden, die die verschiedenen Zustände bzw. Stadien während seines Reaktionszyklus simulieren sollten. Es war somit keineswegs ausreichend, das Protein ausschließlich in An- und Abwesenheit seines Substrats DNS sowie mit und ohne ATP zu vermessen.

Im Folgenden können vier grundlegende Unterteilungen getroffen werden, die sich nach dem Bindungszustand des Proteins einteilen lassen.

- ungebunden ohne Substrat (keine DNS, keine Nukleotide)
- gebunden am Substrat (DNS, keine Nukleotide)
- gebunden am Substrat prä-hydrolytisch (DNS, ATP oder Analoga)
- gebunden am Substrat post-hydrolytisch (DNS, ADP oder Analoga)

Dazu können bis zu acht verschiedene Meßbedingungen erstellt werden, die sich hauptsächlich nach der Art des gewählten Nukleotids richten. So sind neben herkömmlichem ATP schwer- und nicht-hydrolysierbare Analoga genauso einsetzbar wie Analoga, die zusammen mit ADP Übergangszustände und posthydrolytische Zustände simulieren. γ -S-ATP[188] sowie AMP-PNP[189, 190] sind als Analoga des ATP bekannt und können wie dieses gebunden, aber nur schwer bzw. überhaupt nicht hydrolysiert werden. Der Übergangszustand aus ADP und Phosphat kann nur über den Umweg und die Zuhilfenahme von Phosphatanaloga dargestellt werden. Die bekanntesten hierbei sind Trialuminiumfluorid AlF_3 bzw. Tetraaluminiumfluorid AlF_4^- [191] sowie das Vanadat-Ion VO_4^{3-} [192, 193]. Beide Substanzen bilden abhängig vom pH-Wert unterschiedlich koordinierte Strukturen, was sich jedoch im Fall des Aluminiumfluorids nicht auf die Strukturen der assoziierten Proteine auswirkt[194]. Beim Vanadat-Ion dagegen liegt bei einem pH-Wert unter 6.0 eine Dekavanadat-Spezies vor, die als Phosphat analog unbrauchbar ist[195], weshalb nicht darauf zurückgegriffen werden konnte. Der posthydrolytische Zustand läßt sich hingegen einfach durch Addition von ADP simulieren.

Eine kurze Auflistung soll den möglichen Nutzen bzw. die erwartete Konformation vorstellen.

- Protein alleine: Vergleichsmessung des freien, ungebundenen Proteins
- Protein + DNS: Bestimmung des Protein-DNS Komplexes, unterschiedliche DNS-Substrate möglich (polydA-polydT-DNS, λ -DNS)
- Protein + DNS + ATP: Konformationsänderung durch Binden des ATP, von Hydrolyse beeinflusst
- Protein + DNS + γ -S-ATP: ATP-gebundener Zustand, schwer-hydrolysierbar
- Protein + DNS + AMP-PNP: ATP-gebundener Zustand, nicht-hydrolysierbar
- Protein + DNS + ADP + AlF_3 : Übergangszustand
- Protein + DNS + ADP: post-hydrolytischer Zustand des Proteins

6.6.1. FRET-Messungen an Mutante 2X

Anhand etablierter Analysemethoden konnte dann eine Auswertung stattfinden. Die daraus extrahierten FRET-Effizienzen bzw. ihre relativen Unterschiede gaben sodann Aufschluß über die erwarteten Konformationsänderungen.

Abb. 31 zeigt die Resultate der Fluoreszenz-Messungen der Mutante 2X.

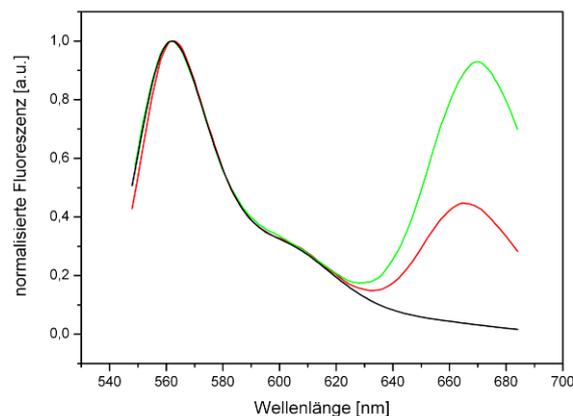


Abb. 31: Normalisierte Fluoreszenz-Emissionsspektren des SSO1653-Mutante 2X-Cy3Cy5 bei Anregung des Donors Cy3.

Das mit Donor und Akzeptor markierte Protein ohne DNS weist nur eine geringe Akzeptor-Fluoreszenz um 670 nm auf (rot). Nach der Addition von DNS ist ein hoher Zuwachs der Akzeptor-Fluoreszenz zu beobachten (grün). Ein Spektrum zur Korrektur des spektralen Übersprechens der Donor-Fluoreszenz zeigt kaum Fluoreszenz im Bereich des Akzeptors (schwarz).

Sofort ersichtlich ist der enorme Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz (um 670 nm) in Anwesenheit von DNS (grüne Kurve) im Vergleich zum Protein alleine (rote Kurve). Das Protein alleine weist eine weitaus niedrigere Fluoreszenz im Bereich des Akzeptors auf. Dabei ist das spektrale Übersprechen der Donor-Fluoreszenz in den Akzeptorbereich zu vernachlässigen, wie eine Probe mit Donor alleine ohne Akzeptor deutlich zeigt (schwarze Kurve).

Die direkte Anregung des Akzeptors jedoch ist nicht zu unterschätzen, weshalb eine einfache Betrachtung der Spektren zum Trugschluß führen kann, sofern nicht wie in diesem Fall nur Substrat zugegeben wird. Schön zu erkennen ist auch der genaue Überlapp der Spektren und der Emissionsmaxima.

Ausgehend von diesen Spektren und unter Zuhilfenahme der zuvor beschriebenen Analyseverfahren nach Clegg und Ebricht (Kapitel 5.1) sowie der dort aufgeführten Korrekturen lassen sich die FRET-Effizienzen bestimmen. Abb. 32 faßt die weiteren Ergebnisse der FRET-Effizienzen für drei ausgewählte Meßreihen der Mutante 2X zusammen. Die Effizienzen wurden hierfür auf den Mittelwert der Proben mit DNS normalisiert, um einen möglichen Einfluß durch unterschiedliche Probenpräparation auszuschließen. Die absoluten FRET-Effizienzen wiesen nämlich eine nicht zu vernachlässigende Streuung von einer Präparation zur nächsten auf, vermutlich hervorgerufen durch Schwankungen der Stabilität nach der Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen, die die Konzentrationsverhältnisse beeinflussten und damit die Anteile an aktiv gebundenem Protein. Darüber hinaus werden aus den FRET-Effizienzen keine Distanzen berechnet, sondern in erster Linie relative Veränderungen betrachtet.

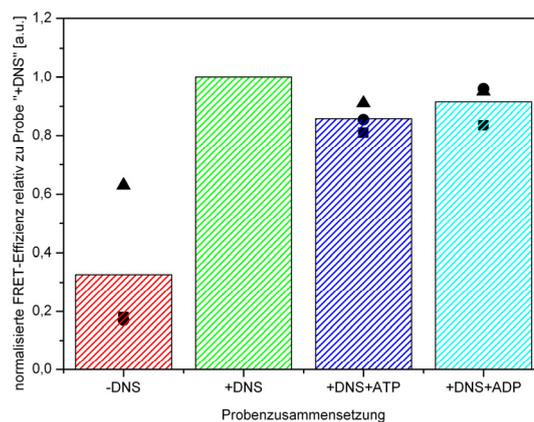


Abb. 32: Übersicht der FRET-Effizienzen für SSO1653-Mutante 2X in Abhängigkeit des zugesetzten Substrats.

Alle Werte wurden auf die Probe „Protein + DNS“ normalisiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von je drei unabhängigen Messungen (▲■●) mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung. Das Protein ohne DNS (rot) erreicht eine geringe FRET-Effizienz (33 %), die sich bei Addition von DNS (grün) verdreifacht. Durch weiteres Zufügen von ATP (blau) oder ADP (cyan) verringert sich die FRET-Effizienz leicht auf 85 % bzw. 92 %.

Wie erwartet fällt die FRET-Effizienz mit knapp 33 % für das Protein alleine (rot) relativ niedrig aus. Ohne Zugabe von Nukleotiden oder Analoga sollte die aus der Kristallstruktur bekannte offene Konformation eingenommen werden, wobei eine relativ niedrige FRET-Effizienz zu erwarten wäre. Beim Protein alleine wird deutlich, daß seine Struktur relativ flexibel ist und damit nicht nur eine offene, sondern auch eine vergleichbar geschlossene Form annehmen kann (Abb. 32 ●■ vs. ▲). Man darf aber nicht vergessen, daß im Ensemble

diese Flexibilität herausgemittelt werden müßte. Da dennoch ein stabiler Wert von 63 % (▲) erreicht wird, kann nur an einer irreversiblen Strukturänderung liegen. Dennoch sind auch Proteine in dieser Konformation fähig, die beiden Farbstoffe näher zueinander zu bringen, wie die Erhöhung der FRET-Effizienz um den Faktor drei bei Zugabe von DNS zeigt (grün). In Anwesenheit von DNS nämlich steigt die FRET-Effizienz dramatisch an, in Einklang mit der Vorstellung, daß das Enzym eine geschlossene Konformation einnimmt.

Dies steht aber im Widerspruch zur Kristallstruktur, die auch nach der Bindung an ein Oligonukleotid weiterhin die offene Konformation zeigt. Für den Fall, daß das Protein auch im gebundenen Zustand eine hohe Flexibilität aufweisen würde, wäre es denkbar, daß die Kristallstruktur nur eine von vielen möglichen Zuständen stabilisiert hatte, während die hier gezeigten FRET-Messungen den Durchschnitt dieser Zustände wiedergeben.

Die DNS-gebundene Konformation gilt zumindest als Referenz und wird auch in der Effizienz nicht durch die Addition von ATP (blau) übertroffen, d. h. der entscheidende Schritt für die strukturelle Reorientierung findet bei der DNS-Bindung statt ungleich des zuvor aufgestellten Postulats von *Dürr et al.*. Im Gegenteil sinkt die FRET-Effizienz im Rahmen der Meßgenauigkeit sogar leicht auf einen Wert von 85 % auf ein ähnlich niedriges Niveau wie die Probe mit ADP (cyan) bei 92 %. Beide Werte liegen zwar eindeutig überhalb des Proteins ohne Substrat und unterhalb der Referenz, sie können aber nicht ohne weiteres auf die Anwesenheit einer dritten, halb-geschlossenen Konformation zurückgeführt werden.

Wie im Vorfeld Experimente gezeigt hatten, kann aber eine verringerte Affinität gegenüber der DNS ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 6.5). Theoretisch würde dies zu mehr ungebundenem Protein führen und so die mittlere gemessene FRET-Effizienz verringern. Statt dessen bestimmen zwei weitere Interpretationsmöglichkeiten die bis jetzt aufgeführten Ergebnisse. Obwohl die Ratenkonstanten für die Zustandsübergänge unbekannt sind, muß gefragt werden, ob nicht eine hohe Aktivität und damit eine rasche Hydrolyse die Aufnahme des ATP-gebundenen Zustands bei der Mutante 2X verhindert, so daß prinzipiell nur der langlebigste Zustand im Laufe des Zyklus gemessen wird. Dies muß nicht zwangsweise der ADP-gebundene Zustand sein. Dieser postulierte Zustand kann jedoch über eine eigene Lebenszeit verfügen, bei dem die Domänen eine intermediäre Distanz zueinander aufweisen, er kann sich aber auch über Veränderungen der Gleichgewichtskonstante ergeben. Abhängig von der Hydrolysegeschwindigkeit sowie weiterer posthydrolytischer Zustände wie auch des zeitlich vor der ATP-Bindung eingenommenen Zustands wird ein Mittelwert aller auftretenden FRET-Effizienzen aufgenommen.

Eine Möglichkeit für das zeitliche Einfangen des ATP-gebundenen Zustands ist die Verwendung nicht-hydrolysierbarer Analoga des ATP. Wie sich herausstellen sollte, lieferten die Analoga γ -S-ATP und AMP-PNP jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse. Vermutlich wirkte sich die chemische Veränderung des Triphosphatrests mit Schwefel und Stickstoff negativ auf das Bindungsverhalten aus.

Ihre Größen ändert sich im Vergleich zum ATP nämlich kaum[189, 196]. Um den ATP-gebundenen Zustand näher untersuchen zu können und um dadurch den langlebigsten Zustand besser eingrenzen zu können, wurden also FRET-Messungen mit der Mutante EQ durchgeführt. Die Mutante EQ wurde hierzu so verändert, daß sie nur noch in der Lage ist, ATP zu binden, nicht aber es zu hydrolysieren. Darüber hinaus wurden zwei der drei nativ vorkommenden Cysteine durch Serine ersetzt, um wie bei der Mutante 4X Effekte durch Binden des Farbstoffs an diesen Positionen zu minimieren.

In Abb. 33 findet sich ein generell ähnliches Ergebnis wie es bei der Mutante 2X zu sehen war. Das Protein alleine (rot) zeigt eine mittlere bis niedrige FRET-Effizienz mit 58 % im Vergleich zur Probe mit DNS (grün), bei der sich die FRET-Effizienz nahezu verdoppelt. Die große Flexibilität, die sich in zwei unterschiedlichen aber fixen Abständen der untersuchten Subdomänen widerspiegelt, läßt sich in der Streuung der drei Datenreihen (Abb. 33 ■ vs. ●▲) sehr gut erkennen. Auch hier wurde die Messung mit DNS als Referenz gesetzt, um von gleichen Bindungsverhältnissen des Proteins zur DNS ausgehen zu können.

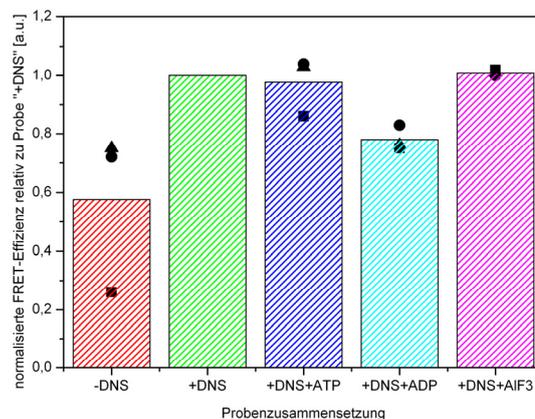


Abb. 33: Übersicht der FRET-Effizienzen für SSO1653-Mutante EQ in Abhängigkeit des zugesetzten Substrats.

Alle Werte wurden auf die Probe „Protein + DNS“ normalisiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von je drei unabhängigen Messungen (▲■●) mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung. Das Protein ohne DNS (rot) erreicht eine geringe FRET-Effizienz (58 %), die sich bei Addition von DNS (grün) verdoppelt. Durch weiteres Zufügen von ATP (blau) verringert sich die FRET-Effizienz kaum (98 %), während die Zugabe von ADP (cyan) ein starkes Absinken verursacht (78 %). Addition von ADP/AIF₃ (magenta) führt zu einer sehr hohen FRET-Effizienz (101 %).

Der erste Unterschied fällt bei der Addition von ATP (blau) auf, nach welcher die FRET-Effizienz (98 %) nicht unter die Referenz sinkt, wie im Fall der Mutante 2X. Ebenso wenig ändert sich der Wert des Komplexes ADP/AIF₃ (magenta) in Höhe von 101 %, der den Übergangszustand imitieren soll. Beides deutet daraufhin, daß weder die Bindung des ATP noch der Übergangszustand ausschlaggebend sind für die Verringerung der FRET-Effizienz, wie es noch bei der Mutante 2X in Anwesenheit von Nukleotiden beobachtet werden konnte.

Anders formuliert scheinen sowohl der ATP-gebundene Zustand wie auch der Übergangszustand bei der Hydrolyse eine geschlossene Konformation zu besitzen. Wird nun ADP (cyan) eingesetzt, so sinken die FRET-Werte wieder ab (78 %) zwischen den von gebundenem Protein an DNS (grün) und Protein alleine (rot).

Es stellt sich nun die Frage, ob bei der Zugabe von ATP zur Mutante 2X nicht vielmehr der ADP-gebundene Zustand gemessen wurde. Dazu müssen nur beide relativen FRET-Effizienzen verglichen werden, die offensichtlich sehr nahe zusammen liegen. Der Grund für die unterschiedlichen Werte der Probe „+DNS+ATP“ der Mutante 2X (85 %) und der Probe „+DNS+ADP“ (78 %) der Mutante EQ mag am Mitteln liegen, hervorgerufen durch das Ensemble-System. Teilweise existieren nämlich Spezies, wenn auch nur kurz, die ATP gebunden haben und eine sehr hohe FRET-Effizienz (98 %) nahe der Referenz aufweisen. Teilweise wird der Wert durch den niedrigeren Wert des ADP-gebundenen Zustands (78 %) gedrückt. Das bedeutet, sowohl die ATP-Bindung wie auch die Hydrolyse finden in einem derart kleinen Zeitrahmen statt, daß bei einem sehr aktiven Protein im Mittel nur der offensichtlich langlebigere Zustand danach ermittelt werden kann. Somit führt zur strukturellen Änderung und damit zu den niedrigeren FRET-Effizienzen in der Mutante 2X entweder ein spätes Stadium der Hydrolyse oder aber die Abgabe des Phosphat-Ions.

Das Ensemble-Verfahren stieß jedoch im weiteren Verlauf an seine Grenzen, die nur Einzelmolekül-Techniken überwinden konnten. Es galt herauszufinden, ob der Zustand mit gebundenem ADP einen festen intermediären Abstand der Domänen besitzt oder ob Änderungen der Gleichgewichtskonstante zwischen der offenen bzw. der geschlossenen Konformation einen mittleren gemessenen Wert ergeben.

6.6.2. FRET-Kontrollmessungen

Obwohl die Mutante 2X des SSO1653 über ebenso hohe Aktivität wie der Wildtyp verfügte, gab es einen Nachteil, dessen Einfluß untersucht und ausgeschlossen werden mußte. Da im Wildtyp wie auch in der Mutante 2X drei weitere native Cysteine enthalten sind, kam es zu einer Nebenreaktion der Farbstoffe mit diesen Aminosäuren, was wiederum zu möglicherweise unkontrollierbaren und unvorhersehbaren Ergebnissen in den FRET-Messungen hätte führen können. Zwar sind diese Aminosäuren, wie in Abb. 27 zu sehen, tief im Inneren des Enzyms eingebettet, was den Zugang der Farbstoffe deutlich erschwert. Jedoch konnten beim Markieren des Enzyms Ausbeuten in der Umsetzung von über 200 % relativ zu den beiden durch Mutagenese eingeführten Cysteinen erzielt werden. Es liegt nahe, daß an die Reste im Inneren zu einem kleinen Teil ebenfalls Farbstoff binden konnte. Die eingesetzte Michael-Addition an die Thiolgruppe kann bei den gewählten Bedingungen sehr spezifisch durchgeführt werden, weshalb eine Anbindung an z.B. Lysine nahezu ausgeschlossen werden kann.

6.6.3. Einfluß der nativen Cysteine

Um das Problem der Nebenmarkierung der nativen Cysteine zu umgehen, wurde die Mutante 4X eingesetzt, in der nur noch ein natürliches Cystein vorkommt. Die Entfernung des letzten Cysteins führte zu merklicher Instabilität des Proteins und dadurch bedingten schlechten Ausbeuten bei der Farbstoffmarkierung.

In Abb. 34 sind die Ergebnisse zu sehen, die aufgrund der eingeschränkten ATPase-Aktivität der Mutante 4X vergleichbar sein sollten mit denen der Mutante EQ. Dennoch ist das Protein aktiv und in der Lage ATP zu hydrolysieren, entspricht aber in dieser Hinsicht bei weitem nicht der Mutante 2X. Auch hier liegen die Werte für die FRET-Effizienz des Proteins alleine (rot) weit unterhalb der Referenz (58 %). Das Protein bindet genauso wie die beiden anderen Mutanten an DNS (grün), was beinahe zu einer Verdoppelung der FRET-Effizienz führt. Nach der Zugabe von ATP (blau) bleibt das Niveau konstant (103 %), sieht man von der vergleichsweise größeren Streuung der Daten ab. Ähnlich wie die Mutante EQ wird ein sehr hoher Wert gemessen, der von einem großen Anteil an ATP-gebundenem Enzym stammt. Durch die reduzierte Aktivität liegt ein ähnlich großer Anteil vor, welcher das ATP erst noch hydrolysiert. Der FRET-Wert für ADP (cyan) liegt erwartungsgemäß wieder zwischen dem Protein alleine und der Referenz (89 %).

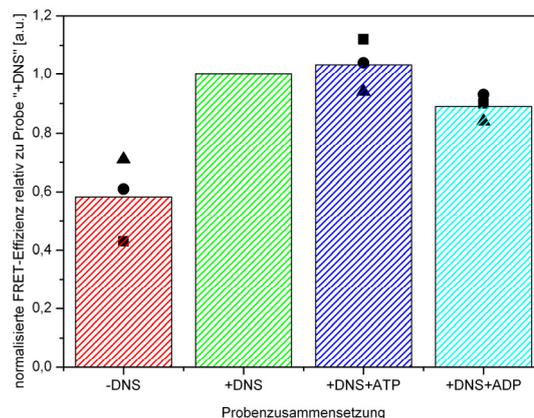


Abb. 34: Übersicht der FRET-Effizienzen für SSO1653-Mutante 4X in Abhängigkeit des zugesetzten Substrats.

Alle Werte wurden auf die Probe „Protein + DNS“ normalisiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von je drei unabhängigen Messungen (▲■●) mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung. Das Protein ohne DNS (rot) erreicht eine geringe FRET-Effizienz (58 %), die sich bei Addition von DNS (grün) verdoppelt. Durch weiteres Zufügen von ATP (blau) erhöht sich die FRET-Effizienz unmerklich (103 %), während die Zugabe von ADP (cyan) ein starkes Absinken verursacht (89 %).

Damit läßt sich eindeutig zeigen, daß der drastische Zuwachs an FRET-Effizienz nach der Bindung an DNS nicht durch ein mögliches Markieren im Inneren des Proteins beeinflußt wurde. Möglicherweise ist der Resonanztransfer zwischen einem im Inneren und ei-

nem an den gewünschten Positionen außen gebundenen Farbstoff durch andere Effekte, wie die Orientierung der Dipole zueinander, geschwächt oder ganz unterdrückt.

6.6.4. Einfluß der Fluorophore

Eine weitere mögliche Fehlerquelle, die untersucht wurde, war der Einfluß der gewählten Farbstoffe. Im Prinzip ist der Resonanztransfer nach Förster unabhängig von der chemischen Struktur der Fluorophore, sofern andere Parameter wie spektraler Überlapp der Akzeptor-Absorption und der Donor-Emission oder Quantenausbeuten übereinstimmen, kurz gesagt der Förster-Radius gleich bleibt.

Die Berechnung des Förster-Radius wurde anhand der Software PhotochemCad[197, 198] durchgeführt unter Einbeziehung von Literaturwerten zur Quantenausbeute des Donors[199]. Bei einer Quantenausbeute von 4 %⁴ ergibt sich in Kombination mit Cy5 ein Förster-Radius von 42 Ångstrom bzw. 40 Ångstrom im Fall von Alexa 647. Dazu gilt anzumerken, daß sich die chemische Struktur durchaus indirekt bemerkbar machen kann, indem sich zum Beispiel die Quantenausbeute oder auch die freie Drehbarkeit durch Anlagerung an die Proteinoberfläche verändert, was dann seinerseits Auswirkungen auf den Förster-Radius mit sich bringt[200, 201].

Die aufwendige und mit vielen Fehlerquellen behaftete Bestimmung der Quantenausbeute des Donors nach der Anbindung an das Protein erübrigt sich jedoch, wenn nur der Akzeptor gewechselt wird. So muß nur weiterhin die freie Drehbarkeit des Donors und des Akzeptors gewährleistet sein, die über Messungen der Anisotropie bestimmt werden kann. Dies ist aber nur sinnvoll für Farbstoffe mit einer Fluoreszenz-Lebenszeit von 1 ns und länger (siehe Kapitel 3.3, Abb. 14). Cy3 auf der anderen Seite zeigt wegen seiner sehr kurzen Lebenszeit von 0.3 ns immer eine erhöhte Anisotropie. Bei Anbindung an die Mutante 4X ergibt sich für die Anisotropie ein Wert von 0.24. Messungen für Cy5 zeigen dagegen eine sehr niedrige Anisotropie von 0.09. Beide Messungen wurden jeweils mit ausschließlich einheitlich markiertem Enzym bei Raumtemperatur ohne Zusatz von Substrat aufgenommen. In der geschlossenen Konformation wäre es sehr wahrscheinlich das die Farbstoffe über Resonanztransfer miteinander interagieren und dadurch die Anisotropie verringert würde. Für den Akzeptor kann zumindest von einer relativ freien Anbindung ausgegangen werden. Zusätzliche Fluktuationen bei 60 °C können überdies verstärkt auftreten.

Es wurden daher Versuche unternommen, die Mutante 4X mit anderen Farbstoffen als alternativem Akzeptor zu Cy5 zu markieren wie beispielsweise Alexa 647. Wie die Abb. 35 zeigt, ergeben auch die FRET-Messungen mit Cy3 / Alexa 647 ein identisches Bild zu den Messungen mit Cy3 / Cy5 (Abb. 34).

⁴ Sonstige verwendete Parameter: Brechungsindex des Mediums: 1.33, Orientierungsfaktor $\kappa^2 = \frac{2}{3}$, $\epsilon(\text{Cy5})_{649 \text{ nm}} = 250.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{Alexa647})_{650 \text{ nm}} = 239.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Das Protein alleine (rot) weist die geringste FRET-Effizienz auf (49 %), was die offene Konformation bestätigt. Nach Zugabe von DNS (grün) steigt die FRET-Effizienz rapide an und bleibt auch nach der weiteren Addition von ATP (blau) hoch (97 %). Wie bereits bei der Cy3 / Cy5 Kombination erwähnt, zeigt die Mutante 4X eine niedrigere Aktivität gegenüber der Mutante 2X. Daher verweilt ein größerer Anteil der Proteine im ATP-gebundenen Zustand. Der Wert für ADP (cyan) fällt hingegen auf einen vergleichbaren Prozentsatz unter die Referenz (75 %), befindet sich aber noch überhalb des ungebundenen Proteins.

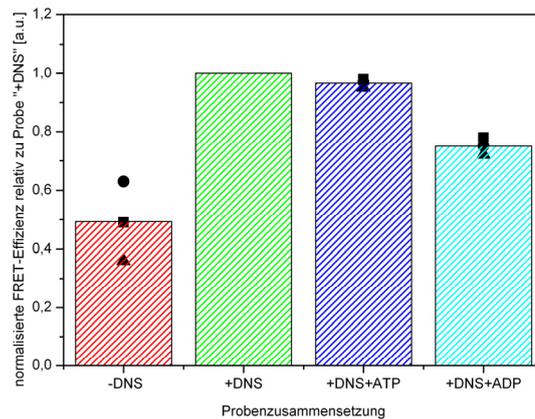


Abb. 35: Übersicht der FRET-Effizienzen für SSO1653-Mutante 4X Cy3-Alexa647 in Abhängigkeit des zugesetzten Substrats.

Alle Werte wurden auf die Probe „Protein + DNS“ normalisiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von je drei unabhängigen Messungen (▲■●) mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung. Das Protein ohne DNS (rot) erreicht eine geringe FRET-Effizienz (49 %), die sich bei Addition von DNS (grün) verdoppelt. Durch weiteres Zufügen von ATP (blau) bleibt die FRET-Effizienz unverändert (97 %), während die Zugabe von ADP (cyan) ein starkes Absinken verursacht (75 %).

Somit ergibt sich ein identisches Bild im Vergleich zur Markierung mit Cy5. Weitergehende Untersuchungen lieferten ein analoges Verhalten von Alexa 647, auch bei der Verwendung an den restlichen Mutanten. Alexa 647 konnte wie Cy5 bei identischen Bedingungen an das Protein gebunden werden. Es ließen sich somit vergleichbar hohe Umsetzungsraten über 90 % mit einer Markierungseffizienz von 95 % im Vergleich zu Cy3 erzielen. Ob dies an der Beibehaltung der Grundstruktur von Cy5, wie in Abb. 36 gezeigt, liegt, kann angesichts des patentrechtlichen Schutzes von Alexa 647 nicht beurteilt werden.

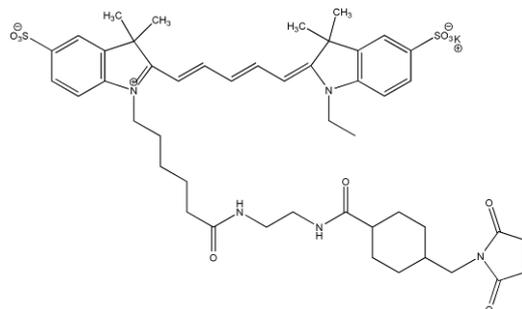


Abb. 36: Strukturformel von Cy5-Maleimid[202].

Versuche mit einem zweiten Farbstoffpaar, Atto 532 und Atto 647, führten indes zur Aggregation des Proteins während der Markierungsreaktion, wohl wegen der leicht apolaren Bedingungen, die zur vollständigen Löslichkeit des Atto 647 nötig sind und mit Hilfe von DMSO erzielt wurden. Ähnlich negative Effekte hatte auch der Einsatz von DMF beim Binden von Cy3 und Cy5, die in rein wässriger Lösung hervorragende Umsetzungsraten lieferten.

6.6.5. Übersicht der Ensemble-FRET-Messungen

Nachfolgend werden in Tab. 4 alle gemessenen FRET-Effizienzen der einzelnen Meßreihen aufgeführt.

FRET-Effizienzen normalisiert auf Probe „Protein+DNS“				
Zusammensetzung	Mutante 2X	Mutante EQ	Mutante 4X	Mutante 4X Cy3-Alexa647
- DNS	33 %	58 %	58 %	49 %
+ DNS	100 %	100 %	100 %	100 %
+ DNS + ATP	85 %	98 %	103 %	97 %
+ DNS + ADP	92 %	78 %	89 %	75 %
+ DNS + ADP + AIF ₃	-	101 %	-	-

Tab. 4: Übersicht der FRET-Effizienzen aller gemessenen Mutanten des SSO1653.

6.7. Einzelmolekül-Messungen

Aufgrund der bereits erwähnten Problematik, daß das SSO1653 seine höchste Aktivität bei 60 °C zeigte, wurde der Mechanismus größtenteils mit Hilfe der Ensemble-Technik untersucht werden. Die durchgeführten Ensemble-FRET-Messungen zeigten eindeutig, daß das Protein im ungebundenen Zustand eine offene Konformation besitzt, die in Anwesenheit von DNS und der darauf folgenden Bindung in eine geschlossene übergeht. Außerdem zeigten diese Versuche, daß weder die Bindung des ATP noch die Hydrolyse verantwortlich waren für ein Zurückklappen in eine scheinbar intermediäre Konformation.

Vielmehr schien die Abgabe des Phosphats, die Ursache für die weitere Veränderung der Struktur zu sein. Eine Frage, die mit diesen Untersuchungen jedoch nicht eindeutig beantwortet werden konnte, war, ob es sich bei dabei um eine dritte Konformation handelte oder ob Verschiebungen im Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Struktur dafür verantwortlich waren. Der Unterschied, der am besten über den Vergleich der Mut-

ante 2X mit der Mutante EQ deutlich wird, hätte nämlich genauso über dynamische Bewegungen der Subdomänen entstanden sein können.

Die Grenzen der Ensemble-Methode, die durch die Mittelung der FRET-Effizienzen entstanden, waren somit erreicht, worauf Einzelmolekül-Experimente eingesetzt werden mußten, auch wenn die Reaktionsbedingungen nicht vollständig übernommen werden konnten. Durch die Messung einzelner Moleküle bei einer schnellen Ausleserate (≈ 100 ms) wurden verschiedene Zustände voneinander unterscheidbar, aber auch Dynamik konnte sichtbar gemacht werden. Die Grundsätze, daß Zustände festgehalten werden können, gelten aber auch hier. Somit können auch äquivalente Substrate wie ATP-Analoga oder Phosphatanaloga eingesetzt werden, um das Protein in unterschiedlichen Bindungsverhältnissen zu beobachten. Hierzu kam das in Kapitel 4ff aufgeführte TIRF-Mikroskop zum Einsatz zusammen mit der entsprechenden Analyse der Einzelmolekül-Daten wie sie in Kapitel 5.7 für das Rad26 ausführlich beschrieben wird. Die biochemischen Vorbereitungen wurden ebenfalls analog zum Rad26 durchgeführt (siehe Kapitel 3ff).

6.7.1. FRET-Messungen am TIRF-Mikroskop

Sowohl das Protein alleine wie auch das an DNS gebundene Enzym wurden auf Quarzglas-Oberflächen immobilisiert und mit einem Mikroskop visualisiert, das auf der Basis der totalen internen Reflexion arbeitet. Abb. 37A zeigt den typischen Intensitätsverlauf der Fluoreszenz von Donor Cy3 und Akzeptor Alexa 647 in Abhängigkeit der Zeit für das an DNS gebundene Enzym, während in Abb. 37B die Fluoreszenz am Enzym ohne gebundene DNS zu sehen ist.

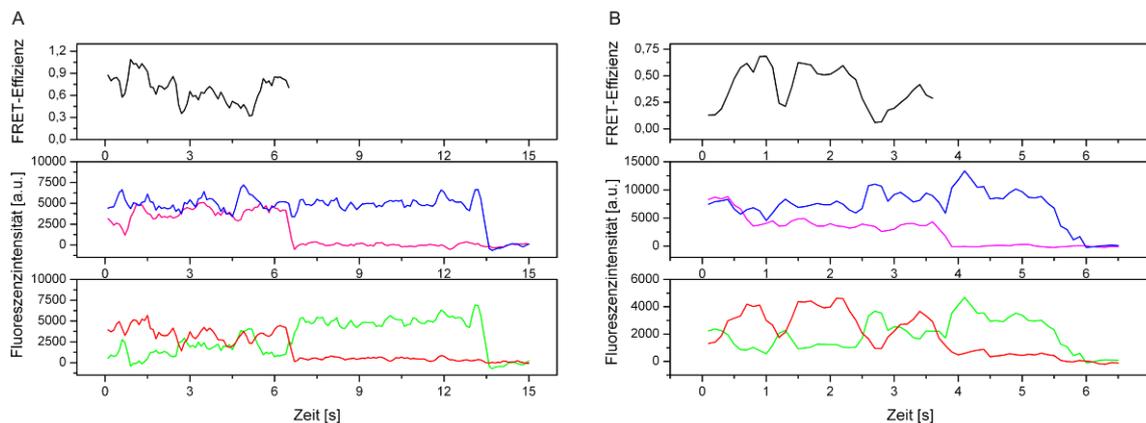


Abb. 37: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Zeit (unten und mitte) sowie der FRET-Effizienz (oben). (Filterbreite 3 Punkte)

(A) SSO1653 gebunden an DNS zeigt durchweg hohe, stark fluktuierende FRET-Effizienzen. (B) SSO1653 ohne DNS hat niedrige, stark fluktuierende FRET-Effizienzen. Große Schwankungen in den Intensitäten von Donor (grün) und Akzeptor (rot) führen jeweils zu einer starken Variation der daraus errechneten FRET-Effizienz (schwarz). Die Gesamtintensität (blau) bleibt davon unbeeinträchtigt. Direkte Anregung des Akzeptors (magenta) zeigt keine photophysikalischen Schwankungen in der Akzeptorfluoreszenz. FRET-Effizienzen werden nur bis zum Bleichen des Akzeptors berechnet.

Hiermit ist es nun möglich, im Gegensatz zur Ensemble-Methode, die FRET-Effizienzen zeitlich aufgelöst zu bestimmen. Eindeutig zu erkennen sind die starken Fluktuationen der FRET-Effizienzen innerhalb des SSO1653 Enzyms, obwohl es an DNS gebunden ist (Abb. 37A). Im Mittel ergäbe sich für dieses Molekül eine FRET-Effizienz von 68 %, was jedoch die tatsächlichen Schwankungen völlig mißachtet. Das Protein hält sich sowohl in einer geschlossenen Konformation mit Werten um 95 % auf, wie auch in einer offenen Struktur bei knapp 30 %. Gleiches gilt für das ungebundene Enzym (Abb. 37B), dessen FRET-Effizienz zwischen etwa 10 % und 75 % schwankt. Aber auch kurzzeitige Extremwerte von 0 % und 100 % sind zu erkennen. Der Mittelwert tendiert zu einem deutlich niedrigeren Wert (39 %), genau wie eine offene Konformation dies erwarten läßt.

Diese Informationen blieben der Ensemble-Methode vorenthalten und zeigen somit den klaren Vorteil der Einzelmolekül-Technik in dieser Hinsicht. Darüber hinaus wurden sämtliche Experimente mit alternierender Anregung durchgeführt, was u. a. den Vorteil hat, die Akzeptor-Fluoreszenz direkt beobachten zu können. So können theoretische Artefakte, wie zwischenzeitliches Auslöschen der Akzeptor-Fluoreszenz ausgeschlossen werden, was die FRET-Effizienz stark beeinflussen würde.

Wie in der vorigen Abb. 37A schön zu sehen, ist die Intensität des Akzeptors nur innerhalb der ersten Sekunde leicht instabil, ansonsten jedoch bis zum Photobleichen des Akzeptors nach knapp 7 Sekunden konstant. Die FRET-Effizienzen wurden nur bis dorthin berechnet und graphisch dargestellt. Ein weiterer Indikator für mögliche photophysikalische Effekte, die den FRET-Prozeß negativ beeinflussen könnten, ist die totale Intensität aus der Summe der gammakorrigierten Donor- und Akzeptorintensitäten, die ebenso über den gesamten Verlauf konstant bleibt. Messungen mit Cy3 und Cy5 lieferten identische Resultate.

Es zeigte sich jedoch, daß eine Veränderung des pH-Werts von 5.5 auf 7.4 große Auswirkungen auf das Bindungsverhalten des Proteins ausübte. Es konnten bei letzterem pH-Wert kaum noch Moleküle mit so hohen FRET-Effizienzen nachgewiesen werden, was auch teils daran lag, daß generell viel weniger Enzyme auf die DNS banden. Dies ist konsistent mit FRET-Ensemble-Messungen bei pH 7.4, bei denen wenig bis keine Veränderung nach Zugabe von DNS nachweisbar war. Für eine gestörte Bindungsaffinität sprechen auch die um ein Vielfaches verringerten Aktivitäten der Enzyme.

Für eine quantitative Auswertung wurden viele dieser Intensitäts-Zeit-Spuren aufgezeichnet und in einem Histogramm, in Abb. 38 dargestellt, zusammengefaßt. Hierbei werden alle FRET-Effizienzen, die Punkt für Punkt innerhalb der Meßdauer berechnet wurden, berücksichtigt, aber zusammengefaßt. So treten zum einen oft auftretende, aber kurze Prozesse von unterschiedlichen Molekülen genauso in Erscheinung wie länger dauernde Vorgänge. Für das gezeigte Beispiel des Intensitätsverlaufs in Abb. 37 finden also sowohl die Zustände in hohem wie auch niedrigem FRET ihre Gewichtung. Der Mittelwert der Verteilung (76.5 %) sollte dann den Ensemble-Messungen entsprechen.

Er kann aber nicht direkt verglichen werden, da im Ensemble die Werte auf 100 % normalisiert wurden. Die beobachteten FRET-Effizienzen für gebundenes Protein sind sehr breit verteilt und können daher nicht mehr mit einer Gauß-Kurve beschrieben werden. Die Verwendung von zwei Gauß-Verteilungen liefert dagegen sehr gute Ergebnisse. Das höhere Maximum liegt bei etwa 93 %, das niedrigere bei 70 %.

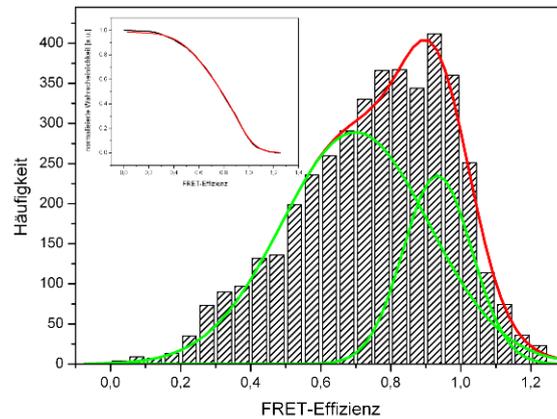


Abb. 38: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen an SSO1653-Mutante 4X im Komplex mit DNS.

Das Histogramm von 144 Molekülen kann mit Hilfe zweier Gaußverteilungen (grün) ähnlicher Amplitude beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 70 % bzw. 93 %. Die breite Verteilung deutet auf hohe Flexibilität der Domänen hin. Der insgesamt hohe Mittelwert (76,5 %) geht zurück auf eine geschlossene Konformation. Links oben ist die Beschreibung der Daten (schwarz) mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion (rot) gezeigt.

Diese Werte liefert die Berechnung mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion nach folgender Gleichung Gl. 48.

$$p(\mu_i, \mu_{i+1}, \dots) = \frac{1}{2} A_i \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x_i - \mu_i}{\sigma_i \sqrt{2}} \right) \right] + \frac{1}{2} A_{i+1} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x_{i+1} - \mu_{i+1}}{\sigma_{i+1} \sqrt{2}} \right) \right] + \dots$$

Gl. 48

mit den folgenden Parametern:

A_i : Amplitude am i -ten Maximum

x_i : zu bestimmender Mittelwert des i -ten Maximums

σ : Standardabweichung des i -ten Maximums

erf : Fehlerfunktion

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$$

Gl. 49

Bei dieser Art der Auswertung werden die einzelnen Datenpunkte, in diesem Fall die FRET-Effizienzen, ihrer Größe nach aufgetragen und gegen eine normalisierte Zahlenreihe dargestellt. Die niedrigste FRET-Effizienz erhält demnach eins als Ordinatenwert. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, jeden einzelnen Datenpunkt identisch zu gewichten und

nicht innerhalb eines Balkens zusammenzufassen. Somit erübrigt sich auch die Suche nach der optimalen Anzahl der Balken.

Die höhere Verteilung gehört mutmaßlich zur geschlossenen Konformation des Proteins, während das Maximum der niedrigeren Kurve nicht eindeutig der offenen Konformation zugerechnet werden kann, da sehr kleine FRET-Effizienzen im Bereich um 20 % zu erwarten wären. Darüber hinaus ist die Verteilung sehr breit, was vielmehr auf schnelle strukturelle Änderungen hindeutet, die bei der gewählten Integrationszeit nicht aufgelöst werden konnten. Wie sich zudem herausstellte, führten Messungen mit Meßintervallen von 30 ms zu keinen nennenswerten Verbesserungen, sondern nur zu noch breiteren Verteilungen, aufgrund verhältnismäßig höheren Rauschens. Die eigentlichen Konformationsänderungen müssen demnach auf unterhalb der verwendeten Zeitskalen stattfinden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird noch auf die Kinetik der Konformationsänderung eingegangen. Zum Vergleich und zur Bestätigung der Ensemble-Messungen wurde auch das Protein alleine untersucht. Zu diesem Zweck wurde es direkt auf einer Quarzglas-Oberfläche immobilisiert (Kapitel 3.1.2). Die Intensitäts-Zeitspuren wiesen ähnliche Charakteristika auf, wie hohe Dynamik, aber auch stabile Akzeptor-Emission und totale Intensitäten. Aufgrund der verschiedenen und viel niedrigeren FRET-Effizienz ergibt sich aber ein völlig anderes Histogramm, siehe Abb. 39.

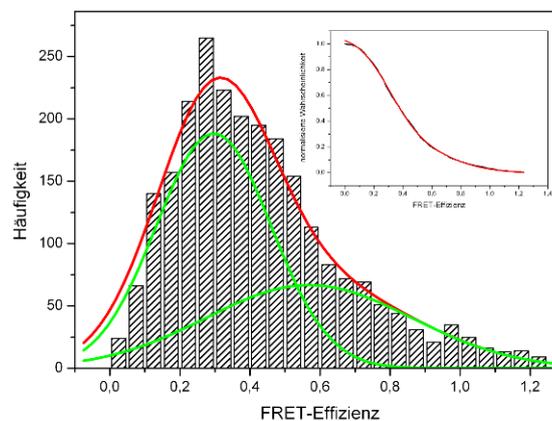


Abb. 39: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen an SSO1653-Mutante 4X ohne DNS.

Das Histogramm von 84 Molekülen kann mit Hilfe zweier Gaußverteilungen (grün) mit deutlich unterschiedlicher Amplitude beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 30 % bzw. 57 %. Die breite Verteilung deutet auf hohe Flexibilität der Domänen hin. Der insgesamt niedrige Mittelwert (45 %) geht zurück auf eine offene Konformation. Rechts oben ist die Beschreibung der Daten (schwarz) mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion (rot) gezeigt.

Zwar ist die Verteilung wieder extrem breit und sie kann nur mittels zweier Gauß-Kurven beschrieben werden, es ergeben sich jedoch unterschiedliche Maxima bei 30 % und 57 %.

Auch hier wurden die Werte der kumulativen Verteilungsfunktion entnommen. Die bei niedrigeren FRET-Effizienzen auftretende Verteilung stammt vom ungebundenen Protein und entspricht auch vom Absolutwert her den Erwartungen. Die extrem breite zweite Verteilung muß herrühren von dynamischen Veränderungen des Enzyms und vom zeitweisen Zuklappen der Konformation. Noch dazu sind im Vergleich zum gebundenen Protein hier beide Verteilungen breit, was durch die hohe Flexibilität des Proteins in Abwesenheit der DNS verursacht wird.

Der absolute Unterschied der Verteilung bei 57 % im Vergleich zur Verteilung bei 70 % beim gebundenen Protein, kann durch zwei unterschiedliche halb-geschlossene Konformationen erklärt werden. Das gebundene Protein kann entweder in einer geschlossenen Konformation mit sehr hoher FRET-Effizienz vorkommen oder sich zu einer halb-geschlossenen Form öffnen, die weniger wahrscheinlich vom ungebundenen Protein erreicht wird. Dieses hingegen kommt hauptsächlich in seiner geöffneten Konformation vor, kann sich aber aufgrund seiner Flexibilität ebenfalls verändern. Diese halb-geöffnete Konformation wird wiederum vom DNS gebundenen Enzym weniger oft eingenommen. Daß der Unterschied der beiden komplett geöffneten bzw. geschlossenen Konformationen nicht mit dem Faktor zwei bis drei aus den Ensemble-Experimenten übereinstimmt, mag an der Temperatur von 25 °C liegen. 60 °C wie bei den Ensemble-Messungen ließen das Protein vielleicht noch flexibler werden, konnten aber bei den Einzelmolekül-Experimenten technisch bedingt nicht eingesetzt werden. Aus demselben Grund wurde auch auf den Einsatz von Nukleotiden verzichtet, da die Aktivität bei Raumtemperatur vielfach geringer gewesen wäre.

Die Einzelmolekül-Messungen enthüllten also den Grund für die verringerten FRET-Effizienzen bei Zugabe von ADP in den Ensemble-Messungen. Es konnte das dynamische Öffnen und Schließen der Konformation direkt anhand der Intensitätsfluktuationen verfolgt werden. Es existiert somit keine eindeutige intermediäre Distanz, die durch ADP-Bindung stabilisiert würde, sondern eine Verschiebung des Gleichgewichts, die die offene Konformation an Gewicht gewinnen läßt.

6.7.2. Kinetik der Konformationsänderung

Die Einzelmolekül-Experimente erlaubten auch eine Analyse zur Kinetik der Strukturveränderung, also des Wechsels der beiden Konformationen und der dazugehörigen Verweildauer. In Anwesenheit von DNS ergaben sich für die FRET-Effizienzen Verteilungen mit Maxima bei 93 % sowie 70 %, die wegen ihrer Breite deutlich überlappen. Um nun die Kinetik zu bestimmen, die die Änderung der Konformation beschreibt, wurde eine Methode verwendet, die den Wechsel von der geschlossenen in die offene Konformation registriert. Dazu wurde ein Grenzwert bei 73 % für die beiden Verteilungen definiert, über und unterhalb dessen sich die FRET-Effizienzen zur jeweiligen Konformation verändern darf-

ten. Ein Überschreiten wurde als Wechsel interpretiert und zusammen mit der Verweildauer in dieser Konformation notiert. Springt ein FRET-Wert über diese Grenzen, kann aber noch nicht definitiv von einem Wechsel gesprochen werden. Daher wurde ein Grenzbereich zwischen 68 % und 73 % eingeführt, der eine gewisse Fehlertoleranz zuläßt. Ansonsten wären bereits durch Rauschen viele kurze, falsch-positive Wechsel detektiert worden.

Springt nun ein Zustand von weit überhalb der 73 % direkt in einen unterhalb von 68 %, dann gilt dies als Wechsel auch wenn dieser FRET-Wert nur für ein Bild von 100 ms Länge stabil bleibt. Schwieriger wird die Formulierung eines Zustandswechsels, wenn die absoluten FRET-Effizienzen sich nicht so stark ändern. Eine Änderung von 74 % auf 72 % kann dann als Wechsel betrachtet werden, wenn der darauffolgende Wert ebenfalls im Grenzbereich unterhalb 73 % liegt. Dagegen muß ein relativ größerer Sprung von beispielsweise 75 % auf 69 % und wieder zurück auf einen Wert überhalb 73 % als Rauschen angesehen werden. Auf diese Weise verringert sich zwar die Zeitauflösung dynamisch auf die Hälfte der Integrationszeit, dafür aber entstehen keine Artefakte aufgrund sehr kurzer Wechsel, die die Wechselrate stark verfälschen würden. Der absolute Wert von 73 % beschreibt die Grenze von zwei Standardabweichungen um das Maximum von 93 %. Die Analyse wurde an 15 ausgewählten Intensitäts-Zeit-Spuren durchgeführt, u. a. um sicher zu stellen, daß beispielsweise der Akzeptor keinen Intensitätsschwankungen unterlag.

Das Diagramm in Abb. 40A zeigt die Verteilung der durchschnittlichen Verweildauer des Proteins in der geschlossenen Konformation.

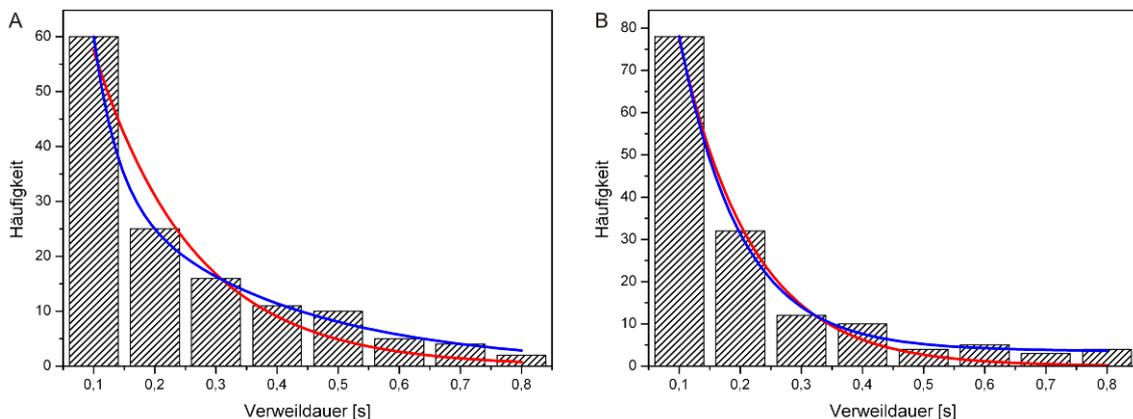


Abb. 40: Histogramm der mittleren Verweildauern in der geschlossenen (A) und der offenen (B) Konformation.

(A) Die Verweildauer in jeweils einer Konformation wird nach jedem Wechsel (Berechnung siehe Text) notiert und gegen ihre Häufigkeit aufgetragen. Der Verlauf läßt sich exponentiell beschreiben (blau: monoexponentiell, Verweildauer 0.16 Sekunden, rot: biexponentiell, Verweildauern 0.29 und 0.04 Sekunden). (B) Die Verweildauer in der offenen Konformation wird nach jedem Wechsel (Berechnung siehe Text) notiert und gegen ihre Häufigkeit aufgetragen. Der Verlauf läßt sich exponentiell beschreiben (blau: monoexponentiell, Verweildauer 0.12 Sekunden, rot: biexponentiell, Verweildauern 3.37 und 0.04 Sekunden).

Der Verlauf ließ sich sehr gut mit Hilfe eines monoexponentiellen Zerfalls mit einer mittleren Lebenszeit von 0.16 Sekunden beschreiben. Verglichen mit der Integrationszeit von 0.1 Sekunden läuft das Umklappen der Konformation sehr schnell ab und bleibt im Durchschnitt etwa zwei Bilder eines Videos in der geschlossenen Struktur. Vielmehr zeigt es aber noch ganz generell die hohe Geschwindigkeit der Konformationsänderung bzw. die Flexibilität des Enzyms. Eine biexponentielle Verteilung liefert im Vergleich eine extrem kurze Verweildauer von 0.04 Sekunden und eine viel längere von 0.29 Sekunden. Der Anteil der längerdauernden Komponente liegt jedoch bei nur 11 %, was die biologische Signifikanz in Frage stellt, vor allem weil der dominante kürzere Bestandteil unterhalb der technischen Zeitauflösung liegt.

Die Verteilung der Aufenthaltsdauer in der offenen Konformation zeigt die Abb. 40B. Der Verlauf läßt sich ebenfalls besser durch die Einführung einer zweiten Zerfallszeit beschreiben. Die Zeiten betragen etwa 0.12 Sekunden für die monoexponentielle Funktion sowie 3.37 Sekunden und 0.04 Sekunden für eine biexponentielle Funktion. Hier wird noch mehr deutlich, daß allenfalls noch die mathematische Güte der Datenbeschreibung durch die Funktion verbessert wird, jedoch keinerlei Informationsgehalt gewonnen werden kann. Der Anteil der ersten vielfach höheren Zerfallszeit beträgt nur 2 %, was nicht einmal ihre statistische Signifikanz belegt. Möglicherweise treten hier vermehrt Zustandswechsel auf, die sowohl nur sehr kurz verharren, aber auch über längere Phasen verlaufen. Direkt konnte in den Datensätzen beobachtet werden, daß zum einen oft sehr kurze Wechsel von einem hohen FRET-Wert zu einem niedrigen stattfanden, aber auch lange Phasen im geöffneten Zustand üblich waren. Dagegen waren die Werte in der geschlossenen Struktur durchgehend langdauernd und nur ganz vereinzelt sehr kurz.

Als Erklärung für die sehr kurze Verweildauer mag dienen, daß eine Öffnung der Proteinstruktur kinetisch gesehen zwar möglich ist, aber thermodynamisch nicht günstig. Die Phasen längeren Öffnens könnten hingegen größere noch unbekannte Konformationsänderungen darstellen, die zum Beispiel durch veränderte DNS-Anbindung energetisch bevorzugt werden.

6.7.3. Einfluß der Oberflächenanbindung

Eine denkbare Erklärung für die große Dynamik in den Einzelmolekül-Experimenten auf Oberflächen ist die zwischenzeitliche Ablösung von der DNS und darauffolgende erneute Anbindung. Die eingesetzten Konzentrationen wurden analog zu den vorher aufgeführten Experimenten mit Donor und Akzeptor markierten Enzymen gewählt, sodaß trotz einer relativ dichten Besiedelung der Oberfläche überschüssiges Protein leicht wieder aus der Kammer und von der Oberfläche weggeschwemmt werden konnte.

Daher würde man weniger das Ablösen eines Proteins gefolgt von der Anbindung eines zweiten anderen erwarten, sondern eher nur das kurzzeitige Weggehen eines Enzymmoleküls.

Um derartige Ereignisse sinnvoll untersuchen zu können, bedurfte es eines äußerst photostabilen Farbstoffs. Daher wurde ein Experiment mit SSO1653 durchgeführt, an welches zuvor ATTO 647N gekoppelt wurde. ATTO 647N im Vergleich zu seinem älteren Vorgänger ATTO 647 kann in weitaus polarerer Umgebung an das Protein gebunden werden. Dennoch liegen die Ausbeuten deutlich unter den Werten mit Cy5 bei nur etwa 10 %. Zusätzlich wurde die Integrationszeit auf 1 s erhöht, damit die Laserintensität auf ein Zehntel gesenkt werden konnte. So konnten Moleküle über 100 Sekunden beobachtet werden, also über einen wesentlich längeren Zeitraum. Jedes Bleichen eines Farbstoffs wurde anschließend als Ereignis registriert und mit dem dazugehörigen Zeitpunkt abgespeichert. Die Abb. 41 zeigt ein solches Histogramm, in dem alle Bleichvorgänge kumuliert aufgeführt werden. Das bedeutet, wenn nach 10 Sekunden, wie im Bild zu sehen, etwa 75 Moleküle gebleicht sind, werden sie auf die nachfolgenden Moleküle, die bleichen, addiert. Der Balken für den Zeitpunkt bei 80 Sekunden besteht also aus allen bisher gebleichten Molekülen zu den Zeitpunkten 10 - 70 s sowie denjenigen, die nach 80 Sekunden nicht mehr leuchteten.

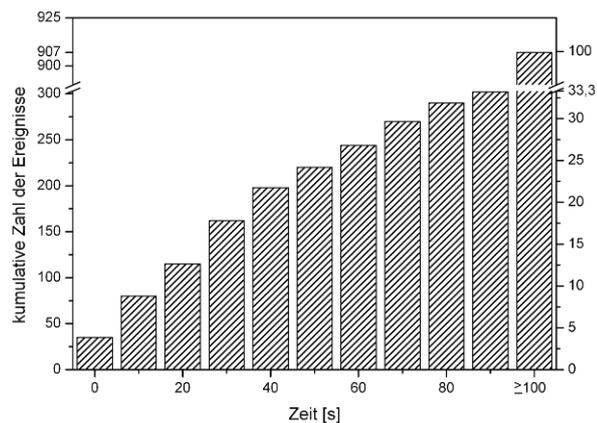


Abb. 41: Darstellung der Ereignisse hervorgerufen durch Dissoziation des SSO1653-Mutante 4X bzw. Bleichen des Farbstoffs.

Insgesamt wurden 907 Signale gezählt, wovon etwa 27 % in einem Zeitraum von 60 Sekunden bzw. 33 % innerhalb von 100 Sekunden verschwanden. Die übrigen 67 % verschwanden nicht innerhalb des Meßzeitraums.

Wie sich zeigt, lösten sich etwa ein Drittel der Moleküle in einem Zeitraum von 100 Sekunden ab bzw. es blüht der gebundene Farbstoff. In der Meßdauer von 10 - 20 Sekunden, bei denen die Einzelmolekül-Versuche stattfanden, blühten jedoch gerade einmal 12 Prozent der gebundenen Moleküle. Leider gibt diese Methode keine Auskunft, ob der Fluorophor bleicht oder ob das Enzym sich ablöst. Das Ergebnis ist somit mehr eine Angabe für die geringste Zeit, die ein Protein bindet. Die Konformationsänderungen, die aufgrund der Intensitätsschwankungen sichtbar wurden, fanden dagegen auf einer völlig anderen Zeit-

skala statt. Ein Ablösen des Proteins in Anbetracht der gezeigten Meßergebnisse scheint für die Bleichereignisse also ausgeschlossen. Experimente mit ATP bzw. ADP ergaben vergleichbare Resultate mit leicht verringerten Ablöse- bzw. Bleichraten (24 % für ATP, 25 % für ADP). Das würde auch die Messungen zur Dissoziationskonstante bestätigen, die ebenfalls eine erhöhte Bindungsaffinität in Anwesenheit der Nukleotide gezeigt hatten.

Es wurde eindeutig gezeigt, daß selbst das an DNS gebundene Enzym in der Lage ist, in eine offene Konformation zu wechseln, was auch mit Daten der Kristallstruktur übereinstimmt.

6.7.4. Kontrollmessungen mittels Burst-Analyse

Die Oberflächen auf denen das Protein bzw. die DNS angebunden war, wurden zwar sorgfältig passiviert, um den Einfluß der Oberfläche in Folge von nicht-spezifischen Wechselwirkungen zu minimieren. Um sicher zu stellen, daß unerwünschte Nebenreaktionen des immobilisierten Proteins mit der Oberfläche, z. B. in Form von Anbindungen, die Meßergebnisse nicht verfälschten, wurden auch Messungen frei beweglicher Enzyme in Lösung durchgeführt. Dazu wurde die Burst-Analyse eingesetzt[163]. Zwar ist die Burst-Analyse aufgrund der diffusionsbegrenzten Zeit innerhalb des Anregungsvolumens keine Methode, die eine bessere Zeitauflösung als die TIRF-Mikroskopie garantiert. Daher können auch keine zeitabhängigen Veränderungen der Konformation beobachtet werden, aber sie ergibt Informationen über eine mögliche Verteilung der FRET-Effizienzen in verschiedene Populationen. Auch hier zeigte sich das gleiche Bild, nämlich ein sehr breites Histogramm, bedingt durch die große Flexibilität des Proteins, siehe Abb. 42.

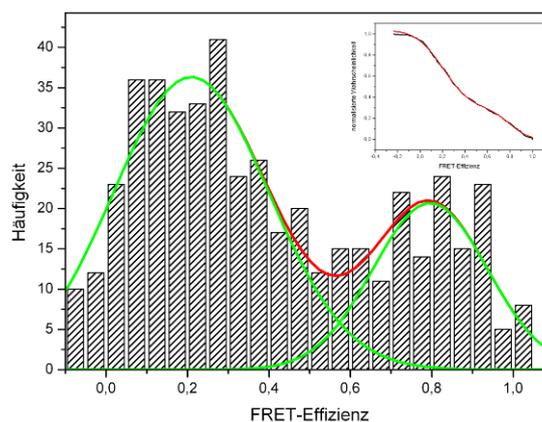


Abb. 42: Histogramm der Burst-Analyse am SSO1653-Mutante 2X ohne DNS.

Das Histogramm kann mit Hilfe zweier Gauß-Verteilungen (grün) bei ähnlicher Verteilung der Amplituden beschrieben werden. Die weit auseinander liegenden Maxima befinden sich bei 21 % und 80 % und spiegeln die hohe Flexibilität der Domänen wieder. Der Mittelwert beläuft sich auf 40 %. Rechts oben ist die Beschreibung der Daten (schwarz) mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion (rot) gezeigt.

Die Maxima der beiden Gauß-Kurven, die das Histogramm beschreiben, liegen bei 21 % und 80 %, errechnet mittels der kumulativen Verteilungsfunktion. Der niedrigere Wert stimmt sehr gut mit dem beobachteten Wert der TIRF-Messungen überein, auch die Kurve ist ähnlich breit. Somit bestätigt sich abermals ein kleiner Wert für die FRET-Effizienz beim ungebundenen Protein.

Obendrein wird der Beweis geführt, daß die Messungen auf den Oberflächen nicht von einem Artefakt begleitet waren. Das zweite Maximum bei 80 % weicht dagegen stark von den 57 % ab, die mittels TIRF-Mikroskop gemessen wurden. Dafür ist die Kurve darunter wesentlich schmaler, was mit den Zeitskalen, in denen beide Methoden arbeiten, begründet werden kann. Die Konformation des Proteins ändert sich im gebundenen wie ungebundenen Zustand jederzeit, die Änderung läuft aber auf einer ähnlichen Zeitskala ab wie die Detektion bei der TIRF-Mikroskopie stattfindet, also bei etwa 100 ms. Daher wird es möglich sein, mit einer Technik wie Burst-Analyse, deren effektive Integrationszeit einige Millisekunden beträgt, das Protein in seiner geschlossenen Konformation auch ohne DNS messen zu können. Abhängig von der Kinetik der Strukturänderung und hauptsächlich von der Temperatur könnte so ein beträchtlicher Anteil auch in der geschlossenen Konformation vorliegen. Dies läßt sich in diesem Fall sehr schön erkennen. Das Verhältnis von beiden Konformationen beträgt etwa 70 % offen zu 30 % geschlossen. Der Mittelwert beträgt indes 40 % und stimmt sehr gut mit den 45 % aus den TIRF-Messungen überein.

Es wurden auch Versuche mit der Burst-Analyse durchgeführt, die das gebundene Protein an DNS detektieren sollten. Die Abb. 43 zeigt die deutlich zu höheren FRET-Effizienzen verschobenen Werte.

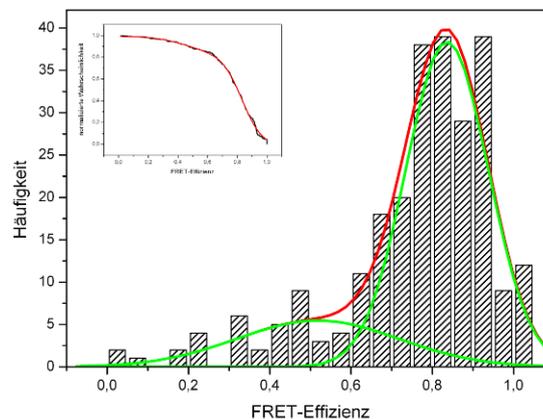


Abb. 43: Histogramm der Burst-Analyse am SSO1653-Mutante 2X mit DNS.

Das Histogramm kann mit Hilfe zweier Gauß-Verteilungen (grün) mit hoher Beteiligung einer Amplitude beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 52 % und 84 %, wobei sich anscheinend der Großteil der Enzyme im geschlossenen Zustand befindet. Der Mittelwert beläuft sich auf 75 %. Links oben ist die Beschreibung der Daten (schwarz) mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion (rot) gezeigt.

Zwei Gauß-Kurven beschreiben wieder die Verteilung, von der eine bei 52 %, die andere bei 84 % zentriert ist. Im Vergleich zur TIRF-Mikroskopie ist die Verteilung deutlich schmaler, lediglich die niedrigere Kurve ist ebenfalls breit. Dies kann wieder anhand der unterschiedlichen Zeitskalen erklärt werden. Das Protein bindet und bleibt länger als die Diffusionszeit in der geschlossenen Konformation. Vereinzelt öffnet sich das Protein und ruft eine FRET-Effizienz bei 52 % hervor.

Nur unzureichend kann allerdings das Verhältnis der beiden Verteilungen erklärt werden, zumal anzumerken ist, daß bei den gewählten Meßbedingungen (K_d von 333 nM) eigentlich nur etwa 40 % der Proteine im gebundenen Zustand anzufinden sein sollten. Somit scheint das gezeigte Histogramm in Abb. 43 die hohen FRET-Werte überzurepräsentieren. Prinzipiell könnte aber auch hier ein Zusammenhang mit der Diffusionszeit in der Burst-Analyse-Methode und der viel längeren Integrationszeit bei der TIRF-Mikroskopie bestehen. Der Mittelwert von 75 % stimmt nämlich erstaunlich gut mit den 76.5 % aus den TIRF-Messungen überein. Man könnte nun argumentieren, daß die Konformationsänderungen auf einer wesentlich längeren Zeitskala ablaufen als die mittlere Beobachtungszeit der Burst-Analyse. Dann müßten aber trotzdem beide Zustände unterscheidbar sein, vorausgesetzt ihre FRET-Effizienzen lägen nicht zu dicht beieinander. Die Tatsache, daß weder ein zweiter ausgeprägter Peak vorhanden ist noch die mathematische Beschreibung zwei benachbarte Gaußverteilungen liefert, könnte bedeuten, daß die Konformationsänderungen wesentlich weniger häufig auftreten als die Analyse der Kinetik der Konformationsänderungen vorher zeigten (Kapitel 6.7.2). Eine mittlere Verweildauer von 160 ms in der geschlossenen gegenüber 120 ms in der offenen Konformation würde in erster Näherung bedeuten, daß bei einer Beobachtungszeit von nur 1 ms auf 160 Signale (Bursts) von Enzymen in der geschlossenen Konformation 120 Signale eines Proteins im geöffneten Zustand zu sehen sein müßten. Das entspricht einem Verhältnis von 3:4, was eindeutig nicht erfüllt ist.

Eine weitaus simplere Erklärung wäre, daß dies der Burst-Analyse-Methode selbst zuzurechnen ist. Um Signale von Molekülen von Hintergrundrauschen unterscheiden zu können, wird ein bestimmter Grenzwert als Diskriminator für die Signalintensitäten gesetzt. Möglicherweise haben jedoch Moleküle im geöffneten Zustand nicht die gleiche Helligkeit wie Moleküle mit geschlossener Konformation, was dann logischerweise zum Ausschluß führt. Der Wert kann aber nicht beliebig reduziert werden, da ansonsten mehr und mehr Signale aus der Probenlösung gewertet würden, obwohl sie nicht von den farbstoffmarkierten Proteinen stammen. Deswegen kann nur bestätigt werden, was Ensemble- und Einzelmolekül-Messungen bereits zeigten. Das Protein liegt an DNS gebunden in einer geschlossenen Konformation vor. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die breite Verteilung aus den TIRF-Messungen durch Interaktionen mit der Oberfläche verursacht wird. Zusätzliche Messungen in Lösungsmitteln mit höherer Viskosität könnten hierbei möglicherweise Aufschluß geben.

Daneben wurden trotz der experimentellen Temperatur von 25 °C, Messungen mit ADP durchgeführt, die aber keine offensichtlichen Veränderungen aufwiesen, wie in Abb. 44 zu sehen ist.

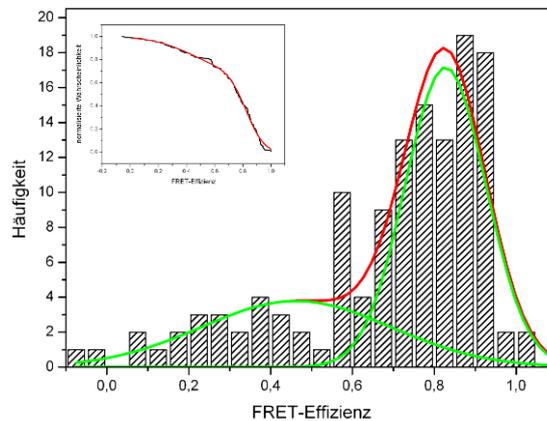


Abb. 44: Histogramm der Burst-Analyse am SSO1653-Mutante 2X mit DNS und ADP.

Das Histogramm kann mit Hilfe zweier Gauß-Verteilungen (grün) mit hoher Beteiligung einer Amplitude beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 52 % und 82 %, wobei sich anscheinend der Großteil der Enzyme im geschlossenen Zustand befindet. Der Mittelwert beläuft sich auf 69,5 %. Links oben ist die Beschreibung der Daten (schwarz) mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion (rot) gezeigt.

Das höhere Maximum liegt bei 82 %, was hervorragend mit den Messungen ohne Nucleotid übereinstimmt. Lediglich der Anteil der niedrigeren Spezies bei 46 % fällt im Vergleich höher aus, es existieren also mehr Moleküle mit einer niedrigeren FRET-Effizienz. Das ist jedoch bemerkenswert, da in Anwesenheit von ADP die Bindungsaffinität des Proteins steigt. Bei den Meßbedingungen sollten etwa 55 % des Proteins gebunden sein. Trotz dieser Erhöhung steigt der Anteil der geöffneten Konformation von ca. 20 % auf knapp 35 %. Der Mittelwert von 69,5 % scheint im direkten Vergleich zur Probe ohne ADP (75 %) leicht abzunehmen, wie auch schon in den Ensemble-Experimenten zuvor.

Aber auch hier dürfen die beiden völlig unterschiedlichen Zeitintervalle von Burst-Analyse und TIRF-Mikroskop nicht außer Acht gelassen werden. Ohne zuviel über die quantitativen Verhältnisse zu spekulieren, kann einfach festgestellt werden, daß beide Einzelmolekül-Techniken zum selben Ergebnis kommen. Das Protein alleine ist äußerst flexibel und kann auch ohne DNS in einer Konformation detektiert werden, die der geschlossenen, gebundenen Form ähnelt. Umgekehrt ist das Protein auch noch beweglich, wenn es schon gebunden ist. Dies ist der Grund für die verringerten FRET-Effizienzen bei der Zugabe von ADP. Es entsteht nicht ein Zustand mit einer dritten Konformation, sondern das Gleichgewicht verschiebt sich zu Gunsten der offenen Konformation. Dies macht zum einen Sinn, da das hydrolysierte Phosphat abgegeben werden muß, zum anderen kann ein möglicher Schritt entlang der DNS um so weiter ausfallen, um so größer die Öffnung der Struktur ist, da z. B. weiter entfernte Basen gebunden werden können. Eine halbgeöffnete Struktur hingegen würde nur einen kürzeren Schritt bei gleichem Energiebedarf begünstigen.

6.8. Mechano-chemischer Zyklus

Zusammenfassend zeichnen die gezeigten Daten ein umfassendes Bild des mechano-chemischen Zyklus des SSO1653. Es werden überblickend drei wichtige Punkte gefunden. Erstens liegt das Protein in einer offenen Konformation vor in Übereinstimmung mit der gefundenen Kristallstruktur. Zweitens führt die Anbindung an DNS zu einer drastischen Konformationsänderung, die über die eingesetzte Methode des Fluoreszenz-Resonanztransfers nachgewiesen werden konnte. Drittens ist der essentielle Schritt im Zyklus, der eine Fortbewegung ermöglichen würde, gekoppelt an die Abgabe des Phosphats bzw. eines Schritts nach der ATP-Hydrolyse, der das Gleichgewicht zwischen geöffneter und geschlossener Struktur beeinflusst.

Interessanterweise liegt das Protein ohne Substrat in einer Anordnung vor, die nicht die Bindung des ATP und dessen Hydrolyse durchführen könnte. Erst eine Rotation einer der beiden Domänen um 180° bringt das Enzym in seine aktive Konformation in Übereinstimmung mit anderen Helikasen. Dies ist zweifelsohne notwendig und kann mit der FRET-Technik eindrucksvoll nachgewiesen werden. Ob diese spezielle Struktur des Proteins ohne DNS einzigartig für dieses Enzym ist oder ob solche großen strukturellen Änderungen auch in anderen Proteinen der SWI2/SNF2-Familie auftreten ist noch unklar. Rad54 aus Zebrafischen liegt bereits in der Abwesenheit von DNS in einer wesentlich geschlosseneren Konformation vor[203]. Die direkte Homologie zwischen SSO1653 und Rad54 wurde aber andererseits in jüngster Zeit wieder angezweifelt[10]. Bei einem sehr prozessiven Enzym wie Rad54[54] würde jedoch der erste Schritt der DNS Bindung nicht als Teil des Kreislaufes aufgefaßt. Generell zeigen die aufgeführten FRET-Messungen aber die große Flexibilität des Enzyms und die daraus resultierenden schnellen Änderungen seiner Struktur. Dies könnte eine grundlegende Voraussetzung für Translokation an DNS sein.

Die gefundenen Resultate lassen es jedenfalls zu, ein Modell aufzustellen, wie die strukturellen Veränderungen aufgrund z. B. der ATP Hydrolyse und der Phosphatabgabe die DNS Translokation ermöglichen könnten. Abb. 45 greift dazu auf Ergebnisse dieser Arbeit zurück und kombiniert sie mit Daten anderer Studien zu SWI2/SNF2 Enzymen wie Kristallstrukturen[63, 204], Einzelmolekül-Messungen[54, 55, 205] sowie biochemischen Experimenten an verwandten Enzymen[206].

Die offene Struktur wurde aus dem Modell herausgenommen, da sie höchstwahrscheinlich für das SSO1653 einzigartig ist. Nach dem Binden an DNS befindet sich das Enzym in einer geschlossenen Konformation. Dies wird anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt, aber auch strukturelle Vergleiche mit verwandten Helikasen der Superfamilie 2 deuten darauf hin[203, 207-210]. Aus Kristallstrukturen dieser Enzyme in Anwesenheit von DNS resultiert auch eine modellierte Struktur, die ein Bild der geschlossenen Konformation liefert.

Dabei werden auch die DNS kontaktierenden Bereiche in Motiv Ia der Domäne 1 berücksichtigt. Man stellt zudem fest, daß das Motiv IV in Domäne 2 mögliche Kontaktflächen zur DNS Bindung bietet, sobald die geschlossene Konformation eingenommen wurde (Abb. 45A).

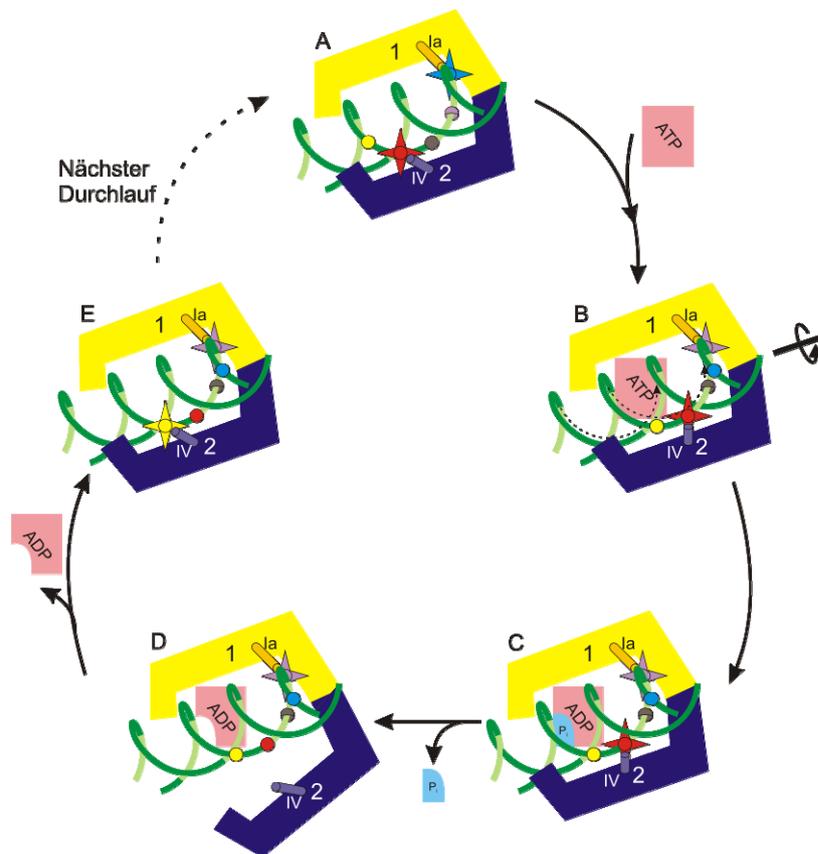


Abb. 45: Darstellung des postulierten mechanistischen Modells zur Translokation eines SWI2/SNF2-Enzyms.

(A) Nach der Bindung des Proteins an die DNS über bestimmte Bindungsmotive (Ia: gelber Zylinder, IV: blauer Zylinder) befindet es sich in der geschlossenen Konformation. (B) Die Zugabe von ATP läßt die Struktur kompakter werden durch Bewegung der DNS in 3' → 5' Richtung und Vorbeigleiten der DNS Kontaktfläche (blauer Stern → violetter Stern) an Motiv Ia (gelber Zylinder). (C) Die Hydrolyse führt zu keiner weiteren Veränderung im Übergangszustand. (D) Die Phosphat-abgabe (P_i) verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der geöffneten Struktur des Proteins. (E) Nach Abgabe des ADP bindet die Domäne 2 (blauer Zylinder) eine Base stromabwärts (gelber Stern) erneut an die DNS. Die offene Konformation des Proteins ist nicht Bestandteil dieses Kreislaufs.

Die Bindung von ATP könnte dann im nächsten Schritt vermutlich zu einer weiteren Verdichtung und Kompaktierung der Bindungstasche führen, wobei die DNS in 3' → 5' Richtung an der Domäne 1 vorbeigleitet (Abb. 45B). Eine solch feine Strukturänderung wäre jedoch mit den vorgestellten Meßmethoden nicht darstellbar bzw. detektierbar gewesen. Die Spekulation wird andererseits aber genährt von AMP-PNP gebundenen Strukturen der Enzyme VASA und RNS Helikasen an Exon-Kreuzungs-Komplexen, in denen die Motive Ia und IV eine derartige Position zueinander einnehmen[208-210]. Das Binden des Nukleotids führt also zu einer raupenähnlichen Verschiebung und gerichteter Translokation an DNS, ähnlich der Modelle für Helikasen der Superfamilien 1 und 2[41, 211].

Danach folgt eine rasche Hydrolyse des ATP ohne weitere Veränderung des Übergangszustands, wie auch die Ergebnisse unter Zuhilfenahme von ADP / AIF_x zeigen (Abb. 45C).

Im nächsten Schritt würde entweder die Hydrolyse oder die Abgabe des Phosphats eine Konformationsänderung hervorrufen, die zur Ablösung der Domäne 2 von der DNS führt (Abb. 45D). Deshalb werden wie gezeigt auch intermediäre FRET-Effizienzen für diese Anordnung gemessen, vermutlich aufgrund der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen offener und geschlossener Struktur. Biochemische Messungen haben gezeigt, daß im Gegensatz zu Domäne 1, Domäne 2 eine geringere Bindungsaffinität aufweist und so nur sehr leicht an DNS gebunden ist[63]. Unterstützt wird dies durch biochemische Studien zur Bewegung der Nukleosome durch Isw2, in denen der ADP-gebundene Zustand über eine verringerte Affinität zum Substrat verfügt[206].

Nach der Abgabe von ADP könnte die Domäne 2 dann wieder mit Motif IV an die DNS binden (Abb. 45E). Die neue Bindungsstelle wäre stromabwärts im Vergleich zu Domäne 1. Somit könnte sich das Protein jeweils um ein Basenpaar von 3' → 5' fortbewegen, analog zu Experimenten an einer verwandten Helikase der Superfamilie 2[184]. Ebenfalls dafür sprechen kraftmikroskopische Untersuchungen an einer DNS Translokase, in denen die eigentliche Fortbewegung in einem Schritt nach der Bindung und Hydrolyse des ATP stattfindet[53]. Die Domäne 1 würde während des gesamten Zeitraums fest gebunden bleiben, während Domäne 2 für die partielle Öffnung verantwortlich wäre. Dieser Zyklus ist selbstverständlich nur anwendbar auf ein Enzym, das als einzelne Einheit vorkommt. Die Messungen ergaben keine Hinweise, daß das SSO1653 als Multimer funktioniert, obwohl andere Translokasen der SWI2/SNF2 Familie so arbeiten können[53, 54]. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Multimerisation beobachtet werden. Einzig die Verwendung sehr hoher Proteinkonzentrationen bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante führte zu einer Aggregation, wobei unklar ist, ob dies den Mechanismus der Translokation beeinflussen würde. Aufgrund der erwähnten Ähnlichkeiten und der Homologie verschiedener DNS Translokasen mag dieses Modell für eine größere Anzahl an Proteinen gelten.

6.9. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend können folgende Punkte festgehalten werden. Erstens konnte der Nachweis der durch *Dürr et al.* postulierten Konformationsänderung des SSO1653, also die ursprüngliche Motivation, schlüssig nachgewiesen werden. Zweitens konnte mittels Ensemble-Messungen sowie der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie das dynamische Verhalten des Proteins gezeigt werden, woraus ein molekularer Mechanismus für das Protein entwickelt werden konnte. Trotzdem bleiben noch einige Fragen bestehen.

Was löst beispielsweise nach der Hydrolyse die Öffnung des Proteins aus? Was ist die Schrittweite des Enzyms und gibt es noch andere Wege, den Mechanismus zu bestätigen? Ist das SSO1653 eine Translokase?

Die Antwort ist nicht leicht zu finden, denn die Ensemble-Technik, die im Prinzip besser für die Untersuchung bei den physiologischen Bedingungen des SSO1653 (60 °C) geeignet ist, scheint ausgereizt zu sein. Es bleibt nur die Möglichkeit, auf Einzelmolekül-Niveau diese Bedingungen nachzustellen. Vor allem bleibt es aber interessant, wie sich weitere Erkenntnisse zu diesem Protein auf das Verständnis der SWI2/SNF2-Familie auswirken werden. Angesichts der oft wechselnden Einteilung und der momentanen Sonderstellung dieses Proteins kann dies nur schwer beurteilt werden.

7. Rad26

Das zweite untersuchte Enzym Rad26 wurde bis heute wenig strukturell charakterisiert, wobei jedoch molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß das sehr nah verwandte Enzym CSB beim Menschen im Zusammenhang steht mit einer degenerativen Erkrankung des Nervensystems, bekannt unter dem Namen Cockayne Syndrome. Es wird angenommen, daß dieses Enzym wie auch Rad26 als Schlüsselfaktor am wichtigen Reparaturprozeß TCR beteiligt ist, der in enger Beziehung steht zur RNS-Transkription.

7.1. Aufgabenstellung

Die Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war, die Funktion und den Mechanismus des Rad26 als wichtigem Bestandteil des TCR-Reparaturvorgangs im Zusammenhang mit einer blockierten RNS-Polymerase II zu untersuchen. Seiner Sequenz zu urteilen nach gehört das Rad26 zur Familie der SWI2/SNF2-Enzyme und verfügt dabei über die typischen Eigenschaften wie DNS-stimulierte ATPase-Aktivität oder helikasenähnliche Sequenzmotive, ohne aber eine echte Helikase zu sein.

Eine detaillierte Untersuchung über die Interaktion des Rad26 mit RNS-Polymerase II fehlt bis heute, obwohl zahlreiche Studien die Beteiligung des Rad26 an TCR beschreiben[17, 67, 70, 73, 78]. Biophysikalische Methoden auf Basis von Fluoreszenz-Messungen eignen sich auf dem Gebiet der Untersuchung von Interaktionen oder strukturellen Veränderungen[183, 185, 212] und haben sich schon oftmals bewährt. Natürlich fordert diese Methode einige Voraussetzungen wie die nötige technische Ausrüstung und die Ankopplung fluoreszenter Farbstoffe an definierte Positionen. Dabei stellte die noch nicht bekannte Kristallstruktur des Rad26 das größte Manko dar, das umgangen werden mußte, egal ob Ensemble- oder Einzelmolekülexperimente zum Einsatz kamen. Letztere bieten jedoch nicht zuletzt den Vorteil, dynamische Prozesse ohne eine sonst notwendige Synchronisation der Moleküle wie auch heterogene Verteilungen gleichermaßen beobachten zu können. Sie sind es auch, die sehr selten auftretende Ereignisse sichtbar machen.

Zudem wurde ein Modellsystem benötigt, an dem sich die zahlreichen Hypothesen zur Funktionsweise des Rad26 untersuchen ließen. Für eine detaillierte Beschreibung der Hypothesen muß an dieser Stelle auf Kapitel 2.8 verwiesen werden. Jede der möglichen Wir-

kungsweisen würde jedoch einen spezifischen Effekt hervorrufen, den es erstens zu detektieren und zweitens von anderen potentiellen zu unterscheiden galt.

Genau hier setzt die vorliegende Arbeit an, indem sie mit Hilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie versucht, Resultate zu erzielen, die ein Abwägen zwischen Für und Wider der genannten Hypothesen ermöglicht. Anders als im Fall des SSO1653 sollte diese Methode nicht als Ergänzung von Ensemble-Experimenten und zur Weiterführung von kristallographischen Untersuchungen betrieben werden, sondern ihr Potential als eigenständiges Verfahren unter Beweis stellen.

7.2. Elongationskomplex als Modellsystem

Der größte Teilbereich, dem sich diese Arbeit widmet, ist die Wirkungsweise des Rad26 an der RNS-Polymerase II zu charakterisieren. Dazu mußte jedoch für das Rad26 eine Situation geschaffen werden, die auf der einen Seite realitätsnah ist, also einer blockierten RNS-Polymerase ähnelt oder entspricht. Auf der anderen Seite mußte das System *in vitro* zugänglich sein. Sehr gut charakterisiert ist die RNS-Polymerase II im Elongationskomplex[213, 214], dessen Struktur auch als Ausgangspunkt diente zur Bestimmung des Wegs der neutranskribierten m-RNS aus der Polymerase heraus[2]. In letzterer Untersuchung wurden Farbstoffpaare an vordefinierten Ankerpunkten entlang der DNS, an den Enden der RNS sowie in der Untereinheit Rpb4/Rpb7 verankert, mit deren Hilfe ein Netz aus Reporterfarbstoffen für die Triangulation der unbekanntnen Lage der RNS, genauer ihrer endständigen Basen, gesponnen werden konnte. In Abb. 46 ist die Methodik symbolisch gezeigt.

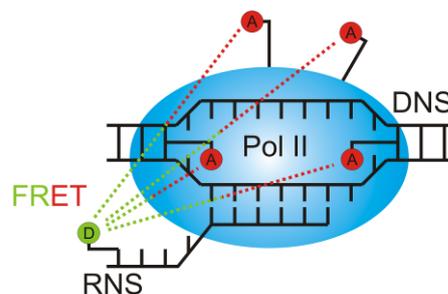


Abb. 46: Schematische Darstellung der Triangulations-Methode zur Bestimmung des Aufenthaltsbereichs der RNS.

Die RNS-Polymerase II (blau) bildet zusammen mit einer künstlichen Transkriptionsblase aus DNS und RNS den Elongationskomplex. An jeweils einer definierten Position im Komplex wird ein Akzeptor-Farbstoff angebracht (rot), der von einem Donor-Farbstoff (grün) an der RNS resonant angeregt wird. Mindestens drei errechnete FRET-Effizienzen bzw. Distanzen führen dann mittels Triangulation zu einem Schnittpunkt an dem sich der Donor befindet.

Der wichtigste Punkt in der Herstellung des hierbei eingesetzten Elongationskomplexes ist, eine ausgesprochen homogene Struktur zu erhalten und keine Verteilung verschiedener Zustände. Aus diesem Grund kann keine Polymerase verwendet werden, die über herkömmliche Transkription an einer bestimmten Position arretiert wird. Sie muß statt dessen über künstliche Transkriptionsblasen fixiert werden. Dazu wird eine doppelsträngige DNS mit teilweise nicht-komplementärer Sequenz mit einer komplementären RNS zusammengefügt, um welche dann die Polymerase (Abb. 46, blau) bindet und gleichzeitig stabilisierend für das ansonsten wenig stabile RNS-DNS-Hybrid wirkt.

Werden nun Farbstoffe, also jeweils ein Donor (Abb. 46, grüner Kreis D) an der RNS und ein Akzeptor (Abb. 46, roter Kreis A) an einer definierten Position im Elongationskomplex befestigt, so kann ein resonanter Energietransfer zwischen ihnen stattfinden. Die gewählten Ankerpunkte der Akzeptoren befanden sich bei *Andrecka et al.* an zwei Basen der DNS (Abb. 46, schwarz) sowie an zwei Aminosäuren der Untereinheit Rpb4/Rpb7 (Abb. 46, schematisch an Pol II). Die Fluoreszenzintensitäten wurden gemessen, im vorliegenden Fall geschah dies auf Einzelmolekülebene, worauf die Auswertung nach der FRET-Effizienz erfolgte. Die FRET-Effizienzen ließen sich wiederum in absolute Distanzen umrechnen, woraus um jeden Befestigungspunkt eines Akzeptors eine Sphäre mit der Distanz als Radius erstellt werden konnte. Schnitten sich zwei solche Kugeln noch in einer Ebene, so führte die Addition eines dritten Abstands nur noch zu einem möglichen Schnittpunkt. Um einen möglichen Fehler bzw. die Ungenauigkeit bestimmen zu können, wurde eine vierte Distanz eingeführt werden, die nur im Idealfall zum immer gleichen Schnittpunkt führte. In der Praxis führten vier Triangulationen zu vier Schnittpunkten, die dann miteinander verglichen werden konnten.

Damit konnte für definierte Längen der RNS, bis zu 35 Basen insgesamt, ein bevorzugter Aufenthaltsbereich ihres jeweiligen Endes bestimmt werden. Dies war aufgrund der intrinsischen Flexibilität der RNS mittels Röntgenstrukturanalyse zuvor nicht durchführbar. Zur Kontrolle dieser Methode wurden bereits zuvor bekannte Abstände frei definierter Stellen bestimmt und im Rahmen der Meßgenauigkeit bestätigt. Dieses System und die Analyse-methode bedingten jedoch, daß weder Dynamik noch Veränderungen der Proteinstruktur Einfluß ausüben durften. Sichergestellt wurde dies unter anderem durch die Verwendung eines RNS-DNS-Hybrids (Abb. 47), das bereits erfolgreich zur Kristallisation des Elongationskomplexes eingesetzt wurde und somit wenig Bewegungsfreiheit innerhalb der Polymerase bot, die wiederum zu Fluktuationen hätte führen können. Man sieht, daß der Donor-Farbstoff jeweils am Ende der zu untersuchenden RNS (Abb. 47, farbige Kreise 17-35) befestigt wurde. Der Akzeptor befand sich an wahlweise zwei definierten Positionen der zu transkribierenden DNS (Abb. 47, grüne Kreise). Die nicht-komplementäre Sequenz der beiden DNS-Stränge (Abb. 47, Position -10 bis +3) führt zu einer leichten Aufspaltung der Doppelhelix, die im Verbund mit der Polymerase zu einer sehr starren Fixierung ihrer rela-

tiven Position führt. Ohne Zugabe von Ribonukleotiden ist sowohl eine Aufspaltung in Transkriptionsrichtung als auch entgegengesetzt dazu (Rückwärtsbewegung) energetisch ungünstig, da eine entsprechende Basenpaarung am jeweils anderen Ende der Blase nicht zu einem Energiegewinn führt.

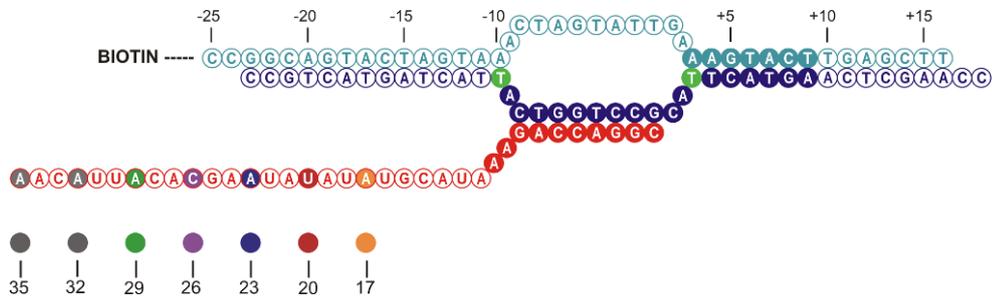


Abb. 47: Schematische Abbildung des RNS-DNS-Hybrids zur Herstellung der Elongationskomplexe.

Nukleotide, deren Position aus der Kristallstruktur hervorgingen sind als farbig hinterlegte Kreise dargestellt (RNS rot, zu transkribierende DNS dunkelblau, nicht-transkribierte DNS cyan). Die nt-DNS verfügt über nicht-komplementäre Sequenz und bildet die künstliche Transkriptionsblase. Die unbekannt Positionen sind durch invertierte Kreise gekennzeichnet. Der Donor wurde an unterschiedlichen Längen der RNS (farbige Kreise 17-35) verankert, während der Akzeptor an der zu transkribierenden DNS (grün) befestigt wurde. Über Biotin am Ende der nicht-transkribierten DNS konnte das Konstrukt immobilisiert werden.

Obwohl der Schwerpunkt dieser Experimente in der Bestimmung von bis dahin noch unbekannt, aber statischen Punkten lag, waren bestimmte Längen der RNS (26, 32, 35 Basen) dennoch so flexibel, daß kein eindeutig bevorzugter Aufenthaltsbereich bestimmt werden konnte. Dies tat der Methode aber keinen Abbruch, da man statt dessen in der Lage war, mehrere Positionen (für 26 Basen) zu definieren. Die Herangehensweise konnte außerdem dazu verwendet werden, dynamische Prozesse wie den Einbau von Nukleotiden im Rahmen der Transkription zu beobachten.

Es lag also nichts näher, als dieses System in Kombination mit Rad26 einzusetzen. Neben der sehr guten Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit nicht nur statische Strukturen zu untersuchen, bot dieses System weitere folgende Vorteile. Das Rad26 mußte nicht zwingend mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen werden, der möglicherweise seine Aktivität oder Stabilität beeinflußt hätte. Außerdem umgeht man das Problem, das Rad26 spezifisch markieren zu wollen, ohne seine Kristallstruktur zu kennen. Ein weiterer Pluspunkt war, daß eine RNS-Polymerase II, die an einem Schaden in der DNS liegen bleibt, sich in ihrer Inflexibilität und übergeordneten Konformation nicht von derjenigen unterscheidet, die durch eine künstlich erstellte Transkriptionsblase fixiert wird[124]. Als Bindungspartner sollten also beide gleich gut geeignet sein, im Fall des künstlichen RNS-DNS-Hybrids existiert zudem eine ausgezeichnete Charakterisierung in Form einer Kristallstruktur.

Bei der Zugabe von Rad26, so war der Gedanke, kommt es nun zu Veränderungen, indem das bisher statische System durch das Binden des Enzyms verändert wird.

Wie sich dies letzten Endes äußert, kann anhand der Hypothesen abgeleitet werden (vgl. Kapitel 2.8). Daher wurde diese Arbeit dahingehend strukturiert, daß für jede Hypothese mögliche Experimente formuliert wurden, die mit Hilfe des Systems zu einer Bestätigung oder Ablehnung führen sollten.

Mit diesem System mußten aber nicht zwingend Experimente mit FRET durchgeführt werden. Durch die Markierung der einzelnen Bestandteile mit einem Fluoreszenzfarbstoff waren auch Messungen durchführbar, die nur daran interessiert waren, diese Komponenten parallel visualisieren zu können. Die Gel-Elektrophorese zur Auftrennung etwaiger Spaltprodukte sei nur ein mögliches Beispiel. Es konnten aber auch andere fluoreszenzbaasierte Methoden eingesetzt werden, wie die Anisotropie zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten oder zur Abschätzung der freien Beweglichkeit eines Moleküls.

7.2.1. Anwendung des Modellsystems auf die Verschiebung

Definitiv muß es zu einer effektiven Änderung der FRET-Effizienz des Donor-Akzeptor-Paares kommen, um das beschriebene System sinnvoll einsetzen zu können. Selbst wenn keine absolute Distanzänderung eintreten sollte, so wären bereits Umstrukturierungen gefolgt von einer unterschiedlichen Beweglichkeit der Farbstoffe ausreichend, die berechnete FRET-Effizienz zu verändern.

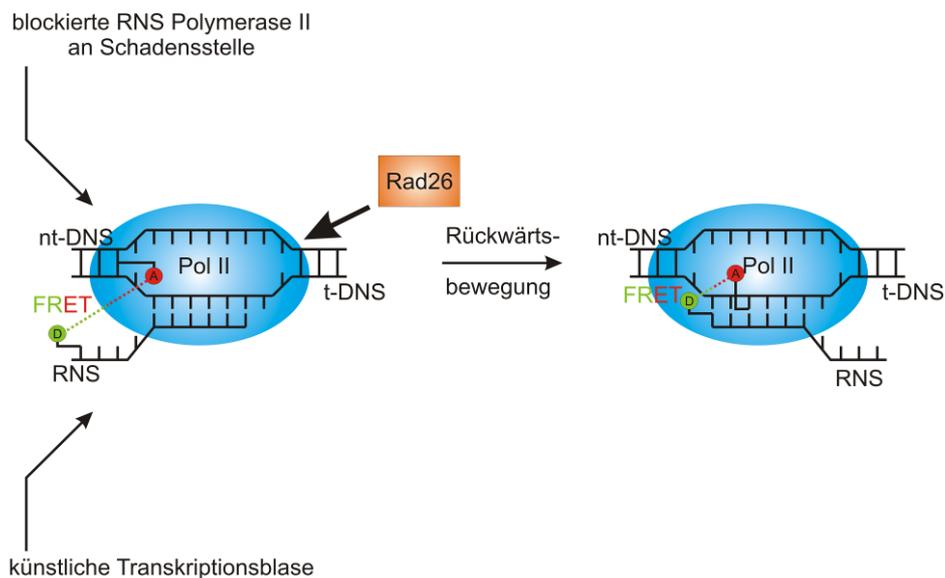


Abb. 48: Schematisches Modell zur Beobachtung des möglichen Effekts des Rad26 auf den Elongationskomplex am Beispiel der Rückwärtsbewegung.

Die Struktur des Elongationskomplexes aus RNS-Polymerase II (blau) und Transkriptionsblase (RNS-DNS-Hybrid) zeigt *in vivo* und *in vitro* in erster Näherung die gleiche Struktur (links). Die Distanz zwischen Donor und Akzeptor ist groß, dementsprechend ist die FRET-Effizienz niedrig. Zugabe von Rad26 (orange) führt zu einer Rückwärtsbewegung um 4 Basen, worauf die Distanz der beiden Farbstoffe sinkt und die FRET-Effizienz steigt.

Symbolisch soll dazu Abbildung (Abb. 48) dienen, die am Beispiel der Rückwärtsbewegung auf einfache Weise die zu bestimmende Funktion des Rad26 darstellt. Unabhängig davon, ob die Polymerase (Abb. 48, blau) durch einen Schaden in der DNS blockiert oder künstlich an einer definierten Position fixiert wurde, ergibt sich dieselbe Struktur des Elongationskomplexes (Abb. 48, links)[124]. Zwei an ausgewählten Positionen befestigte Farbstoffe (Abb. 48, Donor D grün, Akzeptor A rot) treten durch resonanten Energietransfer in Wechselwirkung miteinander und liefern eine zu bestimmende FRET-Effizienz. Zugegebenes Rad26 (Abb. 48, orange) verschiebt die Polymerase entgegen der Transkriptionsrichtung, wie eine der zuvor aufgezählten Hypothesen postuliert. Die Rückwärtsbewegung entlang der DNS um beispielsweise vier Basen führt zu einer Veränderung des Abstands der beiden Farbstoffe bzw. der gemessenen FRET-Effizienz. Dies kann dynamischer Natur sein und dadurch Vor- und Rückwärtsbewegung beinhalten oder aber stetig in eine Richtung ablaufen. Sofern die FRET-Effizienz davon betroffen sein sollte, muß es möglich sein, diese Bewegung zu messen.

7.3. Expression von Vollängen- und gekürztem Konstrukt

Es wurden zwei Konstrukte des Rad26 exprimiert. Neben der vollen Länge des Proteins mit 1085 Aminosäuren wurde auch eine verkürzte Version erstellt, bei der am N-terminalen Ende 204 Aminosäuren entfernt wurden. Im Prinzip sollte das Vollängen-Protein untersucht werden, da dort die gesamte Einheit vorliegt. Dabei mußte aber erst die generelle Kompatibilität des Expressionssystems und der verwendeten Aufreinigungsverfahren unter Beweis gestellt werden. Das im direkten Vergleich größere Vollängen-Protein mußte nämlich in Insektenzellen hergestellt werden, in die Baculoviren als Vektoren eingebracht wurden.

Besonderes Augenmerk stellte dabei die Aufreinigungsmethode dar, die neben der gängigen Affinitätschromatographie über einen angehängten poly-Histidin-Rest zusätzlich eine weitere über einen sogenannten Strep-Tag beinhaltet. Dazu wurde am N-terminalen Ende eine kurze Sequenz (WSHPQFEK) angefügt, die sehr spezifisch ($K_m = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) an Streptactin, einem Derivat des Streptavidin, bindet. Die Grundlage des Aufreinigungssystems ist eine matrix-gebundene Form dieses genetisch veränderten Streptavidin-Moleküls, woran das aufzureinigende Protein mit seiner acht Aminosäuren langen Erkennungssequenz spezifisch bindet. Diese Methode bietet den Vorteil einer noch spezifischeren Aufreinigung gegenüber bereits in der Wirtszelle vorhandenen Proteinen.

Eine nichtspezifische Anbindung an die von Streptactin bedeckte Matrix soll um ein Vielfaches geringer ausfallen als im Vergleich zu einer mit poly-Histidin besetzten Säule. Nachteile ergaben sich im molekularbiologischen Arbeiten kaum, da zum einen die angehängte Sequenz unbedeutenden Einfluß auf die Gesamtintegrität bzw. Stabilität zeigt. Zum anderen störten die eingesetzten Chemikalien bei der weiteren Handhabung auf biochemischer Ebene nicht. Eine alternative Gelfiltration des Vollängen-Proteins konnte aufgrund seiner verminderten Stabilität nicht durchgeführt werden, was den Einsatz der Strep-tag Technologie zusätzlich erforderte.

Das Expressionssystem funktionierte einwandfrei und lieferte Enzymmengen von mehreren hundert Mikrogramm. Die zusätzliche Aufreinigung über einen Strep-Tag am Vollängen-Konstrukt erwies sich als problemlos. Nur im Zusammenhang mit der eingesetzten Methode in der vorliegenden Arbeit, die extrem sensitiv arbeitet und damit einzelne Moleküle zu detektieren vermag, ergaben sich unerwünschte Nebeneffekte. Zur Elution des gebundenen Proteins wird üblicherweise Desthiobiotin eingesetzt, ein Derivat des Biotins. Dieses verzeichnet im Vergleich zum natürlichen Biotin ein reversibles Anbinden an die Matrix, hervorgerufen durch eine entschieden verringerte Affinität. Zur Regeneration der Affinitätsmatrix muß dieses ebenfalls ersetzt werden, wofür 2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure (HABA) eingesetzt werden muß. HABA ist zugleich eine sehr intensiv rot bis orange gefärbte Substanz. Dieser Farbwechsel kann obendrein verwendet werden, um den Fortschritt der Regeneration der Matrix abzuschätzen.

Eben diese beiden Substanzen können jedoch stark mit der eingesetzten Methode der Molekülimmobilisierung bzw. Visualisierung interferieren. Die Oberflächen, die für die Messungen mittels TIRF verwendet werden, sind mit einer Schicht aus NeutrAvidin, einem ebenfalls veränderten Streptavidin-Molekül, bedeckt. Die Affinität zwischen Desthiobiotin und NeutrAvidin bzw. Avidin wird zwar durchaus von Biotin übertroffen (5×10^{-13} M bzw. 1×10^{-15} M) und somit kann jederzeit Desthiobiotin von ihm ersetzt werden. Auf der anderen Seite befinden sich die zu untersuchenden Proteine nach der Aufreinigung in einer Konzentration zwischen 1×10^{-5} - 1×10^{-6} M, während Desthiobiotin unverdünnt (2.5 mM) mit dem eluierten Protein ausgewaschen wird. Eine weitere Aufreinigung des Proteins würde also mindestens einen Faktor 100 benötigen, um auf identische Konzentrationen zu gelangen. Dies ist jedoch im Vergleich zu HABA ein vergleichsweise geringes Übel, da die eingesetzte Biotin-Variante nicht autofluoreszent ist. HABA ist jedoch für sich genommen ein Azofarbstoff mit einem Extinktionskoeffizienten von $34.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}$ und daher potentiell sichtbar in Einzelmolekül-Experimenten. Aufgrund seiner noch geringeren Affinität an Avidin (6×10^{-6} M) als Desthiobiotin und damit vermutlich auch an Streptactin muß es im großen Überschuß eingesetzt werden, was in der Praxis Konzentrationen im hohen millimolaren Bereich entspricht. Dies wiederum bedeutet, daß dem, nach der Aufreinigung von anderen Proteinen, sehr saubere Rad26 zwei inkompatible Substanzen zugesetzt werden

müssen, die eine weiterführende Messung auf Einzelmolekül-Ebene nahezu unmöglich machen. Deswegen wurde das Vollängen-Konstrukt nicht auf Einzelmolekül-Ebene untersucht, sondern beispielsweise nur bei Aktivitätsmessungen als Referenz herangezogen.

Für den Fall, daß die verwendeten Methoden nicht mit der Einzelmolekül-Mikroskopie vereinbar waren, diente das verkürzte Konstrukt als Alternative. Es konnte aufgrund seiner verringerten Größe problemlos in *E. coli* überexprimiert werden. Auf der anderen Seite wies das verkürzte Enzym, wie sich im Lauf der Arbeit herausstellte, kaum Veränderungen in seiner Funktionsweise auf. Darüber hinaus verfügte das kürzere Konstrukt über etwas bessere Stabilität, was sich auch in der aufgereinigten Proteinmenge äußerte. Obwohl hier nur eine Nickel-Histidin-Affinitätschromatographie angewendet werden konnte und ebenfalls keine anschließende Gelfiltration, konnte dennoch ein vergleichbar hoher Reinheitsgrad erzielt werden.

7.4. Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Im Gegensatz zum SSO1653 existiert bis dato noch keine Kristallstruktur des Rad26. Das heißt, es konnte weder abgeschätzt werden, ob bestimmte Aminosäuren bevorzugt mit Farbstoffen umzusetzen gewesen wären, noch machte es Sinn, eine zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren durchzuführen. Das Rad26 verfügt in beiden Varianten über neun Cysteine, sodaß nicht einmal hiermit eine grobe Abschätzung ihrer Aufenthaltsorte gelingt. Im Prinzip wäre auch eine Disulfid-Brücke über ein oder mehrere Cystein-Paare denkbar, die auf diese Weise unreaktiv würden. Das gekürzte Konstrukt besitzt andererseits 80 Lysine. In der vollen Länge steigt diese Zahl auf 101. Eine solche Anzahl erleichtert zwar die prinzipielle Möglichkeit der Markierung, dafür erfolgt eine gleichzeitige Umsetzung völlig unspezifisch an vielen verschiedenen Resten beim Einsatz nicht-äquimolarer Mengen bzw. an Resten, die von Protein zu Protein variieren können, wenn die Zugabe stöchiometrisch erfolgt. Es mußten daher alternative Methoden eingesetzt werden mit denen, ohne spezifische Kenntnis über die relative Position des Farbstoffs, die Aktivität des Rad26 an der RNS-Polymerase II untersucht werden konnte.

Dennoch wäre bereits ein Farbstoff pro Proteinmolekül eine ausreichende Markierungseffizienz, besonders im Hinblick auf die direkte Visualisierung des Rad26 und der möglichen Verfolgung seiner Trajektorie. Auch zur Bestimmung der Interaktion zwischen Rad26 und der RNS-Polymerase II wurde die Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs zwingend benötigt (vgl. Kapitel 7.7). Für die Auswahl der Farbstoffe galten die Ausführungen im Methodikteil analog (siehe Kapitel 3.1.1). Da bei der Markierung mit SSO1653 ausgezeichnete Erfahrungen gesammelt wurden im Umgang mit den Farbstoffen Cy3, Cy5 sowie Alexa 647

wurden sie auch hier wieder eingesetzt. Da keine spezifische Anbindung sondern nur das generelle Markieren im Vordergrund stand, wurden neben den Maleimid-Derivaten der zuvor genannten Farbstoffe auch deren NHS-Varianten eingesetzt.

Alexa 647 wurde in einem 15-fachen Überschuß im Verhältnis zur Enzymkonzentration verwendet bei einer Reaktionsdauer von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Außer in dieser Zeit wurde sehr genau auf die Einhaltung einer Temperatur von 4 °C geachtet. Vorab wurde das Protein zwei Mal aufgereinigt, um sämtliche Spuren von Chemikalien bzw. Salzen zu entfernen, die Amingruppen tragen. Ansonsten würden diese Gruppen anstatt des Proteins reagieren, allein schon aufgrund der vielfach höheren Konzentration. Nicht umgesetzter Farbstoff wurde mit Hilfe der Size-Exclusion-Chromatographie entfernt. Erfolgreich markiert wurde Rad26 mit Alexa 647, nicht aber mit Cy3 oder Cy5, was womöglich den unterschiedlichen Strukturen der Farbstoffmoleküle zuzurechnen ist. Dieses Verhalten zeigte sich jedoch unabhängig vom verwendeten Puffersystem.

Es stellte sich dabei sehr deutlich heraus, daß weder die Umsetzung mit Maleimid- noch mit NHS-Derivaten zu Effizienzen von mehr als drei Farbstoffen pro Enzym führte, unabhängig von den versuchten Anpassungen der Reaktionsbedingungen. Dies wäre im Fall der Cysteine, über deren relative Lage im Protein keine Informationen existieren, nicht sehr verwunderlich. Vermutlich wären sie im Inneren angesiedelt und daher schlecht erreichbar. Eine andere Erklärung wären zwei bis drei verbrückende Disulfid-Reste. Daß jedoch die Reaktion mit NHS-Estern selbst bei einem bis zu 20-fachen Überschuß in einer solch niedrigen Effizienz resultiert, verwundert schon. Bei weit mehr als 50 vorhandenen Lysinen ist es schwer vorstellbar, daß nur maximal zwei bis drei davon außen an der Proteinoberfläche vorkommen bzw. erreichbar sind.

Zudem zeigte weder eine Erhöhung der Temperatur noch des pH-Wertes eine nennenswerte Verbesserung. Die Erhöhung von Raumtemperatur auf 37 °C führte sogar zu einer erhöhten Aggregation des Rad26 während der Markierungsreaktion, womöglich zurückzuführen auf dessen ohnehin eingeschränkte Stabilität. Im Falle der Erhöhung des pH-Werts in das leicht alkalische (pH 8 - 8.5) erscheint dies verständlicher, da der isoelektrische Punkt des Rad26 zwischen 6 und 7 liegt und damit deutlich niedriger als der für SSO1653 mit einem pI von über 9, bei dem diese Veränderung von Erfolg geprägt war. Die Zusammensetzung des verwendeten Puffers war größtenteils unwichtig für die Umsetzungseffizienz, sie war jedoch für die Rückgewinnung von Bedeutung. So war in Puffern, die lediglich auf Hepes und Natriumchlorid basierten, eine Markierungsreaktion praktisch nicht durchführbar. Dies ist um so erstaunlicher, bedenkt man die Komposition des Puffers bei dem die höchsten Aktivitäten gemessen wurden und der auf den gleichen Bestandteilen basiert. Einzig zusätzliches Magnesiumchlorid und Glycerin unterscheiden ihn sowie die doppelt so hohe Gesamtionenkonzentration. Möglicherweise führte die Zugabe von Glycerin zu einer besseren Löslichkeit bzw. verhinderte es die Aggregation.

Da ursprünglich nicht klar war, ob das markierte Enzym verstärkt an der chromatographischen Matrix adsorbiert oder die Farbstoffmarkierung selbst die Ursache für die geringe Rückgewinnung war, wurden auch Versuche mit schwimmenden Dialysebehältern durchgeführt. Leider war die Handhabung sehr schlecht und benutzerunfreundlich, so daß mehrmals noch unaufgereinigte Reaktionslösungen verloren gingen, weil beim Zusammenbau der Behälter durch den kurzzeitig erhöhten Innendruck beim Verschließen des Gefäßes die Dialysemembranen rissen. Die Markierungseffizienzen wurden über UV-VIS Spektroskopie bestimmt, analog Kapitel A.4.

7.5. Aktivitätstests

Zur Aktivitätsmessung wurde ebenfalls die Phosphatkonzentration mit Hilfe von Biomol Green bestimmt. Es mußte zwar eine eigene Kalibrationskurve aufgezeichnet werden, da sich die Pufferzusammensetzung änderte. Prinzipiell kann aber exemplarisch auf Abb. 28, Kapitel 6.4 verwiesen werden, da die Gerade ebenfalls linear verläuft, nur eben mit einer leicht veränderten Steigung. Generell galt aber auch hier, daß sich die zu bestimmende Phosphatmenge in einem bestimmten Bereich zu bewegen hatte, um sowohl sensitiv für kleine Veränderungen zu sein wie auch dynamisch für größere Sprünge. Ebenso mußte die Zeit für die Inkubation mit Biomol Green genau eingehalten werden, um keine zu hohen und damit systematisch falschen Aktivitäten zu erhalten.

Das ungekürzte Rad26 unterlag wie im vorigen Kapitel 7.3 beschrieben noch der zusätzlichen Veränderung durch Einführung des sogenannten Strep-Tag. Laut Herstellerangaben soll diese kurze Sequenz, die zusätzlich dem Protein angefügt wird, keinen Einfluß auf Proteinstrukturen oder Aktivitäten besitzen, was angesichts der Anzahl der Aminosäuren, 8 gegen 1085, auch glaubhaft erscheint. Die damit verbundene Aufreinigungsmethode hätte jedoch negative Auswirkungen haben können, die es zu erkennen galt. Aufgrund des Wirtsorganismus *S. cerevisiae* wurde die Aktivitätsmessung des Enzyms im neutralen pH-Bereich bereits bei Temperaturen zwischen Raumtemperatur und 40 °C durchgeführt. Zudem wurde auch der Einfluß aller möglichen Substrate (dsDNS, ssDNS, RNS) untersucht.

Es trat bei diesem Enzym ein sehr unerwarteter Effekt auf, nämlich die höhere Aktivität des gekürzten Konstrukts gegenüber dem Vollängen-Protein. Eine naive Herangehensweise ließe vermuten, daß bei der Entfernung von Bestandteilen eines Proteins auch seine Aktivität sinken müßte. In diesem Fall scheinen Domänen entfernt worden zu sein, die möglicherweise eine spezifische Substratbindung steuern oder durch ihren regulativen Charakter die Aktivität einschränken.

7.5.1. Aktivität an doppelsträngiger DNS

Die Tab. 5 zeigt einen Überblick der Aktivität der beiden Konstrukte des Rad26 in Abhängigkeit der Länge des Substrats.

Konstrukt	ATPase-Aktivitäten [ATP min ⁻¹ Proteinmolekül ⁻¹]			
	dsDNS (25 Bp)	dsDNS (60 Bp)	dsDNS (100 Bp)	polydA-polydT- DNS (230 Bp)
Volllänge	16 ± 4	28 ± 4	30 ± 5	8 ± 4
R881(gekürzt)	62 ± 5	57 ± 3	72 ± 5	7 ± 2

Tab. 5: ATPase-Aktivitäten von Rad26 (nicht-markiert, pH 7.4, 37 °C) an dsDNS.

Das gekürzte Konstrukt zeigt wesentlich höhere Aktivität. Die Aktivität steigt leicht mit zunehmender Länge des Substrats. Der Fehler ergibt sich aus der Mittelung von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

Bei doppelsträngiger DNS scheint das kürzere Konstrukt etwa 2 - 4 mal aktiver zu sein als sein unmodifiziertes Gegenstück. Dabei ist auffallend, daß die Länge des Substrats kaum Einfluß auf die Enzymaktivität des kürzeren Konstrukts hat. Zwischen 25 (62 ATP pro Minute und Protein) und 60 Basenpaaren (57 ATP) scheint gar kein meßbarer Unterschied aufzutreten. Selbst eine Vervierfachung der Länge auf 100 Basenpaare verursacht nur eine vergleichsweise unbedeutende Erhöhung (72 ATP), die auch durch Konzentrationschwankungen des Proteins zu erklären wäre. Die noch längere polydA-polydT-DNS mit durchschnittlich 230 Basenpaaren führt erstaunlicherweise zu einem dramatischen Rückgang der Aktivität (7 ATP) gegenüber dem beinahe ebenso langen Strang mit 200 Basenpaaren. Interessanterweise tritt dieser Rückgang der Aktivität bei beiden Konstrukten auf.

Dem gegenüber steht beim Vollängen-Protein beinahe eine Verdoppelung der Aktivität bei einer Verdoppelung der Länge von 25 Basenpaaren (16 ATP) auf 60 Basenpaare (28 ATP). Sie scheint aber hier einen Maximalwert gefunden zu haben, denn eine weitere Verlängerung der DNS auf 100 Basenpaare bewirkt keine dementsprechende Erhöhung der Aktivität (30 ATP). Das Gesamtbild deutet somit auf ein prozessives Verhalten entlang dsDNS hin. Das Protein wird von 25 Basenpaaren bereits stimuliert, hat aber nur wenig Prozessivität, da ab einer Länge von 60 Basenpaaren kein Zuwachs mehr zu erkennen ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon für Rad54 beobachtet[43].

Man darf aber nicht die Möglichkeit der Stimulation durch Bildung von Sekundärstrukturen außer Acht lassen. Der Rückgang der Aktivität bei Verwendung von polydA-polydT-DNS könnte darauf zurückzuführen sein. Andererseits zeigte sich weder bei SSO1653 eine eingeschränkte Aktivität noch konnte dies bei Rad54 nachgewiesen werden[51]. Vermutlich ist dies eher auf die künstlich erzeugte Basenfolge, nämlich ausschließlich Adenin auf dem einen Strang und Thymin auf dem gegenüberliegenden, zurückzuführen.

Es ist zwar aus der Literatur nichts bekannt, daß das Protein sequenzspezifisch arbeitet, aber in diesem Verhalten könnte sich durchaus eine potentielle Substraterkennung zeigen.

7.5.2. Aktivität an einzelsträngiger DNS

Aus der Literatur war bereits bekannt, daß Rad26 nicht nur von doppelsträngiger DNS stimuliert wird, sondern auch einzelsträngige DNS dies vermag. *Guzder et al.* berichteten, daß die Aktivität sogar um den Faktor 3 gesteigert wird[64]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen ein widersprüchliches Bild, wie aus Tab. 6 ersichtlich wird. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß einzelsträngige DNS ein ebenso gutes Substrat für Rad26 ist.

ATPase-Aktivitäten [ATP min ⁻¹ Proteinmolekül ⁻¹]				
Konstrukt	ssDNS (25 B)	ssDNS (60 B)	ssDNS (100 B)	polydT-DNS (319 B)
Volllänge	7 ± 5	10 ± 5	22 ± 4	36 ± 7
R881(gekürzt)	32 ± 2	68 ± 6	110 ± 2	62 ± 7

Tab. 6: ATPase-Aktivitäten von Rad26 (nicht-markiert, pH 7.4, 37 °C) an ssDNS.

Das gekürzte Konstrukt zeigt wesentlich höhere Aktivität. Die Aktivität korreliert mit der Länge des Substrats. Der Fehler ergibt sich aus der Mittelung von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

Man sieht zwar eine Halbierung der Aktivität bei der Vollängen-Form, deren Werte von etwa 16 - 30 ATP pro Minute und Protein auf ca. 7 - 22 ATP zurückgehen. Dennoch zeigt sich auch hier wieder im Rahmen der Meßgenauigkeit ein proportionaler Anstieg der Aktivität in Abhängigkeit der DNS-Länge. Selbiges gilt für die Werte der gekürzten Version, obwohl der Ausgangswert für 25 Basen mit 32 ATP pro Minute und Protein noch unterhalb des Vergleichswerts für den Doppelstrang (62 ATP) liegt. Eine Verdoppelung der DNS-Länge scheint aber trotzdem sehr gut mit einer Verdoppelung der Aktivität zu korrelieren.

Generell gilt aber auch hier, daß die beiden Konstrukte unterschiedlich arbeiten. Das Vollängen-Protein scheint stärker reguliert zu sein, während das gekürzte Konstrukt dagegen weniger spezifisch arbeitet. Lediglich bei polydT-DNS bricht die Aktivität wieder ein (62 ATP), obwohl dort das längste Substrat (319 Basen) vorzufinden ist. Dies könnte begründet sein in der Wahl des Substrats. Einen Einbruch der Aktivität konnte bereits beim äquivalenten Doppelstrang beobachtet werden (Tab. 5). Daß das Rad26 aber auch hier Aktivität (poly-dT-DNS) aufweist, ist bemerkenswert, da diese nicht von der Bildung von Sekundärstrukturen verursacht werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte weder SSO1653[63] noch Rad54[51] nennenswerte Aktivität an einzelsträngiger DNS.

Verstärkte Bildung von Sekundärstrukturen sind dagegen bei den anderen DNS-Substraten nicht auszuschließen und könnten den Zuwachs der Aktivität ebenso gut erklä-

ren wie eine Begünstigung der prozessiven Translokation durch mehr vorhandene Basen. Das Protein würde auf der DNS entlang gleiten, dabei ATP verbrauchen, was mit steigender DNS-Länge um so besser begünstigt wird. Das Protein würde nicht am Ende der DNS abfallen und müsste daher nicht wieder neu binden. Andererseits könnte die steigende Länge der DNS einfach nur eine höhere Anzahl an Bindungsstellen für das Protein bieten. Dies würde sich auf die Affinität und die effektive Konzentration an gebundenem und aktivem Protein auswirken.

7.5.3. Übersicht der Bindungsverhältnisse an DNS

Der Übersichtlichkeit halber werden zunächst in der folgenden Tab. 7 die Bindungsverhältnisse in Form der erwarteten prozentualen Anteile der gebundenen Proteine und der gebundenen DNS bei den verwendeten Bedingungen verglichen.

Bindungsverhältnisse bei Aktivitätstests		
Konstrukt	$K_d = 660 \text{ nM}$	$c[\text{Rad26}] = 50 \text{ nM}$
DNS (25 B) $c[\text{DNS}] = 1 \mu\text{M}$ 1 Bindungsstelle	gebundenes Protein	59,2 %
	gebundene DNS	3,0 %
DNS (60 B) $c[\text{DNS}] = 1 \mu\text{M}$ 2 Bindungsstellen	gebundenes Protein	74,8 %
	gebundene DNS	3,7 %
DNS (100 B) $c[\text{DNS}] = 1 \mu\text{M}$ 4 Bindungsstellen	gebundenes Protein	85,7 %
	gebundene DNS	4,3 %
polydT-DNS (319 B) $c[\text{DNS}] = 1 \mu\text{M}$ 13 Bindungsstellen	gebundenes Protein	95,5 %
	gebundene DNS	4,8 %
polydT-DNS (319 B) $c[\text{DNS}] = 1 \mu\text{M}$ 1 Bindungsstelle	gebundenes Protein	59,5 %
	gebundene DNS	3,0 %

Tab. 7: Übersicht der Bindungsverhältnisse in den Aktivitätstests von Rad26.

Die DNS wird in keinem Fall mehrfach gebunden. Bei Verwendung von DNS mit einer Länge von mehr als 25 Basen existieren aber mehr als eine Bindungsstelle. Zum Vergleich ist polydT-DNS mit nur einer theoretischen Bindungsstelle aufgeführt. Der Anteil an gebundenem Protein wird beinahe halbiert im Vergleich zu 13 vorhandenen Bindungsplätzen. Dies schlägt sich auf die Aktivität nieder.

Diese Ergebnisse beruhen auf einer Dissoziationskonstante K_d von 660 nM, deren Bestimmung im späteren Verlauf (Kapitel 7.6) noch detailliert beschrieben wird. Da sich jedoch diese Bestimmung als sehr schwierig herausstellen sollte, dürfen diese Ergebnisse nicht mehr als ein Erklärungsversuch sein. Bei einer Halbierung der Dissoziationskonstante auf 300 nM beispielsweise, rücken die Anteile der gebundenen Enzyme in einen Bereich von 76 % (25 Basen) bis 92 % (100 Basen) zusammen.

In allen eingesetzten Verhältnissen von Protein zu DNS und bei einer Bindungskonstante von 660 nM wurde ein gebundener Anteil an DNS unterhalb 5 % (Tab. 7) errechnet. Dies spiegelt eine Situation wider, bei der die eingesetzte DNS weit von einem gesättigten Zustand entfernt ist. Man muß jedoch bedenken, daß nur beim kurzen Oligomer von 25 Basen Länge lediglich ein Bindungsplatz zur Verfügung steht. Bei allen längeren Konstrukten sind auch dementsprechend mehr Bindungsplätze vorhanden, was die effektive Konzentration der DNS erhöht. Der Anteil an gebundenem Protein steigt dadurch. Ein Teil des Zuwachses der gemessenen Proteinaktivitäten bei länger werdendem Substrat kann somit auf die effektiv höhere Konzentration an Bindungsstellen zurückgeführt werden. Sie ist aber nicht alleinverantwortlich dafür, da die Anteile an gebundenem Protein nur um etwa 15 % bzw. 25 % steigen, die Aktivitäten sich jedoch jeweils verdoppeln (Tab. 6).

Vor diesem Hintergrund können die Aktivitäten des Rad26 an einzelsträngiger DNS um den Anteil an gebundenem Protein bereinigt und normiert werden. In Tab. 8 sind die normierten Aktivitäten zusammengefaßt. Es fällt auf, daß zwar eine verminderte Korrelation der Aktivität mit der Substratlänge vorherrscht. Das kürzeste Konstrukt gewinnt dabei überproportional an Aktivität (54 ATP), aufgrund der geringeren Quote an gebundenem Protein. Es zeigt sich aber immer noch ein nahezu linearer Verlauf mit steigender Länge des Oligomers und somit ergibt sich ein Zuwachs um etwa 30 - 40 % bei jeder Verdoppelung der Länge (60 Basen: 90 ATP, 100 Basen: 128 ATP). Daß die Aktivität beim Einsatz der polydT-DNS nicht noch weiter steigt, sondern wieder fällt, kann nur mit seiner Struktur zusammenhängen, denn eine Mehrfachbindung des Enzyms und damit eine gegenseitige Behinderung kann nämlich ausgeschlossen werden.

ATPase-Aktivitäten (normiert auf 100% gebundenes Protein)				
[ATP min ⁻¹ Proteinmolekül ⁻¹]				
Konstrukt	ssDNS (25 B)	ssDNS (60 B)	ssDNS (100 B)	polydT-DNS (319 B)
Volllänge	12	13	26	38
R881(gekürzt)	54	90	128	65

Tab. 8: Normierte ATPase-Aktivitäten von Rad26 (nicht-markiert, pH 7.4, 37 °C) an ssDNS.

Das gekürzte Konstrukt zeigt wesentlich höhere Aktivität. Die Aktivität korreliert mit der Länge des Substrats, ist aber nicht 1:1 proportional dazu. Ein Fehler wurde für den qualitativen Vergleich vernachlässigt.

Eine Alternative ließ sich jedoch nicht einsetzen, da einzelsträngige DNS mit mehr als 200 Basen ausschließlich natürlichen Ursprungs ist und somit weitere Artefakte wie eben zum Beispiel Sekundärstrukturen einbringen kann, die die Aktivität beeinflussen. Dies ist wahrscheinlich auch ausschlaggebend für die extremen Aktivitätszuwächse, die von *Guzder et al.* beobachtet wurden[64]. Dort wurde, im Unterschied zu hier, natürlich vorkommende einzelsträngige DNS aus Bakteriophagen (Φ X 174 und m13MP18) verwendet.

Beide weisen eine Länge von mehr als 5.000 Basen auf, zudem liegt ΦX 174 circular vor. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Auswahl der Sequenzen sehr viel Wert gelegt auf möglichst geringe Bildung von Sekundärstrukturen oder Homodimer-Bildung. Damit ist auch ein besserer Vergleich der Aktivitäten zwischen einzel- und doppelsträngiger DNS möglich. Dennoch ist dies besonders bei Längen von 100 Basen nicht gänzlich auszuschließen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Aktivität des Rad26 durchaus von der Länge des eingesetzten Substrats abhängt. Ob dies nun durch prozessives Verhalten ausgelöst wird oder durch Bildung von Sekundärstrukturen kann so letztendlich nicht entschieden werden. Sicher ist nur, daß das Rad26 von einer längeren DNS mehr profitiert als es nur durch die höhere Anzahl an Bindungsstellen zu vermuten wäre. Das Vollängen-Protein lieferte analoge Ergebnisse, aber bei wesentlich niedrigeren ATP-Hydrolysegeschwindigkeiten.

7.5.4. Untersuchung auf Prozessivität

Für eine detaillierte Betrachtung der Abhängigkeit der Aktivität von der Länge des Substrats wurden weitere Messungen durchgeführt, bei denen die DNS-Konzentration so variiert wurde, daß auf ein Proteinmolekül nun immer die gleiche Anzahl an Basen eingesetzt wurde, gleichzeitig jedoch die Gesamtlänge der DNS unterschiedlich war. Konkret wurde die Aktivität an einem 25 Basen langen Oligomer sowie an der 319 Basen langen polydT-DNS verglichen. Die Sequenz des Oligomers wurde nach Gesichtspunkten gewählt, die eine Bildung von Sekundärstrukturen möglichst verhindern, während polydT-DNS diesem Artefakt ohnehin nicht unterliegt.

Vor der Präsentation der Ergebnisse soll die folgende Tabelle (Tab. 9) zuerst einen Überblick geben über die vorherrschenden Bindungsverhältnisse.

Bindungsverhältnisse bei Aktivitätstests (Test auf Prozessivität)		
Konstrukt	$K_d = 660 \text{ nM}$	$c[\text{Rad26}] = 700 \text{ nM}$
ssDNS (25 B) $c[\text{DNS}] = 5 \mu\text{M}$ 1 Bindungsstelle	gebundenes Protein	86,9 %
	gebundene DNS	12,2 %
polydT-DNS (319 B) $c[\text{DNS}] = 391 \text{ nM}$ 13 Bindungsstellen	gebundenes Protein	87,1 %
	gebundene DNS	156 %

Tab. 9: Übersicht der Bindungsverhältnisse in den Aktivitätstests von Rad26 bei hohen Proteinkonzentrationen.

Ein Großteil der DNS ist gebunden, im Fall der polydT-DNS mit 13 Bindungsstellen sogar mehrfach. Der Anteil des gebundenen Proteins ist nahezu identisch.

Man sieht, daß zwischen dem Oligomer mit 25 Basen und der polydT-DNS mit 13 Bindungsstellen kaum ein Unterschied existiert bezüglich des Anteils an gebundenem Protein (86.9 % vs. 87.1 %). Das heißt, die zu erwarteten ATPase-Aktivitäten werden nicht vom Anteil des gebundenen Enzyms abhängen. Die Aktivitäten hängen jedoch von einer etwaigen Prozessivität ab. Somit sollte die Aktivität für den längeren DNS-Strang überproportional ansteigen, wenn das Protein tatsächlich von der unterschiedlichen Länge profitiert. Die Mehrfachbindung im Fall des 319 Basen langen Konstrukts sollte kein Problem darstellen, da sich so immer noch ein durchschnittlicher Freiraum von 205 Basen pro Enzym ergibt, also deutlich mehr als die Vergleichslänge von 25 Basen.

Die Tab. 10 stellt die erzielten Ergebnisse anschaulich gegenüber.

ATPase-Aktivitäten [ATP min ⁻¹ Proteinmolekül ⁻¹]		
Konstrukt	ssDNS (25 B)	polydT-DNS (319 B)
Volllänge	5 ± 2	3 ± 2
R881(gekürzt)	25 ± 4	28 ± 4

Tab. 10: ATPase-Aktivitäten von Rad26 (nicht-markiert, pH 7.4, 37 °C) an ssDNS zum Test auf Prozessivität.

Die Konzentration der DNS wurde so gewählt, daß das Verhältnis von Proteinmolekülen zu DNS Basen konstant blieb ($319 B \div 25 B \times c[\text{Oligomer } 25B]$). Beide Aktivitäten sind gleich. Der Fehler ergibt sich aus der Mittelung von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

Die Referenz-Messung am kürzeren Strang ergaben 25 ATP pro Minute und Protein (Tab. 10), was bedingt mit dem zuvor genannten Wert von 32 ATP (Tab. 6) bzw. 54 ATP (Tab. 8) übereinstimmt. Der Unterschied läßt sich am besten mit dem unterschiedlichem Anteil an gebundener DNS erklären, der in diesem Fall von 3 % (Tab. 7) auf 12 % (Tab. 9) steigt. Größeres Augenmerk sollte dagegen auf die Messung am Strang mit 319 Basen Länge gelegt werden, bei dem sich im Rahmen der Meßgenauigkeit die gleiche Aktivität von 28 ATP pro Minute und Protein ergab. Analoges Verhalten zeigte auch das Vollängen-Konstrukt.

Eine Erklärung für den fehlenden, aber erwarteten Unterschied findet sich in den beiden zuvor angesprochenen Faktoren Affinität und Prozessivität und in ihrem Einfluß auf die Aktivität. Die gleichbleibende Aktivität kann einzig und allein durch Mehrfachbindung (156 %, Tab. 9) erklärt werden. Sekundärstrukturen sind hier völlig auszuschließen. Die auf diese Weise gebundenen Enzyme zeigen aber keinerlei Korrelation mit der Länge des DNS-Substrats.

Damit läßt sich zusammenfassend sagen, daß der Anstieg der Aktivität im Fall der einzelsträngigen DNS (Tab. 6 bzw. Tab. 8) hauptsächlich durch Sekundärstrukturen hervorgerufen wurde. Eine gewisse Prozessivität ist nicht auszuschließen, sieht man sich die Ergebnisse an doppelsträngiger DNS an (Tab. 5). Sie beschränkt sich aber auf Distanzen von we-

niger als 60 Basen. Dies würde gegen ein Bild des Rad26 sprechen, bei dem als suchendes Enzym jederzeit die DNS entlang gleitet, bis es auf ein Hindernis wie beispielsweise in Form der RNS-Polymerase II stößt. Einer Verschiebung der Polymerase, um einen Schaden in der DNS freizulegen, widerspricht dieses Ergebnis jedoch nicht, da hierzu wesentlich weniger Basen zurückgelegt werden müssen.

7.5.5. Aktivität an RNS

Für die vollständige Untersuchung der Substratabhängigkeit des Rad26 wurden auch Experimente an einzelsträngiger RNS durchgeführt. Literaturwerte waren bis zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt, da keine Stimulation vermutet wurde.

Interessanterweise wird das Rad26 auch durch RNS stimuliert, wie man aus Tab. 11 ablesen kann.

ATPase-Aktivitäten [ATP min ⁻¹ Proteinmolekül ⁻¹]		
Konstrukt	ssRNS (26 B)	ssRNS (36 B)
Volllänge	8 ± 4	10 ± 2
R881(gekürzt)	20 ± 2	22 ± 3

Tab. 11: ATPase-Aktivitäten von Rad26 (nicht-markiert, pH 7.4, 37 °C) an ssRNS.

Das gekürzte Konstrukt zeigt leicht höhere Aktivität. Es existiert wenig Korrelation mit der Länge des Substrats. Der Fehler ergibt sich aus der Mittelung von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

Es zeigt sich, daß das Enzym zwar deutlich weniger aktiv an RNS arbeitet als an DNS, dennoch aber meßbare Geschwindigkeiten liefert. Die Zunahme der Aktivität vom Vollängen-Protein zum gekürzten Konstrukt ergibt sich wieder analog zu den anderen Meßwerten. Diese Ergebnisse lassen natürlich neue Vermutungen aufkommen, in welcher Weise das Rad26 seine ATPase-Aktivität verwenden könnte. Wenn es sowohl an DNS wie auch an RNS Aktivität zeigt, dann könnten diese beiden Substrate auch die Bindungspartner sein, sobald die RNS-Polymerase II von einer Schadensstelle wegbewegt werden soll. Sämtliche Messungen an RNS wurden auch unter Zugabe eines RNase-Inhibitors wiederholt, um möglicher Kontamination durch RNasen entgegenzuwirken. Es ergaben sich keinerlei nennenswerte Veränderungen. Kontrollmessungen des RNase-Inhibitors selbst in Kombination mit DNS fielen vom Ergebnis her identisch aus.

7.6. Bestimmung einer Bindungskonstante an DNS

Die Bestimmung der Bindungskonstante wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Anisotropie durchgeführt. Die Vorzüge und Voraussetzungen gelten völlig analog für das Rad26, daher soll an dieser Stelle auf Kapitel 3.3 verwiesen werden. Man durfte bei der Wahl des Farbstoffs jedoch nicht vergessen, daß das Rad26 als Wildtyp mit 124 kDa und als gekürztes Konstrukt mit gut 100 kDa ein relativ hohes Molekulargewicht haben. TAMRA als Farbstoff am eingesetzten Substrat war aber für die Untersuchung dennoch geeignet. Die Messungen wurden angesichts des Wirtsorganismus *S. cerevisiae* nur bei Raumtemperatur durchgeführt, was mögliche Komplikationen bei höheren Temperaturen ausschließt.

Bei der Titration des Proteins gegen die DNS kam es wie beim SSO1653 zur Aggregation bevor eine Sättigung erreicht werden konnte. Dieses Phänomen konnte beim SSO1653 nur in Anwesenheit von Nukleotiden beobachtet werden, beim Rad26 trat eine ähnliche Anomalie auch ohne ATP auf. Sobald eine gewisse kritische Konzentration (300 - 500 nM) erreicht wurde, fiel das Protein aus und die Anisotropie begann stetig zu sinken. Stellvertretend sei an dieser Stelle auf die Abb. 30 in Kapitel 6.5 verwiesen. So sanken die Werte für Rad26 wie die für das SSO1653 unter den des Referenzwertes, also der DNS ganz ohne Protein, obwohl die Konzentration des Rad26 (vgl. SSO1653 2 μM) bereits eine Sättigung hätte erreichen sollen. Unter Zugabe von ATP änderte sich das Gesamtbild zwar. Aber eine Analyse der Daten blieb trotzdem unmöglich, wie die folgende Abbildung (Abb. 49) verdeutlicht.

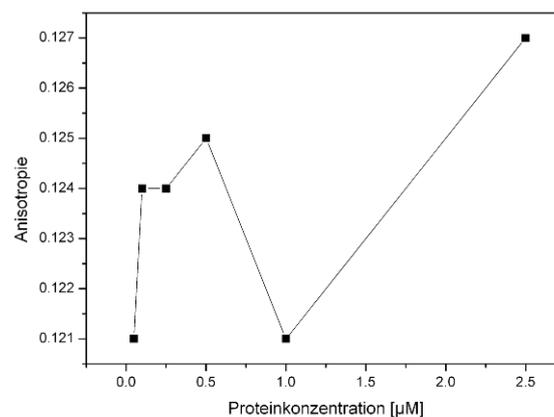


Abb. 49: Darstellung der Anisotropie eines mit TAMRA markierten Oligomers als Funktion der zugegebenen Proteinkonzentration in Anwesenheit von ATP.

Mit zunehmender Proteinkonzentration steigt die Kurve anfangs zwar, fällt dann auf den Referenzwert und steigt wieder an, ohne ein Sättigungsverhalten zu zeigen. Man bemerke die Differenz der Anisotropie von nur 0.006. Der Verlauf kann nicht mathematisch beschrieben werden. Die Meßpunkte wurden nur der besseren Sichtbarkeit halber verbunden.

Hier ist ein Extremfall dargestellt, prinzipiell war dieses Verhalten jedoch reproduzierbar. Nach einem sehr steilen Anstieg, der meist aber nur niedrige Differenzen an Anisotropie (< 0.02) umfaßte, fiel der Wert dann stark, worauf er wieder zunahm.

Man muß dabei bedenken, daß das Protein am Ende der Titration in seiner höchsten zugänglichen Konzentration vorlag, bei der es ohne DNS oder Nukleotide stabil in Lösung gehalten werden konnte. Dennoch änderte sich die Anisotropie nur unmerklich, weshalb kein Sättigungsverhalten festgestellt werden konnte.

Liegen Protein- und Substratkonzentration wie hier in der gleichen Größenordnung wie die spezifische Dissoziationskonstante, dann treten zusätzliche Artefakte auf, die zu einer Überschätzung des Hill-Koeffizienten führen[215]. Diese Fehleinschätzung muß jedoch eine physikalische Ursache besitzen, denn ein nicht-kooperatives Enzym kann nicht einfach durch die Erhöhung der Substratkonzentration kooperative Bindungen eingehen. Welche Ursache hinter diesem Phänomen steckt, konnte nicht geklärt werden. Beim SSO1653 konnte der Prozeß der Aggregation aber zumindest noch visuell verfolgt werden. Beim Rad26 dagegen ergab sich kein visueller Unterschied, wenngleich auch hier die Werte der Anisotropie trotz steigender Proteinkonzentration sanken bzw. kaum Unterschiede zueinander aufwiesen.

Obwohl der Grund nicht bekannt ist, zeigt sich womöglich dessen Auswirkung in einer vermehrten Aggregation im Vergleich zu weitaus niedrigeren Substratmengen. Dieser Vorgang hing nämlich stark von der eingesetzten Substratkonzentration ab. Bei einer Verdünnung der DNS um den Faktor 50 konnte mit definierten Proteinkonzentrationen ein normales Bindungsverhalten beobachtet werden. Es wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen an Rad26 verwendet und deren Einfluß auf die Anisotropie des DNS-Strangs beobachtet. Die Zugabe von 250 nM Protein zeigte bereits einen sehr deutlichen Anstieg des Anisotropie-Werts gegenüber der Referenz. Die kritische Grenze für die Stabilität des Rad26 war wie vorhin erwähnt bei 2 µM erreicht. Deshalb wurde in einer konservativen Abschätzung der Wert bei dieser Konzentration als Sättigungswert angenommen und zusammen mit dem Wert für 250 nM die Dissoziationskonstante aus Gleichung Gl. 50 abgeschätzt. Diese Methode ist mit einem größeren Fehler behaftet, da sie einerseits nicht mehrere Konzentrationen in die Bestimmung einfließen läßt und andererseits den Hill-Koeffizienten voraussetzt. Sie hat aber den Vorteil, auf einfache Weise eine sehr gute Abschätzung der Größenordnung der Affinitätskonstante zu erhalten.

$$K_d = \left(\frac{(r_{100\%} - r_{Ref}) \cdot P_{total}^n}{r_{Probe} - r_{Ref}} - P_{total}^n \right)^{1/n}$$

Gl. 50

Da bisher in der Literatur keine Hypothesen für ein kooperatives Bindungsverhalten aufgestellt wurden, wurde der Hill-Koeffizient auf 1 festgesetzt.

Damit ergibt sich eine Dissoziationskonstante von 660 nM für doppelsträngige DNS, für RNS liegt sie bei etwa 650 nM. Vergleicht man die Konstante mit der von SSO1653, so ist sie etwa doppelt so hoch, was aber auch die schwer bestimmbare Bindung des Proteins erklä-

ren könnte. Messungen über Gel-Elektrophorese am Elongationskomplex zeigten zwar eine Verschiebung der DNS-Banden, aber nicht so eindeutig, wie dies beispielsweise für CSB durch *Selby et al.* publiziert wurde[83].

7.7. Nachweis der Interaktion zwischen Rad26 und Pol II

Es gibt mehrere Ansätze, die verfolgt wurden, um eine Bindung des Rad26 an den Elongationskomplex oder eines seiner Komponenten, allen voran die RNS-Polymerase II, nachzuweisen. Abgesehen von der Erzeugung von Streß in der Struktur der DNS beispielsweise in Form von Supercoils setzt jede Art von Veränderung der Polymerase, sei es eine Verschiebung oder eine Konformationsänderung, voraus, daß zwischenzeitlich ein direkter Kontakt zwischen Rad26 und der Polymerase hergestellt wird. Es werden also in den nachfolgenden Unterkapiteln zwei verschiedene Vorgehensweisen präsentiert, um die Bindung des Rad26 an die Polymerase zu detektieren.

7.7.1. Bestimmung des Bindens über Fluoreszenz-Anisotropie

Zur Bestimmung einer möglichen Bindung wurde die Anisotropie von farbstoffmarkiertem Rad26 nach der Zugabe von Polymerase untersucht. Zwar ist die Affinität von RNS-Polymerase II und Rad26 unbekannt, aber um dem entgegenzuwirken wurden Konzentrationen des Substrats an der Detektionsgrenze (hier 5 nM) eingesetzt, während die Polymerase im Überschuß zugegeben wurde. Dazu wurde sie in den höchsten Konzentrationen verwendet, die zugänglich waren.

Die Anisotropie des Farbstoffs Alexa 647 an Rad26 fällt vergleichsweise schwach aus mit einem Wert von 0.165. Die Zugabe von RNS-Polymerase II ändert die Anisotropie jedoch nicht, sie sinkt sogar ein wenig auf 0.161. Beim RNS-DNS Hybrid zeigte sich mit dem gleichen Farbstoff noch ein Wert von 0.182, obwohl die molekulare Masse dort nur knapp 28 kDa betrug. Das muß bedeuten, daß der Farbstoff relativ frei rotiert, aber dennoch durch die Kopplung nicht vollständig isotrop fluoreszieren kann. Der Vergleich zum sehr starr fixierten Alexa 647 im Elongationskomplex mit einer Anisotropie von 0.302 beweist, daß durchaus hohe Anisotropien erreicht werden können, wenn der Farbstoff vor der Massenänderung ausreichend stark fixiert gewesen wäre.

Natürlich hängt diese Messung sehr vom angebondenen Farbstoff ab. Kann er frei rotieren, wird sich die Anisotropie nie ändern, auch wenn sich das Massenverhältnis hier von

etwa 100 kDa auf insgesamt 600 kDa vergrößert. Für eine Übersicht zur Anwendung der Fluoreszenz-Anisotropie sowie einer graphischen Veranschaulichung ihres Verlaufs in Abhängigkeit der Fluoreszenz-Lebensdauer des eingesetzten Farbstoffs wird auf Abb. 14, Kapitel 3.3 verwiesen.

Es ist außerdem leicht ersichtlich, daß bei einem Protein wie Rad26 ein Farbstoff eingesetzt werden mußte, der über ausreichende Fluoreszenz-Lebenszeit (> 1 ns) verfügt. Ein Farbstoff wie TAMRA konnte ebenfalls nicht eingesetzt werden, zumal über eine Aufspaltung des Absorptionsspektrums bei Anbindung an Proteine berichtet wird[216-218]. Es ist nicht auszuschließen, daß sich dabei nicht auch andere Eigenschaften wie Lebenszeit oder Quantenausbeute ändern. In diesem Zusammenhang muß zusätzlich noch erwähnt werden, daß der verwendete Farbstoff Alexa 647 nur eine Fluoreszenz-Lebenszeit von 1.0 ns[219] besitzt, was effektiv den dynamischen Bereich einschränkt hätte, wäre der Farbstoff stärker am Rad26 angelagert gewesen. Leider mißglückten sämtliche Versuche, andere Farbstoffe mit längerer Lebenszeit wie Atto 532 (3.8 ns[220]) an das Rad26 anzukoppeln.

Statt dessen wurde die Bindung von Rad26 an RNS Polymerase II auf Einzelmolekülebene untersucht.

7.7.2. Bestimmung des Bindens über Co-Lokalisation auf Einzelmolekülebene

Da über Änderungen der Anisotropie keine Bindung des Rad26 an die Polymerase festgestellt werden konnte, wurden Experimente am Einzelmolekül-Mikroskop durchgeführt, bei denen die Bindung des Rad26 direkt visualisiert werden konnte. Quantitativ wurde der Anteil der gebundenen Enzymmoleküle durch die Anzahl von co-lokalisierten einzelnen Molekülen bestimmt. Dazu bedurfte es zweier unterschiedlicher Fluoreszenz-Markierungen in verschiedenen Spektralbereichen der zu untersuchenden Partner. Das Rad26 wurde zu diesem Zweck beispielsweise mit einem rotfluoreszierenden Fluorophor versehen (vgl. Kapitel 7.4), während im Elongationskomplex an eines der Bestandteile ein Farbstoff angebunden wird, der im Grünen anregbar ist.

Die Immobilisierung des Elongationskomplexes an der Quarzglas-Oberfläche erfolgte wie bei den anderen Einzelmolekül-Experimenten anhand der biotinylierten DNS mit dem Unterschied, daß ausschließlich fluoreszenzmarkierte RNS eingesetzt wurde, um die Position der Polymerase zu detektieren. Aufgrund der Instabilität des RNS-DNS-Hybrids bei Raumtemperatur können nur RNS-Moleküle auf der Oberfläche binden, die in einem Elongationskomplex eingebettet sind. Sie weisen keine eigene Biotinylierung auf und binden auch nicht unspezifisch, wie durch Testmessungen gezeigt werden konnte. Selbstverständlich mußten für diese Art der Experimente Voraussetzungen geschaffen werden, die falsch-

positive Resultate durch unspezifische Interaktionen vermeiden bzw. ausschließen. Dies wurde durch Passivierung der Quarzglas-Oberflächen bewerkstelligt (vgl. Kapitel 4.2.3).

Das Rad26 wurde zu den immobilisierten Molekülen gegeben, worauf die gleichzeitige Visualisierung erfolgte. Dazu kam das in dieser Arbeit vorgestellte einzelmolekülaugliche TIRF-Mikroskop zum Einsatz, das über spektrale Trennung der Emissionskanäle verfügt. Sobald ein Signal gleichzeitig in beiden Kanälen bei abwechselnder Anregungswellenlänge auftrat, wurde es als Paar gewertet. Dazu ging man von der Voraussetzung aus, daß zwei Moleküle, die den gleichen beugungslimitierten Punkt auf einer Oberfläche besetzen, mit großer Wahrscheinlichkeit eine direkte Interaktion zueinander ausüben.

Um die Anzahl an co-lokalisierten Molekülen zu zählen, durchliefen die Signale dieselben Kriterien und Auswahlschema wie es bei der Analyse eines FRET-Paares der Fall gewesen wäre. Moleküle in nur einem Kanal wurden aussortiert und getrennt gezählt. Hierzu wurde das für die Analyse der Intensitäts-Zeit-Spuren entworfene Programm verändert, wodurch ein reines Zählprogramm in beiden Fluoreszenzkanälen entstand. Eine Gegenüberstellung der gezählten Moleküle findet sich in Tab. 12.

Vorab muß noch der Begriff Detektionsgrenze definiert werden. Es handelt sich dabei um nichts anderes als den Grenzwert, der bereits in Kapitel 5.6 beschrieben wurde. Kurz zusammengefaßt werden sämtliche Pixel der Intensität nach indiziert und der absolute Wert notiert, der die Grenze zum gewählten Bruchteil aller Pixel beschreibt.

Anzahl des co-lokalisierten Rad26 an RNS-Polymerase II					
Detektionsgrenze	Paare	Donor	Akzeptor	Paare rel. zu Donor	Paare rel. zu Akzeptor
5 %	2605	14530	20188	18 %	13 %
2 %	947	9120	12030	10 %	8 %
1 %	412	7020	7000	6 %	6 %

Tab. 12: Übersicht der Zahlenverhältnisse durch Co-Lokalisation von Rad26 an immobilisierter RNS-Polymerase II.

Auf Einzelmolekülebene wurde Rad26 mit Elongationskomplex zusammengegeben und die Zahl an co-lokalisierten Signalen ermittelt. Die frei gewählte Detektionsgrenze (1 % - 5 %, Definition siehe Text) ergibt eine unterschiedliche relative Anzahl (z. B. 6 % vs. 18 %) aufgrund limitierenden Verhältnisses von Signal zu Rauschen.

Im niedrigen Fall umfaßt diese Grenze die höchsten 5 %, während bei der hohen Grenze nur die hellsten 1 % erfaßt werden. Diese Definition wurde gewählt, um weniger zufällig eine Grenze zu bestimmen, sondern dies übergreifend über alle Messungen einer Serie zu erledigen. Außerdem haben die eingesetzten Farbstoffe zum einen eine unterschiedliche molekulare Helligkeit, zum anderen ist die Detektionseffizienz der beiden Fluoreszenzkanäle unterschiedlich. Daher wird der Grenzwert in beiden Detektionskanälen unabhängig bestimmt. Ob nun jedoch 1 % oder 5 % gewählt wird, hängt vom Benutzer und von der

Anzahl der Signale ab. Es entscheidet letztendlich bis zu welchem Signalniveau der Hintergrund verlaufen soll.

Es ist zu erkennen, daß keinesfalls jede Polymerase (Tab. 12, Spalte Paare rel. zu Donor) ein Rad26 bindet. Umgekehrt binden aber auch Rad26 Moleküle (Tab. 12, Spalte rel. zu Akzeptor) dort, wo sich keine Polymerase befindet. Dies läßt sich durch zum einen nicht vollständig passivierte Oberflächen erklären. Zum anderen könnte das Rad26 spezifisch an die DNS der Transkriptionsblase binden, die für sich gesehen nicht sichtbar ist, da sie keinen Farbstoff trägt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Aufreinigung des assemblierten Elongationskomplexes die Transkriptionsblase möglicherweise nur unvollständig abgetrennt wurde bevor der Komplex auf die Oberfläche gebunden wurde. Auf der anderen Seite kann die Anbindung nicht sehr spezifisch sein, denn es existieren immer noch freie RNS-Polymerasen ohne gebundenes Rad26. Die relativen Anteile hängen aber in erster Linie sehr stark von der eingestellten Detektionsgrenze ab. Jedoch greift dieses Kriterium schlecht, wenn Moleküle beobachtet werden sollen, die ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis besitzen, da sie sich kaum vom Hintergrund unterscheiden. Die gezeigten Zahlen sind daher mehr als Richtwert zu verstehen, denn als absolute Größe. Dennoch ist den Werten der mittleren Detektionsgrenze bei 2 % mehr Glauben zu schenken, denn rein visuell bestätigten sich dort die Verhältnisse der gemessenen Donor- und Akzeptormoleküle am besten. Wesentlich realistischer scheint die dort bereits höhere Zahl an Akzeptormolekülen (12.030) im Vergleich zum Donor (9.120).

Dies ist jedoch kein endgültiger Nachweis für eine Bindung zwischen Rad26 und RNS-Polymerase II. Um ausschließen zu können, daß ausschließlich vollständig unspezifische Wechselwirkungen für die beobachtete Co-Lokalisation verantwortlich waren, wurde eine Simulation durchgeführt, um die unspezifische Bindung abschätzen zu können. Hierbei wurden per Zufallsgenerator willkürlich Punkte auf einer Matrix verteilt, die von ihren Dimensionen her einem Bildausschnitt eines Videos entspricht. Diese Punkte wurden so gestaltet, daß sie in ihrer Größe, ihrer Verteilung auf der Matrix und ihrem gaußförmigen Intensitätsverlauf realen Signalen einer Messung entsprachen. Die Matrix war wie bei der Apparatur auch zweigeteilt, um die beiden Fluoreszenz-Kanäle zu simulieren. Nur wenn die virtuellen Signale an einer korrespondierenden Position erschienen, wurden sie als Paar gezählt. Für die Simulation wurde ein sehr konservativer Fehler angenommen, der für die Überlappung der beiden Fluoreszenz-Kanäle 1 Pixel Abweichung in x- und gleichzeitig in y-Richtung zuließ. Zum Vergleich erreicht die Analysemethoden realer Daten eine bessere Überlappung bis unter 1 Pixel genau in jeweils x- oder y-Richtung.

Um die unterschiedlichen Detektionsgrenzen zu simulieren, wurde die Oberflächenbedeckung eingeführt. Mit diesem Parameter wurde festgelegt, wie viele Molekülzentren auf der Matrix erscheinen sollten. Die Werte wurden so variiert, daß sich in etwa identische

Zahlenverhältnisse für Donor und Akzeptormoleküle ergaben. Beispielsweise führte eine Oberflächenbedeckung mit 0.2 % zu etwa 220 äquivalenten Molekülen auf dem Donorkanal, was selten unter realen Bedingungen erreicht wurde, schon allein aus dem Grund, daß die Fluoreszenzintensitäten nicht einwandfrei extrahiert werden können. Unter praktischen Gesichtspunkten wurden nie mehr als 100 - 120 Moleküle pro Bildausschnitt immobilisiert, was mehr einer Oberflächenbedeckung zwischen 0.1 % und 0.2 % entspricht. Um einen möglichen Fehler des Zufallgenerators abschätzen zu können, wurde jede Simulation hundertmal wiederholt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

Eine Übersicht der simulierten Paare gibt die Tab. 13.

Anzahl an zufällig co-lokalisierten Paaren (Simulation)					
Oberflächen-Bedeckung	Paare	Donor	Akzeptor	Paare rel. zu Donor	Paare rel. zu Akzeptor
0.32 %	378	23371	23468	1.6 % ± 0.9 %	1.6 % ± 0.9 %
0.2 / 0.3 %	222	14425	21158	1.5 % ± 0.9 %	1.0 % ± 0.4 %
0.1 %	42	7303	7376	0.6 % ± 0.4 %	0.6 % ± 0.4 %

Tab. 13: Übersicht der theoretischen Simulation zufällig co-lokalisierter Paarbildung.

Je nach Oberflächenbedeckung (Definition siehe Text) ergibt sich eine unterschiedliche Zahl an zufälligen Paaren. Sie fällt immer um ein Vielfaches (1.6 % vs. 6 %, Tab. 12) geringer aus als die Meßergebnisse.

Es stellt sich heraus, daß bei einer sehr dicht besiedelten Oberfläche mit 0.32 % Besetzung eine zufällige Überlappung von durchschnittlich 1.6 % bis maximal 2.5 % erreicht wird. Wird die Simulation an die tatsächlich auftretenden Molekülzahlen angepaßt (0.2 % Donor, 0.3 % Akzeptor), fällt die Zahl der Paare (222 vs. 947, Tab. 12) gegenüber der Messung mit der äquivalenten Detektionsgrenze (2 %) stark ab. In der realen Messung werden also vier bis fünf Mal mehr Paare gesichtet als rein zufällig auftreten sollten.

Es zeigt sich also, daß das Rad26 tatsächlich an die Polymerase bzw. den Elongationskomplex bindet und die Methode der Co-Lokalisation auf Einzelmolekülebene für den Nachweis gut geeignet ist.

7.7.3. Bestimmung des Bindens über FRET

Obendrein kann bei geeigneter Wahl der Farbstoffe sogar ein FRET-Prozess stattfinden, der zusätzliche Bestätigung einer unmittelbaren Nachbarschaft aufzeigt. Ein weiterer Beweis, daß tatsächlich eine Bindung stattgefunden hat, ist einen FRET-Prozeß zu beobachten. Der Energietransfer zwischen dem Donor an der RNS und dem Akzeptor am Rad26 ist in folgender Intensitäts-Zeit-Spur zu sehen (Abb. 50). Man sieht einen relativ konstanten Verlauf der FRET-Effizienz, sieht man von Schwankungen am Anfang der Zeitspur ab.

Im Mittel erzielt dieses Molekül eine Effizienz um 35 - 40 %, bis nach knapp 1.5 Sekunden der Akzeptor bleicht.

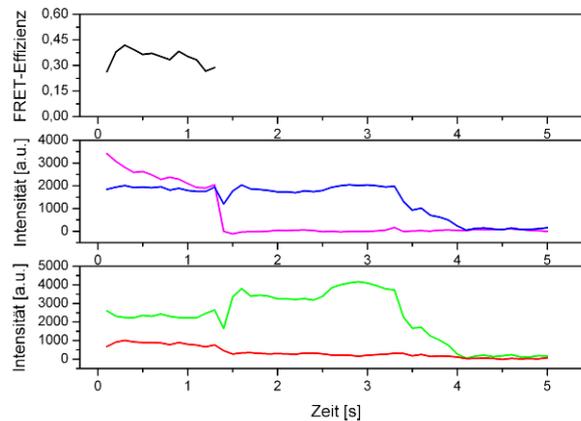


Abb. 50: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Zeit (unten und Mitte) sowie der FRET-Effizienz (oben).

Leichte Schwankungen in den Intensitäten des Akzeptors (rot) führen zu einer mittleren Variation der daraus errechneten FRET-Effizienz (schwarz). Die Gesamtintensität (blau) bleibt bis auf den Einbruch der Intensität des Donors (grün) nach etwa 1.4 Sekunden davon unbeeinflusst. Direkte Anregung des Akzeptors (magenta) zeigt keine photophysikalischen Schwankungen in der Akzeptor-Fluoreszenz. FRET-Effizienzen werden nur bis zum Bleichen des Akzeptors nach 1.3 Sekunden berechnet. Der Donor bleicht nach 4 Sekunden.

Diese Messung wurde mit alternierender Anregung durchgeführt, um einerseits Schwankungen in der Akzeptor-Fluoreszenz auszuschließen, aber insbesondere, um das mit Akzeptor markierte Rad26 überhaupt detektieren zu können. Ohne die direkte Anregung wäre die Fluoreszenz durch den Energietransfer zu klein, um das Rad26 sicher identifizieren zu können. Dies gilt um so mehr bei Molekülen mit noch geringerem Anteil an FRET. Die totale Intensität als weiterer Stabilitätsindikator bleibt ebenfalls den gesamten Zeitraum über konstant bis auf einen kurzen Bereich am Ende der Zeitspur.

Eine quantitative Auswertung führt zu einem etwas ernüchternden Ergebnis. Aus 2.605 Paaren, die co-lokalisierten, fanden sich lediglich 12 Paare, die auch ein sichtbares FRET-Signal zeigten. Zusammengefaßt werden die sich ergebenden Effizienzen in einem Histogramm in Abb. 51. Das Histogramm kann am besten mit Hilfe zweier Gaußverteilungen beschrieben werden, wobei sich zwei Effizienzen ergeben bei 14 % sowie 35 %. Bei einer Betrachtung der FRET-Effizienzen Molekül für Molekül zeigt sich, daß tatsächlich zwei Populationen existieren. Jedoch wird die höherliegende Population in der Betrachtung Bild für Bild überrepräsentiert, da die Moleküle länger leben als die der zweiten Population. Trotzdem ist es erstaunlich, daß, obwohl ein Partner völlig unspezifisch an einer beliebigen Position markiert wurde, überhaupt ein definierter FRET-Prozeß nachgewiesen werden konnte. Trotz der extrem geringen Anzahl dieser Paare, die Energietransfer zeigen, muß dies auf eine dominierende Bindungsstelle des Farbstoffs am Rad26 zurückzuführen sein.

Abschließend beweisen diese Ergebnisse abermals die Bindung des Rad26 an die RNS-Polymerase II und weisen einen wichtigen Weg für die Zukunft. Denn eine spezifische Markierung am Rad26 würde möglicherweise eine weitaus größere Zahl an co-lokalisierten und zum FRET-Prozeß geeignete Paare generieren.

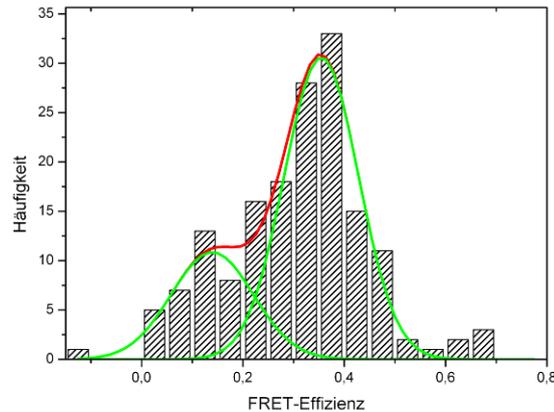


Abb. 51: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen von co-lokalisiertem Rad26 an RNS Polymerase II.

Das Histogramm von 12 Molekülen kann mit Hilfe zweier Gauß-Verteilungen (grün) unterschiedlicher Amplitude beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 14 % bzw. 35 %. Trotz unspezifischer Markierung des Rad26 kann ein FRET-Prozeß beobachtet werden, für den eine Co-Lokalisation Voraussetzung ist. Die zwei Verteilungen deuten auf dominierende Bindungsstellen am Rad26 hin, die in kompatibler Distanz zur fluoreszenzmarkierten RNS stehen.

7.8. Mögliches Auflösen des Elongationskomplexes

Ein möglicher Mechanismus, die Polymerase von einem Schaden im zu transkribierenden Strang wegzubewegen, wäre nach *Svejstrup*, den Komplex aufzulösen mit dem Effekt, daß einzig und allein die DNS übrigbliebe[114].

Somit müßten bei Verwendung des Modellsystems, Spaltprodukte des Komplexes sichtbar werden, da bei der kompletten Entfernung die DNS, RNS sowie die Polymerase nebeneinander vorlägen. Auch wenn Polymerase und DNS wieder zusammenfinden würden und erneut einen Komplex eingingen, wäre die RNS daran nicht beteiligt. Das RNS-DNS-Hybrid ist nämlich bei Raumtemperatur bereits instabil und wird nur durch das Einfangen in die Polymerase stabilisiert, nachdem es vorab in einem speziellen Aufheiz- und Abkühlverfahren (siehe Methoden Kapitel A.1) hergestellt wird.

Methoden, die für die Untersuchung dieser Hypothese einsetzbar wären, sind zum einen die Gel-Retardation, bei der die einzelnen Bestandteile des gespaltenen Elongationskomplexes durch Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden können. Das Prinzip hinter dieser Methode ist, die Migration einer DNS oder RNS in Abhängigkeit der Proteinbindung zu beobachten. Bindet kein Protein bzw. zerfällt der Komplex verhält sich die Nukleinsäure

wie die Referenz. Je mehr Protein oder Bindungspartner nun anbinden, um so schwerer wird die DNS und wandert in einem Gel weniger weit als die Referenz. Denkbar ist auch, die Fluoreszenz-Anisotropie einzusetzen, um die freie Drehbarkeit der Komponenten wie RNS bzw. DNS zu beobachten. Würde die RNS oder DNS aus dem Komplex herausgezogen, müßte sich ihre Rotationsdiffusionsgeschwindigkeit drastisch ändern. Damit würden auch die Anisotropie-Werte von gebundenen Farbstoffen stark fallen, da sie ihre freie Drehbarkeit wiedergewinnen würden.

Für eine detaillierte Untersuchung, ob das Rad26 alleine im Stande ist die Polymerase aus dem Elongationskomplex herauszulösen, wurden mehrere Methoden eingesetzt. Aufgrund der selektiven Markierung aller Komponenten mit fluoreszenten Farbstoffen, konnte die Gelelektrophorese genauso durchgeführt werden wie Versuche mit Hilfe der Fluoreszenz-Anisotropie.

7.8.1. Nachweise der Auftrennung über Gelelektrophorese und Retardation

Um den möglichen Zerfall des Elongationskomplexes verfolgen zu können, wurden für das Assemblieren sowohl DNS als auch RNS mit gebundenem Farbstoff eingesetzt. Nach der Elektrophorese erscheint DNS dann als roter, RNS als grüner Fleck. Treten sie zusammen auf, ergibt sich Gelb als Kombination beider Farben.

Ein derartiges Gel ist in Abb. 52 gezeigt. Vergleicht man die Referenz auf der ersten Spur links mit allen anderen Spuren (Abb. 52, links), so fällt hauptsächlich das Fehlen einer gelben Bande am oberen Ende des Gels auf. Im Gegensatz zu allen anderen Spuren wurde hier nur das RNS-DNS Hybrid alleine aufgetragen. Man kann also nur die Bestandteile, nicht aber das gesamte Hybrid erkennen, da es wie oben erwähnt bei Raumtemperatur über keine ausreichende Stabilität verfügt.

Der nächste Punkt, der auffällt, ist, daß dafür in allen anderen Spuren das Hybrid nachweisbar ist. Selbst in den Proben, in denen Rad26 eine Stunde aktiv war (Spuren 4, 6, 8, 10) ist kein Unterschied auszumachen. Bei nur zehn Minuten möglicher Aktivität ist dementsprechend ebenfalls keine Auswirkung erkennbar (Spuren 3, 5, 7, 9). Ein Hinweis für die Ablösung der RNS-Polymerase kann in keiner Spur entdeckt werden, da weder die Konzentrationen an freier DNS oder RNS zunehmen noch sich die Konzentration des Komplexes verringert. Selbst eine Erhöhung der freien RNS alleine kann nicht gesehen werden. Mögliche RNase-Aktivität wurde durch die Zugabe eines Inhibitors (Superase) minimiert (Spuren 7 - 10). Es zeigte sich aber kein meßbarer Unterschied.

Dagegen zeigt sich eine Retardation der freien DNS nach der Zugabe von Rad26. Besser zu erkennen ist dieser Vorgang in Abb. 52, rechts. Hier wird auf das grüne Farbspektrum

verzichtet und zur besseren Sichtbarkeit nur die DNS angezeigt. Man sieht in allen Spuren außer 1 und 2 eine Ansammlung von DNS direkt unterhalb der Migrationsfront des Komplexes, davon besonders gut in den Spuren 3 und 5.

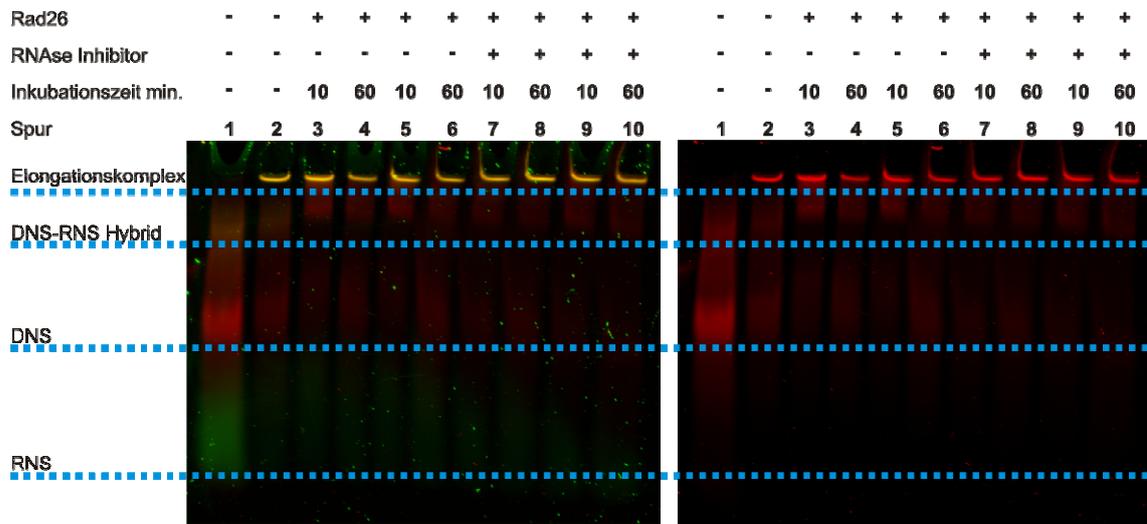


Abb. 52: Auftrennung des Elongationskomplexes über PAGE (falschfarben).

Bei der Gel-Retardation wird die Migrationsfront (blau gestrichelte Linie) von Nucleinsäuren eingeschränkt, wenn Proteine an sie gebunden sind. Spur 1: Transkriptionsblase, Spur 2: Elongationskomplex (EK) ohne Rad26, Spur 3 - 10: EK mit Rad26 und ATP, Spur 7 - 10: EK + Rad26 + ATP mit RNase-Inhibitor.

Links: Fluoreszenz 570 nm (grün) + 670 nm (rot). Die RNS erscheint als grüne Front, die DNS rot. Im Komplex ergibt sich eine orange Bande. Nur bei der Transkriptionsblase (Spur 1) erfolgt eine effiziente Auftrennung in einzelne Komponenten. Wenig Heterotriplex aus DNS + RNS (orange) ist auch zu sehen. Ab Spur 2 wird DNS und RNS im EK stabil gebunden. Rad26 führt nicht zum Auflösen des Elongationskomplexes, unabhängig von der Inkubationszeit (Spur 3 - 10). Rad26 bindet freie DNS und führt zu Retardation (Spur 3 - 10, direkt unterhalb oranger Bande). RNase-Aktivität ist nicht zu beobachten (vgl. Spuren 3 - 6 vs. 7 - 10).

Rechts: Fluoreszenz nur 670 nm (rot). Die RNS erscheint nicht, weil sie nicht angeregt wird, die DNS fluoresziert rot. Rad26 bindet freie DNS und führt zur Retardation (Spur 3 - 10, Rad26 + DNS).

Dies ist ein direkter Nachweis für die Bindung des Rad26 an DNS, wenngleich die Bindung nicht über eine hohe Affinität zu verfügen scheint. Unterhalb läuft trotzdem noch freie DNS auf Höhe der Referenz. Wäre Supercoiling aufgetreten, wäre die RNS-Polymerase höchstwahrscheinlich von der Transkriptionsblase abgelöst worden, bedenkt man, daß CSB damit die Ablösung von Nucleosomen erreicht[38].

Zum Resultat muß noch hinzugefügt werden, daß für diese Versuche RNS-DNS-Hybride verwendet wurden, die über einen längeren Überhang, also 15 Basen mehr außerhalb der Polymerase, verfügen. Damit sollte eine mögliche Anbindung für das Rad26 erleichtert werden. Die RNS (17 Basen) wurde nicht extra verlängert, da selbst in vivo bei einer längeren RNS das Hybrid noch immer aus einer komplementären Basenabfolge von 8 Nucleotiden besteht, die nicht ohne weiteres übersprungen oder herausgelöst werden können. Um allein die RNS nur eine Base herauszuziehen, muß die Hybrisierungsenergie von 8

Basen überwunden werden, vorausgesetzt, die Hybridisierung mit der nächstgelegenen Base ergibt keinen Energiegewinn. Es würden also $8 \times \text{ca. } 3.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, etwa 28 kJ mol^{-1} benötigt[221]. Die Hydrolyse eines Moleküls ATP zu ADP liefert in Anwesenheit von zweiwertigen Magnesiumionen zwar etwa $54 - 60 \text{ kJ mol}^{-1}$ [222]. Wahrscheinlich steht dem aber ein noch wesentlich größerer energetischer Beitrag entgegen, da dieses Herausziehen sterisch gesehen extrem ungünstig ist.

7.8.2. Nachweise der Auftrennung über Anisotropie

Es wurden auch Anisotropie-Experimente durchgeführt, die das Auflösen des Elongationskomplexes beleuchten sollten. Dazu wurden zwei getrennte Messungen mit entweder Farbstoff-gekoppelter RNS oder DNS durchgeführt. Als Referenz diente jeweils das RNS-DNS-Hybrid, was erwartungsweise niedrigere Anisotropie-Werte für die RNS als für die DNS lieferte, da die Transkriptionsblase erst durch die Polymerase stabil gebunden wird[2]. Zur besseren Übersicht sind die Anisotropie-Werte in Tab. 14 aufgeführt.

Anisotropien				
	- Polymerase	+ Polymerase	+ Polymerase + Rad26 + ATP	- Rad26 - RNase-Inhibitor
Transkriptionsblase mit markierter RNS	$0,125 \pm 0,005$	$0,224 \pm 0,009$	$0,233 \pm 0,009$	$0,223 \pm 0,008$
Transkriptionsblase mit markierter DNS	$0,182 \pm 0,009$	$0,302 \pm 0,011$	$0,288 \pm 0,011$	

Tab. 14: Übersicht der Anisotropien von fluoreszenzmarkierter RNS und DNS im Elongationskomplex.

Freie Transkriptionsblase zeigt eine niedrige Anisotropie. RNS liegt bei Raumtemperatur nicht hybridisiert vor, der Farbstoff an der DNS ist frei beweglich. Nach dem Einbau in den Elongationskomplex steigen die Anisotropien beider Farbstoffe dramatisch an. Die Zugabe von Rad26 (Inkubation 1h) führt aber zu keiner Veränderung. RNase-Inhibitor wurde für die Messungen an RNS zugesetzt, zeigt aber keinen Einfluß auf die Anisotropie.

Wird nun Rad26 zugegeben, ändern sich die Anisotropie-Werte für die DNS und RNS nur wenig angesichts der angegebenen Fehlerbalken. Das spricht wie die Ergebnisse der Gelelektrophorese dafür, daß die DNS weiterhin im Komplex gebunden bleibt. Folglich löst sich die RNS-Polymerase II nicht ab bzw. das erneute Assemblieren läuft zeitgleich und ebenso schnell ab, was aber sehr unwahrscheinlich ist. Die leichte Veränderung der Werte nach der Zugabe von Rad26 befindet sich im Rahmen der Meßgenauigkeit. Sie ist aber wohl darauf zurückzuführen, daß tatsächlich eine Bindung des Rad26 stattfindet. Diese bewirkt jedoch nicht den Effekt der Ablösung, sondern möglicherweise eine Konformationsänderung. Der Anisotropie-Wert ist nach einstündiger Inkubation sehr hoch angesiedelt, was mehr durch eine Änderung der Rotationsmöglichkeiten innerhalb der Polymerase hervorgerufen wird, beispielsweise aufgrund einer Verschiebung der Polymerase um ein oder

mehrere Basen. Ein viel stärkerer Rückgang wäre zu erwarten gewesen, wenn die DNS komplett frei vorgelegen hätte.

Bei der RNS zeigt sich das gleiche Bild. Sie scheint auch dort nach einstündiger Inkubation mit Rad26 immer noch gebunden zu bleiben. Das würde ebenfalls bekräftigen, daß der Komplex nicht nach und nach zerstört wird. Der hier auftretende leichte Zuwachs der Anisotropie könnte durch denselben Effekt verursacht worden sein, der den Wert für DNS absenkte, z.B. eine leichte Veränderung der freien Rotation des Farbstoffs durch den Wegfall einzelner Freiheitsgrade.

Für alle Messungen mit fluoreszenzmarkierter RNS wurde ein RNase-Inhibitor zugesetzt, um RNase-Aktivität, verursacht durch z.B. eine Verunreinigung, minimieren zu können. Eine RNase würde weniger die RNS im Komplex, dafür mehr die freie RNS in kleinere Bruchstücke bis hin zu einzelnen Basen teilen, die dann nahezu keine Anisotropie mehr besäßen. Leider ist seine Funktionsweise nicht bekannt, es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß er selbst mit RNS interagiert. Dazu wurde als Kontrolle der Elongationskomplex ohne Rad26, aber mit Inhibitor, gemessen. Es ergaben sich jedoch keinerlei meßbare Veränderungen.

Es darf nicht ausgeschlossen werden, daß der Inhibitor möglicherweise für eine Inaktivierung des Rad26 verantwortlich war. Aktivitätsmessungen an Rad26 in Anwesenheit dieses Inhibitors zeigten jedoch überhaupt keine Beeinträchtigung. Zu diesem positiven Ergebnis muß aber erwähnt werden, daß für den Einsatz des Inhibitors eine vorausgehende Aufreinigung erforderlich war. Bedauerlicherweise ist der Inhibitor nur in phosphathaltigem Puffer erhältlich, welcher Aktivitätsmessungen völlig verfälschen würde. Obendrein sind aufgrund patentrechtlichen Schutzes keine Informationen zu den Eigenschaften vorhanden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß diese Aktivitätstests falsch-positive Resultate lieferten, da in Wirklichkeit die Aufreinigung den Inhibitor beschädigten oder sogar entfernten. Weiterführende Arbeiten, die sich mit der Aktivität des RNase-Inhibitors befaßt hätten, hätten den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Man darf aber nicht vergessen, daß weder die Messungen mit Gel-Elektrophorese noch spätere Messungen auf Einzelmolekülebene je einen Hinweis auf Verdau der RNS durch RNasen lieferten (vgl. Kapitel 7.10). Auf der anderen Seite konnten aber auch nie Veränderungen, wie zum Beispiel unterschiedliche Migrationsfronten oder das Auftreten zusätzlicher Banden, durch die Zugabe des Inhibitors beobachtet werden.

Abschließend zeigen diese Messungen zum einen, daß der Elongationskomplex nicht von Rad26 oder zumindest nicht von ihm alleine aufgelöst werden kann. Des Weiteren lieferten die Anisotropie-Bestimmungen Hinweise auf eine Interaktion zwischen Rad26 und dem Elongationskomplex. Für eine detaillierte Betrachtung bedurfte es aber sensitiverer Methoden, insbesondere der Einzelmolekül-Spektroskopie.

7.9. Mögliche Abspaltung von Rpb4/Rpb7

Untersuchungen zum TCR-Mechanismus, durchgeführt durch *Smerdon und Li*[69, 223, 224], fanden heraus, daß der bis dato bekannte Weg der Aktivierung des Reparaturwegs durch Rad26 ergänzt wird durch einen zweiten alternativen Pfad, der durch Rpb9, einer Untereinheit der RNS-Polymerase II, gesteuert wird. Weiterhin stellten sie fest, daß ein Schalter existieren müsse, der zwischen beiden Wegen hin- und herschaltete. Auf molekularer Ebene ordneten sie diese Funktion dem Rpb4 zu, einer weiteren nicht essentiellen Untereinheit. Um jedoch dem Rad26 einen Vorteil gegenüber Rpb9 zu ermöglichen, müßte laut dieser Hypothese, das Rad26 am oder in der Nähe des Rpb4 binden. Weder von *Smerdon* noch von *Li* wurden weitergehende Experimente in diese Richtung verfolgt, aber prinzipiell ist die RNS-Polymerase für die Elongation nicht auf die Rpb4 Untereinheit angewiesen[225], sofern keine extremen Temperaturen auftreten[226, 227].

Das Ziel dieses Experiments war also festzustellen, ob Rad26 nicht nur stabil an die Untereinheit Rpb4/Rpb7 bindet, sondern ob es sich zusammen mit ihm von der Polymerase ablöst bzw. es nur gezielt verdrängt. In den beiden zuletzt genannten Fällen würde die Konzentration an freiem Rpb4 rapide steigen. Um dies zu überprüfen, mußte die Konzentration an farbstoff-markiertem Rpb4 bei Zugabe von Rad26 verfolgt werden. Dazu wurde eine speziell entwickelte Mutante des Dimers Rpb4/Rpb7 eingesetzt, die bereits für die Kartierung der im Kristall nicht auflösbaren Bereiche der RNS Verwendung fand[2].

Als Methode zum Nachweis der zusätzlich abgelösten Untereinheit wurde das gleiche Prinzip angewendet, wie es zur Aufreinigung des assemblierten Komplexes von überschüssigen Einzelkomponenten bereits verwendet worden war. Zu diesem Zweck wurde der Elongationskomplex auf einen zentrifugierbaren Membranfilter geladen, dessen Abtrennungsgrenze bei 100 kDa liegt. Das heißt, sämtliche Bestandteile wie überschüssiges RNS-DNS-Hybrid oder Rpb4/Rpb7 wurden abgetrennt. Nach der Zugabe von Rad26 wurde diese Aufreinigung einfach wiederholt mit dem Ziel, abgelöstes Rpb4/Rpb7 abzutrennen. Löst Rad26 tatsächlich die Untereinheit ab, sammelt sich im Überstand die Polymerase ohne gebundenes Rpb4/Rpb7 und es verringern sich dort die Fluoreszenz-Zählraten, während sie sich im Durchlauf vergrößern. Wichtig ist dabei, auf Volumenkonstanz zu achten.

Von diesen filtrierten Lösungen wurden anschließend Fluoreszenz-Emissionsspektren aufgezeichnet, worauf zur Messung der gesamten Fluoreszenz-Intensität die Spektren integriert wurden, ähnlich der Bestimmung der Quanteneffizienz eines Farbstoffs. Es hätte zwar gereicht, auf die maximale Zählrate zu achten, da der Verlauf des Spektrums unverändert bleiben wird und sich so das Integral des Spektrums wie die Zählrate verhält. Integralbildung verringert jedoch etwaiges auftretendes Rauschen aufgrund niedriger Integrationszeiten.

Im Folgenden (Tab. 15) sind die Integrale und die relativen Verhältnisse aufgelistet, die dies verdeutlichen.

Fluoreszenzintensitäten (integriert) [a.u.]			
	- Rad26	+ Rad26	+ Rad26 + ATP
Durchlauf	4.1×10^5 7.7 % rel.	4.4×10^5 8.3 % rel.	4.8×10^5 9 % rel.
Überstand	5.3×10^6 100 % rel.	6.6×10^6 125 % rel.	6.6×10^6 125 % rel.

Tab. 15: Übersicht der Fluoreszenz-Intensitäten des filtrierten Elongationskomplexes.

Der Durchlauf und der Überstand sind sehr konstant. Die Zugabe von Rad26 führt nicht zu einer erhöhten Ablösung von Rpb4, sondern vielmehr zu einer Stabilisierung.

Man sieht sofort, daß die Zählraten im Durchlauf extrem konstant sind, also keine erhöhte Ablösung der Rpb4 Untereinheit stattfindet, weder nach der Addition von Rad26 noch nach der weiteren Zugabe von ATP. Die Kontrollmessung zeigt sogar weniger Fluoreszenz im Vergleich zu den Proben mit Rad26, was eher auf eine Stabilisierung des Rpb4 hindeutet. Daß der Überstand in zwei von drei Fällen abweicht, könnte an der verwendeten Technik und den Materialien liegen. Die Membrane, die zum Rückhalt der Polymerase eingesetzt werden, unterliegen Fehlertoleranzen bzw. können bis zu 5 % an Protein unspezifisch binden. Eine zusätzliche Referenzmessung des unfiltrierten Elongationskomplexes schloß aber den Verdacht aus, daß Rpb4 durch unspezifische Bindung an der Membran verloren gegangen war und so weder im Durchlauf noch im Überstand zu finden gewesen wäre.

Natürlich weist dieses Systems bzw. diese Methode eine gewisse Fehleranfälligkeit auf, wie z. B. ungenaue Plazierung der Küvette im Spektrometer oder die bereits genannten unterschiedlichen Membraneigenschaften. Trotzdem kann kein erhöhtes Ablösen der Rpb4 Untereinheit festgestellt werden. Wenn das Rad26 tatsächlich Rpb4 als Bindungsstelle verwendet, dann bleibt es dort mit Sicherheit gebunden.

7.10. Einzelmolekül-Messungen

Sieht man sich den Prozeß an, der für die Verschiebung einer steckgebliebenen RNS-Polymerase verantwortlich ist, erwartet man Änderungen in einer Größenordnung, die ideal mit der FRET-Technik erschlossen werden können. Darüber hinaus bot sich in Form der Elongationskomplexe ein perfektes Modellsystem an, das sowohl bekannte Struktur aufwies, aber dennoch die Möglichkeit einräumte, dynamische Untersuchungen durchzuführen.

Eine Verschiebung der Polymerase um eine Base, wie sie bereits experimentell gesehen wurde[74], würde auf der Ångstrom-Skala ablaufen. Da keinerlei Daten bekannt sind, wie effizient das Rad26 mit dem Elongationskomplex interagiert, kamen Ensemble-Experimente wegen ihrer intrinsischen Mittelung von vornherein nicht in Frage. Es war daher von Anfang an geplant, Einzelmolekül-Experimente durchzuführen, da nur sie eine derartig kleine Änderung aus einer Masse von unveränderten Molekülen heraus verlässlich wiedergeben können. Obendrein zeigten die durchgeführten Experimente im Rahmen dieser Arbeit keinerlei Hinweise darauf, daß ein anderer Reparaturmechanismus, wie die Ablösung der Polymerase, in Betracht kommt (siehe Kapitel 7.8).

Die nachfolgenden Unterkapitel sind nun strukturell so aufgebaut, daß sie jeweils das verwendete Modellsystem bzw. den eingesetzten Elongationskomplex kurz vorstellen, um daran die verfolgte Änderung zu besprechen. Dazu wird jeweils die Kristallstruktur präsentiert mitsamt dem theoretisch errechneten, mittleren Abstand der Aufenthaltsbereiche. Die Aufenthaltsbereiche selbst werden der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt. Die Nomenklatur der Konstrukte orientiert sich derweil an die jeweilige Position der markierten Base an der DNS bzw. RNS.

Die abgebildeten Histogramme beinhalten, sofern nicht anders erwähnt, jeweils FRET-Effizienzen für jeden einzelnen Zeitpunkt. Die Daten wurden außerdem mit einem gleitenden Durchschnitt über 5 Datenpunkte gefiltert.

7.10.1. Kompatible Distanzen der Ankerpunkte

Der Knackpunkt des verwendeten Modellsystems und vor allem der schematischen Darstellungen liegt im Folgenden. Die große Auswahl an Ankerpunkten muß eher kritisch gesehen werden, denn nicht jede technisch mögliche Kombination muß zu einem sinnvollen Abstand im Elongationskomplex führen. Hauptsächlich liegt dies am Verlauf der einzelnen Stränge der DNS und RNS im Elongationskomplex. Daher mußten Kriterien aufgestellt werden, wonach zwei zueinander kompatible Ankerpunkte ausgewählt wurden.

- **kompatible Abstände der Basen zu den Förster-Radien der Farbstoff-Paare**

Der Abstand der ausgewählten Basen, die als potentielle Ankerpunkte für Donor-Akzeptor-Paare dienen sollten, mußte mit der Längenskala der FRET-Technik kompatibel sein. Trotz einer Vielzahl an organischen Fluoreszenzfarbstoffen, die wegen ihrer biologischen Anwendbarkeit als Reporter hätten eingesetzt werden können, verlaufen ihre Förster-Radien meist in einem Rahmen von 25 bis 75 Ångstrom[141]. Auch wenn in den letzten Jahren zahlreiche neue Vertreter dazukamen[219, 228, 229], orientierten sich deren Parameter, wie spektraler Verlauf, stark an bereits bekannten Vorgängern[199, 202, 230]. Die Selektion gegenüberliegender, komplementärer Basen war folglich ausgeschlossen, da sich ihre Distanzen innerhalb der Transkriptionsblase im einstelligen Ångstrom-Bereich bewegen.

- **auf lösbare, relative Veränderungen der Ankerpunkte zueinander bei einer potentiellen Verschiebung**

Es mußten nicht nur Basen ausgewählt werden, deren absolute Abstände mit FRET kompatibel sind. Letztere mußten sich bei einer Verschiebung der Polymerase und damit der Positionen im Register auch weit genug vergrößern oder verkleinern. Beispielsweise verändert sich der Abstand zweier zufällig ausgewählter Basen bei einer virtuellen Verschiebung um vier Registerplätze oftmals nur um wenige 5 - 10 Ångstrom, obwohl für sich gesehen der Abstand zwischen beiden Ankerpunkten mit der durch FRET bestimmbaren Skala konform ist. Hinzu kommt, daß eine Verschiebung von vier Nukleotiden angenommen wird, was aber seinerseits eine Hypothese darstellt.

- **unterscheidbare Veränderungen der Abstände je nach Bewegungsrichtung**

Für die Deutung der Verschiebungsrichtung mußte allein eine Variation der Ankerpunkte an DNS und RNS genügen. Die einfachere Methode, die direkte Markierung der Polymerase mit Fluoreszenzfarbstoffen, um relative Bewegungen gegenüber der DNS aufzulösen, ähnlich der Arbeiten von *Kapanidis et al.*[185], war nur über die Untereinheit Rpb4/Rpb7 möglich. Diese Position weist aber einen gravierenden Nachteil auf. In der Arbeit von *Andrecka et al.* wurden mit Hilfe von spezifisch markierbaren Mutanten von Rpb7 Kontrollmessungen zum Nachweis der Eignung der Methode durchgeführt[2]. Dabei zeigte sich, daß der Abstand zwischen zwei Farbstoffen an verschiedenen Basen der DNS, die 12 Nukleotide voneinander entfernt waren, und einer markierten Aminosäure in Rpb7 in beiden Fällen etwa 65 Ångstrom betrug.

Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stellten fest, daß über einen extrem weiten Bereich, der praktisch alle in der Kristallstruktur bekannten Positionen der DNS bzw. RNS betrifft, kaum eine Distanzänderung der zu erwarteten Farbstoffpositionen von mehr als 5 - 6 Ångstrom durchlaufen wird. Hauptsächlich liegt dies an der relativen Position des Rpb4/Rpb7, das sehr symmetrisch zu DNS und auch RNS-Strang steht. Es bilden sich beinahe in jedem Fall zwei gleich lange Abstände zum Rpb7. Selbst wenn größere Unterschiede festzustellen sind, sind die Register sehr weit voneinander entfernt.

Das heißt, das Rad26 muß die RNS-Polymerase II in vielen Fällen um weit mehr als 5 Basen verschieben, damit ein Unterschied festzustellen ist. Zu diesem Punkt kommt noch die relativ schlechte Umsetzbarkeit der Untereinheit mit Fluoreszenzfarbstoffen. Selten sind Ausbeuten über 30 % zu erreichen, was sich entweder negativ auf die beobachtbare Anzahl der Moleküle auswirkt oder eine höchst aufwendige Aufreinigung des Proteins erfordert.

Werden die Farbstoffe wie bei *Tang et al.*[231] nur an der DNS befestigt, ist die Unterscheidung verschiedener Vorgänge keineswegs mehr trivial. Eine der Hauptaufgaben bestand also darin, zwei optimal geeignete Ankerpunkte zu selektieren, die Informationen bezüglich der Verschiebungsrichtung liefern. Optimal sind ein Zuwachs des Abstands bei einer möglichen Rückwärtsbewegung und gegenläufig dazu ein Abfallen bei einer Verschiebung in Transkriptionsrichtung.

▪ **Berücksichtigung des tatsächlichen Aufenthaltsbereichs der Farbstoffe**

Im einfachsten vorstellbaren Modell verfügt der Farbstoff weder über eine eigene Ausdehnung noch ist er über einen Abstandshalter, wie einer Brücke aus Methylen-Ketten, an einer Base verankert. Dabei wird noch die einfache Vorstellung bemüht, daß die Position des Farbstoffs mit der Base identisch wäre, an der er verankert ist.

Es ist offensichtlich, daß der Farbstoff nicht inmitten bestehender Strukturelemente der Polymerase zu liegen kommen kann. Andererseits hat der Farbstoff seinen eigenen Platzbedarf und kann sich daher nicht an beliebigen Positionen befinden. Nicht vergessen darf man, daß Farbstoffe an der DNS über Abstandshalter in Form von bis zu zwölfkettigen Methylenbrücken angebunden werden, die zwar für eine gewisse Flexibilität sorgen, aber auch ihrerseits Ausdehnungsgrenzen aufweisen. All diese Vorgaben können zu einem völlig unterschiedlichen Bild der zu erwarteten Abstände und ihrer Änderungen führen.

Um einen qualitativen Überblick zu erhalten, wo sich die beteiligten Farbstoffe tatsächlich aufhalten können, wurde eine wahrscheinlichkeitstheoretische Simulation eingesetzt[180]. Mit Hilfe von Daten aus der Röntgenstrukturanalyse ließ sich so eine dreidimensionale Wahrscheinlichkeitsverteilung für den Aufenthaltsbereich eines Farbstoffmoleküls an einem beliebigen, aber in der Kristallstruktur definierten, Punkt im Elongationskomplex bestimmen. Die folgende Abbildung (Abb. 53) greift die Positionen in DNS und RNS (+3/-10 und +7/-6) auf und visualisiert die errechnete Wahrscheinlichkeitsverteilung für an diesen Punkten befestigte Farbstoffe. Zur Berechnung wurden die folgenden Parameter eingesetzt. 20 Ångstrom als Länge des Abstandshalters zwischen Base und Farbstoff mit einem Eigendurchmesser von 4.5 Ångstrom, was angesichts der kovalenten Anbindung eines Farbstoffs mit eigenem Linker an ein 5-C6-Amino-2'-Deoxythymidin realistisch erscheint. Der Farbstoff selbst wurde als Sphäre simuliert mit einem Durchmesser von 7 - 12 Ångstrom (RNS mit Donor 7 Ångstrom, DNS +3 mit Akzeptor 8 Ångstrom, DNS +7 mit Akzeptor 12 Ångstrom). Dabei wurden keinerlei elektrostatische Wechselwirkungen

berücksichtigt. Die Methode diente lediglich zur Erkundung des möglichen Freiraums in der Kristallstruktur, der nicht durch Atome besetzt ist.

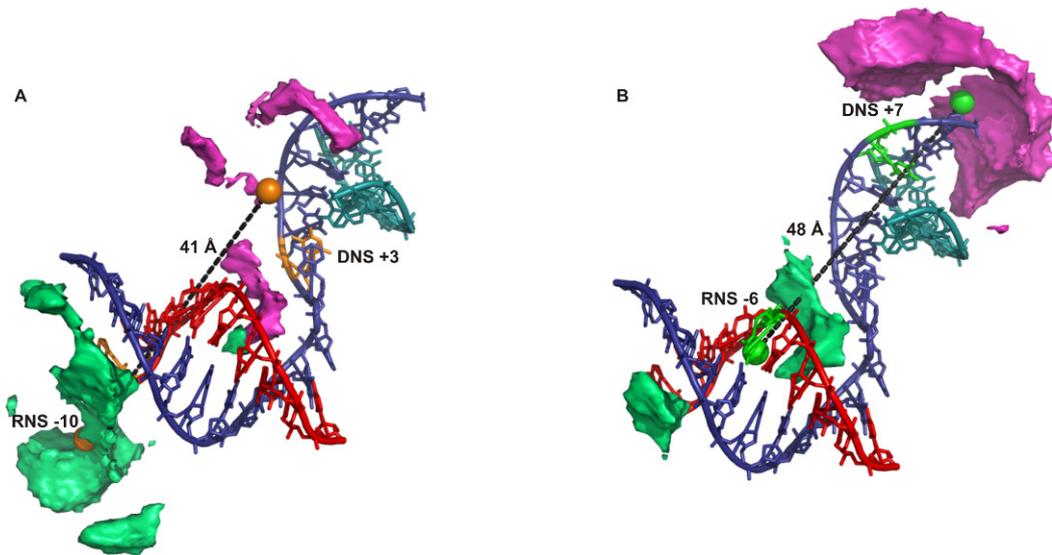


Abb. 53: Kristallstrukturen der Transkriptionsblase im Elongationskomplex mit Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für verankerte Fluoreszenzfarbstoffe an je zwei Positionen.

Die zu transkribierende DNS (dunkelblau) verläuft in der Polymerase einzelsträngig, die RNS (rot) ist komplementär dazu und verläuft parallel. Nur ein Teil der nicht-transkribierten DNS (cyan) kann in der Kristallstruktur aufgelöst werden. Die Wahrscheinlichkeitsdichten zweier Farbstoffe an RNS (smaragdgrün) und DNS (magenta) sind als Oberflächenmodelle dargestellt. Die mittlere Aufenthaltsposition wird durch eine Kugel beschrieben. Die Strukturelemente der RNS-Polymerase II wurden der Übersichtlichkeit halber entfernt. (A) Für Position RNS -10 (orange + smaragdgrün) ergibt sich ein großer zusammenhängender Bereich. Der Farbstoff an Position DNS +3 (orange + magenta) hat mindestens drei nichtverknüpfte Bereiche zur Verfügung. Der Abstand der mittleren Aufenthaltsbereiche (orange Kugeln) beträgt 41 Ångstrom, wobei nur der Farbstoff an der RNS adäquat beschrieben wird. (B) Die Position RNS -6 (grün + smaragdgrün) verfügt über zwei unterteilbare Aufenthaltsräume mit mittlerem Freiraum. Der Farbstoff an Position +7 (grün + magenta) weist den größten maximalen Spielraum auf. Der mittlere Abstand (grüne Kugeln) beträgt 48 Ångstrom, kann aber keine der beiden Wahrscheinlichkeitsdichten beschreiben. FRET-Effizienzen werden weniger von der Distanzänderung beeinflusst als von den unterschiedlichen Flexibilitäten. Größerer Freiraum führt zu niedriger Anisotropie und damit isotroper Orientierung der Dipole.

Es zeigt sich, daß die Abstandsmessung der Basen nur einen sehr geringen Teil der tatsächlichen Verhältnisse wiedergeben würde. Die größten Unterschiede ergeben sich darin, daß nicht eine feste Position angegeben werden kann, den der Farbstoff einnimmt, sondern vielmehr Bereiche existieren in denen er sich aufhalten kann. Diese Bereiche (Abb. 53, smaragdgrün + magenta) wiederum lassen sich über Wahrscheinlichkeitsdichten beschreiben.

Im Fall der Anbindung des Donors an die RNS an Position -10 (Abb. 53A, RNS -10 orange + smaragdgrün) ergibt sich ein sehr weiter, aber zusammenhängender Bereich in dem sich der Farbstoff theoretisch befinden könnte. Außerdem existiert ein zweiter, vermutlich durch das Protein abgetrennter Raum. Die Darstellung gibt jedoch keine Informationen über die Wahrscheinlichkeit selbst, sondern spiegelt nur ein Konfidenzintervall wieder. Im gezeigten Fall beträgt es 100 %. Darüber hinaus sind alle Wahrscheinlichkeiten auf den

Wert 1 normiert, was bedeutet, daß in diesem Intervall jede beliebige Position eingenommen werden kann. Unabhängig davon bedeutet diese Information jedoch auch, daß potentieller Freiraum für die Beweglichkeit des Farbstoffs existiert.

Zwar lassen sich auch mittlere Aufenthaltspositionen aus diesen Daten errechnen (Abb. 53A, orange Kugeln), nur geben sie die real existierenden Wahrscheinlichkeitsraum nicht wieder. Sie dienen nur zur Abschätzung der Distanz beider Wahrscheinlichkeitsdichten, die sich hier auf 41 Ångstrom beläuft.

▪ **Problematik mit modellierten Aufenthaltsbereichen der Farbstoffe**

Eine Wahrscheinlichkeitsdichte läßt sich nicht in jedem Fall berechnen, da der freistehende Raum, der erkundet werden kann, von der Größe des Farbstoffs abhängt. Realistisch sind 12 Ångstrom, betrachtet man Alexa 546 oder TAMRA, die aber nur bei der DNS +7 verwendet werden konnten.

Es kann auch keine Aussage getroffen werden darüber, ob ein Farbstoff durch Interaktionen mit der Proteinoberfläche trotzdem fixiert wird. Zum Beispiel verfügt der Akzeptor an der DNS an Position +3 (Abb. 53A, DNS +3, orange + magenta) über andere Bewegungsfreiheiten in Form dreier völlig unabhängig voneinander vorliegender Aufenthaltsbereiche, wobei nicht vorhergesagt werden kann, in welchem er sich letztendlich befindet. Allein die Größe des Aufenthaltsbereichs gibt einen Hinweis, ob genug Raum für eine freie Beweglichkeit bzw. Drehbarkeit des Farbstoffs existiert. Erst Anisotropie-Messungen bzw. theoretische Modellrechnungen liefern endgültige Daten dazu.

Die Orientierung der beiden Dipole von Donor und Akzeptor zueinander ist nicht bekannt und kann nicht extrahiert werden. Eine Vorhersage über die zu erwartete FRET-Effizienz ist somit kaum zu treffen, zumal die Wahrscheinlichkeitsräume teils sehr groß, teils nicht zusammenhängend sind. Das heißt, die prognostizierten FRET-Effizienzen werden ebenfalls breit verteilt sein oder sogar eigene Subpopulationen bilden. Nur in der umgekehrten Anwendung gibt diese Methode wesentlich mehr Aufschluß. Die Farbstoffe sind in der Praxis durch Wechselwirkungen in hauptsächlich einer Anordnung anzufinden, was wiederum zu einer schärferen Verteilung der FRET-Effizienzen führt. Mit deren Hilfe kann dann beurteilt werden in welchem Teil der Wahrscheinlichkeitsdichten sich der Farbstoff vermutlich befinden wird.

Wie hilft nun die gesamte Methode in der Vorhersage, welche Basen gewählt werden sollen?

Es sollte ausreichen, zwei Ankerpunkte zu wählen, die entweder für sich gesehen eine dramatische Änderung ihres Abstands durchlaufen oder wo die Orientierung der angebondenen Farbstoffe große räumliche Veränderungen erfährt. Ersteres ist angesichts der vorliegenden Struktur nicht trivial, letzteres kann sehr wahrscheinlich zu Änderungen in den FRET-Effizienzen führen, ist aber sehr abhängig von den tatsächlichen Verhältnissen innerhalb der Polymerase bzw. von den eingestellten Parametern zur Erkundung des freien

Raums. Die aus den Modellierungen gewonnen Aufenthaltsbereiche sollten daher weniger als quantitativer Maßstab dienen als denn eine qualitative Methode sein zur Überprüfung etwaiger Änderungen der Farbstoffposition. Dies vereinfacht die Suche nach einem geeigneten Ankerpunkt zwar nicht dramatisch, grenzt aber die Suche mit schärferen Konturen ein.

▪ Kriterien zur Auswahl der Ankerpunkte

Im Prinzip mußten also auf der Suche nach geeigneten Ankerpunkten folgende Punkte gewährleistet sein. Erstens mußten die Ankerpunkte einen Mindestabstand aufweisen, der wenigstens 30 Ångstrom beträgt, um bei Förster-Radien zwischen 40 und 60 Ångstrom genügend dynamischen Bereich für Abstandsverringierungen vorzuweisen. Zweitens mußten sich die relativen Abstände der Ankerpunkte stark genug verändern, um auf der FRET-Skala eine Änderung der FRET-Effizienz zu bewirken. Drittens sollte die Verschiebungsrichtung aus der Änderung der FRET-Werte hervorgehen. Natürlich muß die Möglichkeit den Elongationskomplex zu assemblieren, gewährleistet sein. Genauso muß nachgeprüft werden, ob die Aktivität der RNS Polymerase eingeschränkt wird, indem beispielsweise die Transkription durch Zugabe von Nukleotiden überprüft wird. Behindert dabei ein Farbstoff das Fortschreiten muß für den eigentlichen Test mit Rad26 darauf verzichtet werden.

7.10.2. Rad26 am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17)

Eine der ersten Messungen zur Verfolgung des Wegs, den die RNS aus der Polymerase vollzieht, wurde mit Hilfe einer Transkriptionsblase durchgeführt, die wie nachfolgend in Abb. 54 zu sehen, Farbstoffe sowohl auf der DNS an Position -10 wie auch auf der RNS an Position +17 besitzt. Dieser Elongationskomplex sollte also daraufhin untersucht werden, ob er ein geeignetes Modell darstellt, um die Aktivität von Rad26 zu detektieren.

Die Abbildung zeigt, wie sich laut theoretischer Vorhersage die relativen Positionen durch eine Verschiebung entgegen der Transkriptionsrichtung verändern. Der mittlere Abstand der beiden Farbstoffe im Ausgangszustand DNS -10/RNS +17 (Abb. 54, orange Kugeln) beträgt 38 Ångstrom[2]. Bei einer Verschiebung in Elongationsrichtung kommt es in der Theorie zu einem Distanzanstieg, wie in der Abbildung (Abb. 54, grüne Kugeln) zu erkennen ist. Wird eine Distanz von drei Basen zurückgelegt, erhöht sich der Abstand von 38 Ångstrom auf etwa 57 Ångstrom. Nach insgesamt 6 Basen Verschiebung an Position DNS -16/RNS +23 (Abb. 54, magentafarbene Kugeln) wächst der Abstand dann auf 75 Ångstrom. Für einen Abgleich dieser Werte mußte auf eine modellierte Struktur zurückgegriffen werden. Bei einer Rückwärtsbewegung bleibt das Manko bestehen, daß keine Daten bzw. Modelle über die RNS in den Längen von 11 bis 16 Basen existieren. Somit kann nicht definitiv vorausgesagt werden, daß der Abstand noch weiter sinkt. Eine visuelle Abschätzung scheint dies jedoch zu bestätigen, ein genauer Abstand bleibt jedoch weiterhin unbekannt.

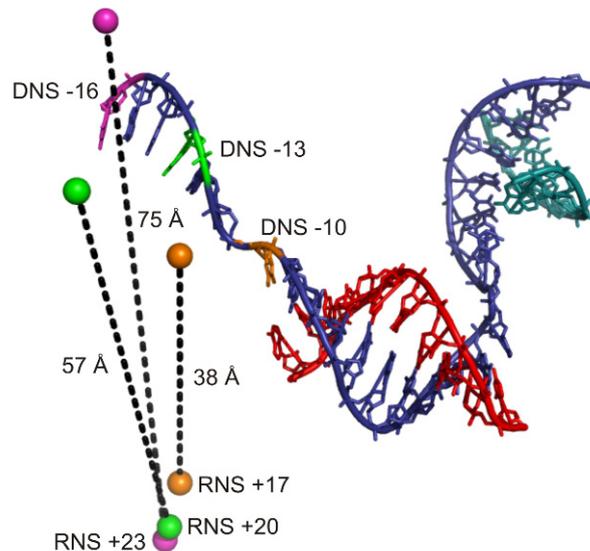


Abb. 54: Kristallstruktur der Transkriptionsblase im Elongationskomplex.

Die zu transkribierende DNS (dunkelblau) verläuft in der Polymerase einzelsträngig, die RNS (rot) ist komplementär dazu und verläuft parallel. Nur ein Teil der nicht-transkribierten DNS (cyan) kann in der Kristallstruktur aufgelöst werden. Im Ausgangszustand sind Farbstoffe an DNS und RNS gebunden (Positionen: DNS -10, RNS +17, orange). Der Abstand der mittleren Aufenthaltsbereiche (orange Kugeln) beträgt 38 Ångstrom. Vergleicht man dazu die Distanz der Farbstoffe nach einer virtuellen Verschiebung der Polymerase in Elongationsrichtung um drei Nukleotide (Positionen: DNS -13, RNS +20, grün) ergibt sich ein Abstand in Höhe von 57 Ångstrom. Eine Änderung der FRET-Effizienz geht damit einher. Eine nochmalige Verschiebung um drei Nukleotide erhöht den Abstand auf 75 Ångstrom (Positionen: DNS -16, RNS +23, magentafarbene Kugeln). Bei einer Verschiebung entgegen der Transkriptionsrichtung tritt wahrscheinlich eine Verringerung des Abstands ein. Die Distanzänderung kann nur abgeschätzt werden (Position RNS +14 unbekannt). Die Strukturelemente der RNS-Polymerase II wurden der Übersichtlichkeit halber entfernt.

Vor der Inkubation mit Rad26 zeigte sich eine sehr homogene Verteilung der aus den Einzelmolekül-Messungen erhaltenen FRET-Effizienz (Abb. 55A) mit einem Maximum bei etwa 82 %. Dies ist konsistent mit Messungen zur Bestimmung des RNS Wegs aus der Polymerase heraus und bestätigt die prognostizierte Distanz. Die Reproduzierbarkeit dieses Experiments war mit Schwankungen von 2 % mittlerer FRET-Effizienz sehr gut. Die Abweichungen wurden hauptsächlich hervorgerufen durch die neue Herstellung eines Elongationskomplexes bei jeder Messung. Da es sich um ein biologisches System handelt und dies nicht immer exakt in der gleichen Struktur vorliegt, kann es durchaus sein, daß vollständig rekonstituierte Elongationskomplexe einen leicht veränderten Abstand des Donor-Akzeptor-Paares zeigen. Die auftretende Schulter im Histogramm bei etwa 60 % kann zum Beispiel durch eine zweite Position der Farbstoffe erklärt werden. Die Hauptursache für die Breite der Verteilung liegt in Schwankungen der Fluoreszenz-Intensität, hervorgerufen durch systematische Fehlerquellen, allen voran durch die begrenzte Anzahl an detektierten Photonen.

Eine Methode, diesen Effekt abzuschwächen, ist die Glättung der Intensitäts-Zeit-Spuren. Je höher die Filterbreite für die Glättung gewählt wird, desto weniger neigen die

Zeitspuren zu Rauschen oder Schwankungen. Dies kann jedoch lediglich bei nicht dynamischen Systemen gerechtfertigt und angewendet werden. Sobald Veränderungen auftreten können, würde eine sehr hohe Filterbreite die Vorteile der Einzelmolekülspektroskopie ausradieren. Deshalb wurde für die vorliegenden Analysen ein gleitender Durchschnitt über 5 Datenpunkte der Integrationszeit 100 Millisekunden gewählt, im Gegensatz zu den Untersuchungen des RNS Wegs aus der Polymerase, bei denen die Daten mit einer doppelt so hohen Filterbreite analysiert wurden. So konnte auf der einen Seite das intrinsische Rauschen verringert werden, andererseits ließen sich aber mögliche dynamische Verschiebungen durch Rad26 weiterhin erkennen.

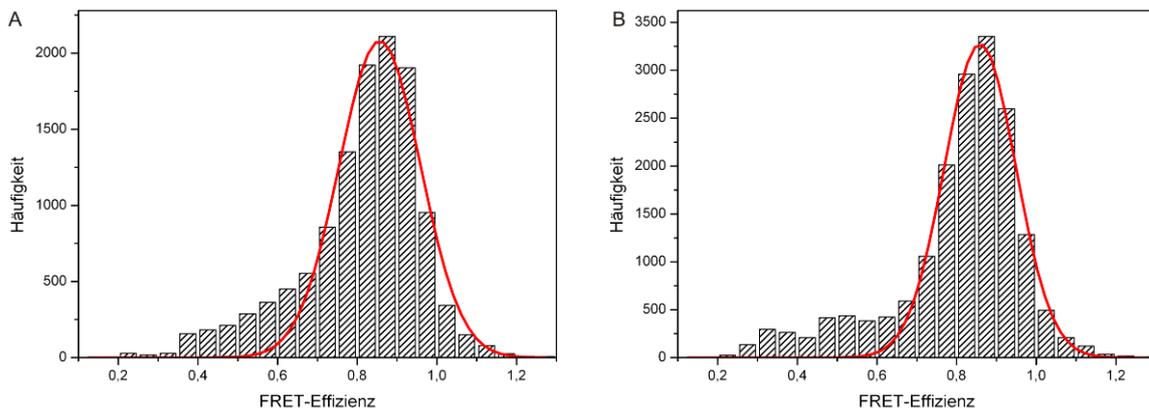


Abb. 55: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17).

(A) Ohne Rad26: Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gaußverteilung (rot) beschrieben werden. Das Maximum befindet sich bei 82 %. Die Breite der Verteilung geht zurück auf die begrenzte Anzahl an detektierten Photonen. (B) Mit Rad26 ohne ATP: Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gaußverteilung (rot) beschrieben werden. Das Maximum befindet sich bei 85 %. Es entstehen FRET-Effizienzen unterhalb 60 % ohne definiertes Maximum, möglicherweise hervorgerufen durch eine Umstrukturierung durch Rad26.

Nach der Zugabe von Rad26 ohne ATP bleibt jedoch das Histogramm weitgehend unverändert, wie in Abb. 55B zu sehen. Das Maximum verschiebt sich nicht und ist weiterhin bei 85 % zu finden, angesichts der systematischen Schwankungen ein unbedeutender Unterschied. Die Breite der Verteilung nimmt dagegen etwas zu von 15 % auf 18 %, jedoch nicht aufgrund dynamischer Effekte, wie vorab vermutet. Die Intensitäts-Zeit-Spuren zeigten keinerlei Hinweise für unterschiedliche Zustände. Andererseits verändert sich der Schulterbereich. Es werden nun auch Werte unterhalb 60 % gemessen, was aber schwer einzuordnen ist, zumal dieser Bereich kein eigenes Maximum mit einer definierten FRET-Effizienz besitzt. Auch für diese Werte gilt, daß sie nicht durch Schwankungen der FRET-Effizienz hervorgerufen wurden, sondern auf eigenständigen Zeitspuren basieren. Denkbar wäre, daß die Bindung des Rad26 eine Umstrukturierung bzw. eine Konformationsänderung der Polymerase auslöst, die zu niedrigeren FRET-Effizienzen führt.

Eine zweite gaußförmige Kurve wäre extrem breit und hätte daher wenig physikalische Aussagekraft, weswegen auf eine Beschreibung mit einer bimodalen Verteilung verzichtet wurde.

7.10.3. Rad26 und ATP am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17)

Der nächste logische Schritt war, zu verfolgen, ob das aktive Protein unter ATP-Verbrauch in der Lage ist, die RNS-Polymerase zu verschieben. Hierbei sollte sich die Distanz der Donor-Akzeptor-Punkte wesentlich zielgerichteter verändern, da das Rad26 nur zwei mögliche Richtungen der Fortbewegung bzw. Verschiebung besitzen kann. Entweder kommt es zu einer Distanzerhöhung oder zu einer Verringerung, abhängig davon, ob das Rad26 in Elongationsrichtung oder in die entgegengesetzte Richtung arbeitet und selbstverständlich davon wie das gewählte System darauf reagiert.

Messungen mit Rad26 zeigten aber selbst unter Anwesenheit von ATP keinen nennenswerten Effekt, wie das Histogramm Abb. 56 verdeutlicht.

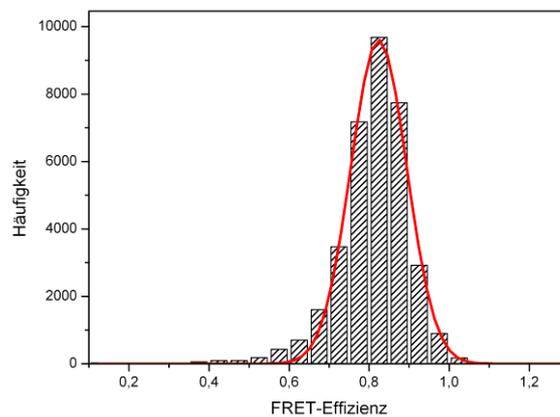


Abb. 56: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17) nach der Zugabe von Rad26 und ATP.

Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gaußverteilung (rot) beschrieben werden. Das Maximum befindet sich bei 82 %. Es treten keinerlei nennenswerte FRET-Effizienzen außerhalb der Verteilung auf.

Der gesamte Anteil an Elongationskomplexen liegt unverändert bei einer FRET-Effizienz von 82 % vor. Ein dramatischer Effekt des Rad26 scheint selbst in Anwesenheit von ATP nicht aufzutreten. Sogar die Breite der Verteilung ist nahezu identisch mit 14 % im Vergleich zu 15 % ohne Rad26 und ATP. Das bedeutet, daß das Rad26 auch keine zusätzliche Dynamik auslöst, was bei der Betrachtung der Zeitspuren aber ohnehin aufgefallen wäre. Das heißt auch, daß das Rad26 entweder keinen Einfluß auf den Elongationskomplex ausübt oder der Effekt mit diesen Farbstoffpositionen nicht beobachtet werden kann.

7.10.4. Anpassungen der Konstrukte

Die Tatsache, daß die Zugabe von Rad26 auch nicht in Anwesenheit von ATP eine nennenswerte Veränderung der FRET-Effizienzen bewirkte, kann verschiedene Ursachen haben, die im folgenden behandelt werden sollen.

Im Prinzip ergeben sich 4 Erklärungsmöglichkeiten:

- **Substratlänge unzureichend**

DNS und / oder RNS bieten nicht genügend Bindungsmöglichkeit für das Rad26

- **Unspezifische Wechselwirkungen**

Wechselwirkungen zwischen passivierter Oberfläche und RNS-Polymerase II bzw. Rad26 sind zu hoch

- **Energetische Barriere**

Nicht-komplementäre DNS in der Transkriptionsblase verhindert eine Verschiebung aufgrund ungünstiger energetischer Verhältnisse

- **Sensitivität der Farbstoffposition / -kombination unzureichend**

Die auftretenden Änderungen sind nicht ausreichend groß für das Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17). Eine mögliche Verschiebung fällt kleiner aus als die Prognose vorhersagt.

Zur Feststellung welcher diese Gründe oder Kombinationen hiervon ausschlaggebend sind, wurden weitergehende Untersuchungen unternommen, die das Ziel hatten, das optimale Konstrukt im Zusammenhang mit Rad26 einzugrenzen.

7.10.4.1. Einfluß längerer DNS am Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17)

Wenn das Rad26 über die DNS an den Elongationskomplex bindet, dann kann es das nur an zwei bis drei Bereichen, nämlich dort, wo die RNS-Polymerase II die DNS nicht bedeckt. Mögliche Bindungsstellen könnten die überstehenden Abschnitte der DNS stromaufwärts und stromabwärts sein sowie Teile der nicht-transkribierten DNS. Die für die Kristallstruktur und diese Arbeit verwendete DNS verfügte aber höchstens über Überhänge von 9 bzw. 15 Basen Länge, geht man davon aus, daß die flexiblen Bereiche der DNS, die nicht in der Kristallstruktur aufgelöst werden konnten, genug Freiheit für eine Bindung bieten. Sollte diese Länge nicht ausreichend sein und die Bindung beeinträchtigen, könnte eine Verlängerung der DNS in diesen Bereichen die Aktivität des Rad26 möglicherweise verstärken.

Folglich wurde ein verändertes Konstrukt eingesetzt, daß auf Basis des Konstrukts DNS(-10)-RNS(+17) zwar innerhalb der Polymerase eine identische Struktur aufwies, aber über 15 zusätzliche Basen an beiden Enden verfügte. Experimente ohne Rad26 zeigten weder einen Einfluß dieser endständigen Basen auf die Herstellung des Elongationskomplexes noch auf die resultierende Distanz von Donor zu Akzeptor, die ebenfalls zu 85 % FRET-

Effizienz führte. Die Addition von Rad26 und ATP führte aber auch in diesem Fall nicht zu einer drastischen Änderung der Verteilung. Das Maximum der Verteilung liegt weiterhin bei 84 % wie für den Elongationskomplex in dieser Konfiguration erwartet wird. Eine Dynamik in den Intensitäts-Zeit-Spuren trat zu keinem Zeitpunkt auf, auch nicht nach der Zugabe von Rad26. Falls überhaupt, dann muß eine dauerhafte Umstrukturierung eingetreten sein, die aber nur einen sehr kleinen Bruchteil aller Moleküle betraf.

7.10.4.2. Einfluß längerer DNS und RNS am Konstrukt xDNS(-10)-RNS(+35)

In den Aktivitätstests und auch in den Anisotropiemessungen zur Bestimmung des Bindungsverhaltens (siehe Kapitel 7.5. bzw. 7.6.) konnte eine Interaktion mit RNS bzw. eine Stimulation der Aktivität durch RNS nachgewiesen werden. Prinzipiell wäre es denkbar, daß das Rad26 sogar drei Bindungspartner benötigt, nämlich alle Bestandteile des Elongationskomplexes.

Hierzu wurde das Konstrukt abermals verändert, indem nicht nur eine um 30 Basen verlängerte DNS wie beim Konstrukt xDNS(-10)-RNS(+17), sondern auch die längste verfügbare RNS mit einer Länge von 35 Basen eingesetzt wurde. Die Farbstoffe befanden sich an der DNS auf Position -10 und an der RNS am Ende auf Position +35. Eine graphische Darstellung kann leider nicht gegeben werden, da sich aufgrund zu hoher Fluktuationen kein eindeutig bevorzugter Aufenthaltsbereich für das Ende der RNS ergab[2]. Aus diesem Grund muß auch auf eine absolute Angabe der möglichen Distanzänderung verzichtet werden. Dennoch konnten bereits bei den Experimenten zur Verfolgung des Wegs der RNS aus der Polymerase Elongationskomplexe erfolgreich assembliert werden, was die prinzipielle Nutzbarkeit des Konstrukts für die Messungen mit Rad26 ermöglicht.

Der Elongationskomplex um das Konstrukt xDNS(-10)-RNS(+35) weist naturgemäß eine niedrige FRET-Effizienz auf, wie das Maximum des Histogramms bei 55 % in Abb. 57A zeigt. Die breite Verteilung ist konsistent mit vorangegangenen Experimenten und beruht auf den vielfältigen Bindungsstellen einer derartig langen RNS. Bereits eine Länge von 26 Basen zeigt eine multimodale Verteilung, die aber noch durch eine entsprechende Anzahl an Gaußdistributionen verläßlich beschrieben werden kann. Ab 32 Basen Länge läßt sich die Lage der Maxima nicht mehr exakt bestimmen[2].

Die Anwesenheit von Rad26 und ATP änderte die Verteilung nicht wesentlich, wie in Abb. 57B zu erkennen ist. Allenfalls ist eine leichte Asymmetrie bei höheren FRET-Effizienzen zu erkennen. Das Maximum sinkt auf 52 %, was nicht als signifikant betrachtet werden darf, da sich in diesem Fall die Abstände nahe am Förster-Radius von etwa 58 - 60 Ångstrom bewegen. Das Histogramm verliert aber an Breite und wird leicht schärfer, was möglicherweise auf eine Bindung des Rad26 hindeuten könnte. Eine leichte Einschränkung der freien Drehbarkeit eines der beiden Farbstoffe würde sich in Änderungen des Orientie-

rungsfaktors κ^2 manifestieren. Eine direkte Bindung des Rad26 an das Ende der RNS andererseits scheint eher unwahrscheinlich. TAMRA, das am Ende der RNS an Position +35 gebunden war, reagiert insbesondere bei der Anbindung an Proteine und damit bei einer räumlichen Nähe mit Artefakten wie verändertem Absorptionsspektrum[216-218]. Generell ist dieser Farbstoff sehr sensitiv in Bezug auf seine Umgebung[232].

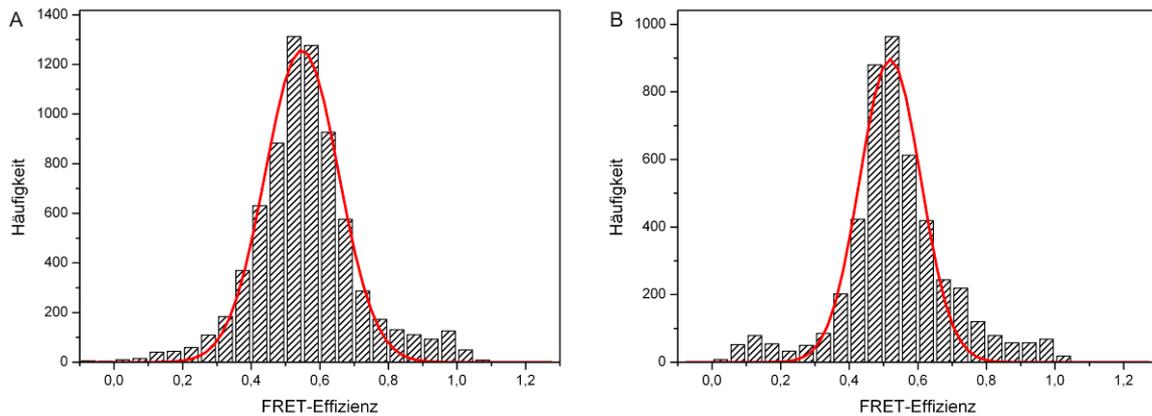


Abb. 57: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen am Konstrukt xDNS(-10)-RNS(+35).

(A) Ohne Rad26: Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gaußverteilung (rot) beschrieben werden. Das Maximum befindet sich bei 55 %. Die Breite der Verteilung geht zurück auf die hohen Fluktuationen des Endes der RNS. (B) Mit Rad26 und ATP: Das Histogramm kann noch mit Hilfe einer einfachen Gaußverteilung (rot) beschrieben werden. Die Verteilung beschreibt aber FRET-Effizienzen unterhalb 20 % und überhalb 70 % nur ungenau. Das Maximum befindet sich bei 52 %, die Breite des Histogramms beträgt nur 18 %, was auf eine Bindung des Rad26 hindeuten könnte.

Es scheint somit nicht unmittelbar einen Zusammenhang mit der Substratlänge zu geben. Das Fehlen eines Effekts, obwohl ein Abstand nahe dem Förster-Radius gewählt wurde, scheint auf geringe Veränderungen des Rad26 hinzudeuten, was durch weitere Experimente bestätigt werden muß.

7.10.4.3. Ausschluß von unspezifischen Wechselwirkungen mit den verwendeten Oberflächen

Es konnte also soweit kein sichtbarer Effekt des Rad26 auf die Polymerase festgestellt werden. Ein Grund wären unspezifische, aber starke Interaktionen der Elongationskomplexe mit der Oberfläche, auf der sie immobilisiert wurden und die eine Verschiebung verhindern. Um dies zu untersuchen, wurde das ursprüngliche Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17) und das verlängerte Konstrukt xDNS(-10)-RNS(+35) jeweils vorab mit Rad26 inkubiert und danach erst auf der Oberfläche angebunden. Bei der Präparation traten keinerlei nachteilige Effekte auf, wie vermindertes Binden der Komplexe oder ein Auseinanderfallen selbiger. Die Vorab-Inkubation vor der Immobilisierung zeigte trotzdem keine erkennbare Auswirkung. Weder änderte sich die Verteilung noch verschob sich das Maximum bei 85 % respek-

tive 55 %. Das heißt, die Oberfläche sowie Interaktionen mit ihr sind nicht die Ursache für das Ausbleiben eines Effekts durch das Rad26. Auch hier traten nur vereinzelt Moleküle mit niedrigerer FRET-Effizienz auf. Das Prinzip der Präinkubation ließ natürlich nicht zu, sich ein Bild vom Elongationskomplex alleine zu machen. So muß im Fall erstmals verwendeter Konstrukte eine Analyse der Polymerase und des RNS-DNS-Hybrids alleine erfolgen bevor Rad26 zugegeben wird.

7.10.4.4. Verwendung durchgehend komplementärer DNS in der Transkriptionsblase

Das Fehlen eines sichtbaren Effekts des Rad26 auf die Polymerase kann nunmehr zwei Gründe haben. Gesetzt den Fall das Rad26 zeigt Wirkung auf die Polymerase, sind die gewählten Farbstoffpositionen, trotz theoretischer Brauchbarkeit, entweder nicht kompatibel mit der Veränderung und eignen sich somit nicht als Reportersystem oder aber liegt es schlichtweg an der Tatsache, daß ein künstliches Konstrukt als Transkriptionsblase verwendet wurde. Daraus resultiert nämlich eine sehr hohe energetische Barriere, die bereits bei der Transkription, also beim Einbau einer komplementären Base zum Tragen kommt. Die Transkriptionsblase würde in 5'-Richtung um eine Base geöffnet, ohne jedoch gleichzeitig am 3'-Ende geschlossen werden zu können, da innerhalb des RNS-DNS-Hybrids keine komplementäre Basenpaarung existiert. Bei einem Fehler in der DNS mag die Schadensstelle das schwer zu überwindende Hindernis darstellen. Dennoch sind die beiden DNS-Stränge vor und hinter dem Schaden komplementär zueinander im Gegensatz zum verwendeten Konstrukt. Andererseits konnte eine Transkription auch am künstlichen Konstrukt bereits erfolgreich gezeigt werden[2].

Aufgrund dieser Problematik erfolgte eine Änderung des RNS-DNS-Hybrids insoweit, daß die Sequenz der beiden DNS-Stränge vollkommen komplementär zueinander war. Dies erforderte auch eine Abänderung der Präparation der Elongationskomplexe analog zu *Kireeva et al.*[233]. Zudem wurden Elongationskomplexe aus RNS-Polymerase II und Transkriptionsfaktor TFIIF verwendet. Zur Transkription selbst ist TFIIF zwar nicht essenziell notwendig, aber als einziger Initiationsfaktor, von dem bekannt ist, daß er auch in der Elongationsphase weiterhin gebunden bleibt, könnte möglicherweise entscheidender Einfluß auf die Bindung des Rad26 ausgehen.

7.10.4.5. Nachweis der Vorwärtsbewegung der Polymerase bei der Transkription

Im ersten Schritt mußte zunächst sichergestellt werden, daß diese neue und physiologisch realistischere Transkriptionsblase dieselbe Struktur wie das künstliche Konstrukt einnimmt. Die Farbstoffpositionen wurden indes an der DNS auf Position -10 und an der RNS

auf Position +17 beibehalten. Das nachfolgende Histogramm in Abb. 58A zeigt das Ergebnis dieser Messung. Das Histogramm kann mit einer einfachen Gaußverteilung beschrieben werden, wobei sowohl die Breite der Verteilung (14 %) wie auch das Maximum bei 85 % exakt mit den Ergebnissen des künstlichen Konstrukts (Kapitel 7.10.2) übereinstimmen. Das wiederum legt die Vermutung nahe, daß der Komplex in einer identischen Struktur vorliegt.

Um zu überprüfen, daß die komplementäre Struktur des RNS-DNS-Hybrids energetisch günstiger liegt, wurden Versuche zur Transkription der RNS-Polymerase II durchgeführt. Die theoretische Prognose, daß beim Einbau der Nukleotide eine Distanzerhöhung des Fluorophor-Paars und somit ein Absinken der FRET-Effizienz eintritt, galt es nachzuweisen. Zum einen sollte der Einbau neuer Nukleotide die Fortbewegung selbst zeigen, zum anderen kann man auf diesem Weg den Endpunkt einer potentiellen Verschiebung durch das Rad26 simulieren. Wenn das Rad26 tatsächlich in Richtung der Transkription arbeitet, muß die FRET-Effizienz ähnliche Werte annehmen wie sie auch bei der Transkription entstehen. Um einen negativen Effekt der Immobilisierung mit Sicherheit ausschließen zu können, wurde die Reaktion über Vor-Inkubation durchgeführt. Das Ergebnis zu diesem Experiment ist in Abb. 58B gezeigt.

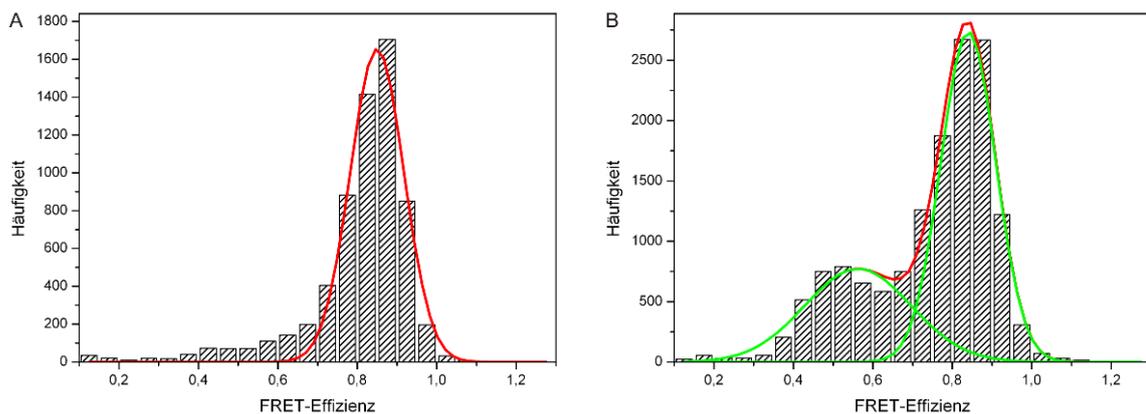


Abb. 58: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen am Konstrukt nbDNS(-10)-RNS(+17).

(A) Ohne Rad26: Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gaußverteilung (rot) beschrieben werden. Das Maximum befindet sich bei 85 %, mit einer leichten Häufung an niedrigen FRET-Effizienzen unterhalb 60 %. (B) Mit Nukleotiden U, A, G nach Vor-Inkubation: Das Histogramm kann mit Hilfe zweier Gaußverteilungen unterschiedlicher Amplitude (grün) beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 56 % und 84 %. Etwa 54 % der Elongationskomplexe waren zur Transkription fähig.

Man sieht sehr deutlich, daß diese Verteilung aus zwei unterschiedlichen Populationen besteht. Auf der einen Seite existiert weiterhin das sehr ausgeprägte Maximum bei 84 %, das zurückzuführen ist auf scheinbar nicht aktive RNS-Polymerase II. Der zweite Teil bildet das neu hinzugekommene zweite Maximum bei 56 %. Im Vergleich zur Transkription mit zwei Nukleotiden an einer künstlichen Transkriptionsblase scheint sich das gleiche Bild zu

ergeben[2]. Bemerkenswert ist, daß etwa gleich viele Moleküle diesen Bereich hervorrufen. Vergleicht man die Flächen unterhalb der beiden Verteilungen, dann entfallen etwa 54 % auf die niedrigeren FRET-Effizienzen, während der Rest (46 %) zu den höheren gezählt wird. Dazu trägt auch bei, daß die Population bei niedrigerer FRET-Effizienz eine wesentlich breitere Verteilung aufweist. Bedenkt man, daß die Addition der drei Nukleotide Uracil, Adenin und Guanin eine maximale Transkription von sieben Basen ermöglicht bzw. eine Distanzerhöhung des Farbstoff-Paars um beinahe 40 Ångstrom verursacht, so kann angesichts dieser breiten Verteilung und unter Beachtung der prognostizierten Abstandsänderungen kein eindeutiger Endzustand erreicht worden sein. Bei *Andrecka et al.* ging man vom Einbau nicht-komplementärer Nukleotide aus, was den gleichen Effekt zur Folge hatte. Wären bei allen aktiven Elongationskomplexen genau sieben Basen eingebaut worden, hätte eine zweite Population mit einer ähnlichen Breite wie der Ausgangszustand entstehen müssen.

Natürlich weist der Energietransfer um 50 % Effizienz seinen sensitivsten Bereich auf. Also ist dort selbst bei kleinen Differenzen die breiteste Verteilung möglich. Dennoch hätte nach der Theorie (Kapitel 7.10.2) eine Änderung des Abstands um beinahe 40 Ångstrom eintreten müssen (Abb. 54, magenta Kugeln), was bei einem Förster-Radius des Fluorophor-Paars von 57 Ångstrom[2] einem dramatischen Fall der FRET-Effizienz auf nur mehr etwa 15 % entspricht. Dieser Wert kann aber nicht allein durch Umorientierungen der Farbstoffe und Änderungen des Parameters κ^2 auf 56 % angehoben worden sein. Umgerechnet bedeutet die Änderung der FRET-Effizienz einen Anstieg der Distanz auf etwa 55 Ångstrom, was einer Translokation um drei Basen sehr nahe kommt. Daß dieser Wert sich nicht mit den theoretisch ermittelten 7 Basen deckt, zeigt abermals, daß auch die Berechnung des freien Raums, den der Farbstoff einnehmen kann, nur eine Tendenz anzeigt und daher mehr als Richtwert zu verstehen ist. Die Simulation der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten behandelt nämlich das Problem nur nach statischen Gesichtspunkten. Bei einer Verschiebung werden die Farbstoffe zur Umorientierung oder Positionsänderung vom Volumen innerhalb der RNS-Polymerase begrenzt. Somit kann es sein, daß begünstigt durch Abstandshalter zu den Ankerpunkten, nicht der vorausgesagte Aufenthaltsbereich angenommen wird, sondern der Farbstoff eher im ursprünglichen verbleibt. Damit wird es natürlich auch unverhältnismäßig schwieriger, relative Distanzen vorherzusagen. Dafür bietet sich die Möglichkeit, das Konstrukt jeweils zuerst durch Zugabe von Nukleotiden direkt auf den Effekt der Transkription hin zu untersuchen.

Dennoch zeigt dieses Ergebnis deutlich, daß das Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17) in erster Linie nicht sensitiv genug auf kleine Verschiebungen reagiert. Die Zugabe von 3 Ribonukleotiden und damit die potentielle Transkription um 7 Basen veränderte die FRET-Effizienz nur um etwa 30 %. Aus der ursprünglichen Überlegung, welche der 4 möglichen Erklärungen für Probleme im Zusammenhang mit Rad26 verantwortlich ist, muß für dieses

Konstrukt diese Ursache allen voran gestellt werden. Die nicht-komplementäre Basensequenz schien dagegen keine dramatischen Auswirkungen zu haben.

Andererseits darf nicht vergessen werden, daß das Konstrukt xDNS(-10)-RNS(+35) ebenfalls keine Veränderung durch das Rad26 aufwies, obwohl dort der Abstand nahe dem Förster-Radius extrem sensitiv hätte reagieren müssen.

Im Umkehrschluß bedeuten diese Ergebnisse, daß das Rad26 keine dramatischen Verschiebungen der Polymerase entlang der Transkriptionsblase ausübt. In weiteren Experimenten mußten also andere, sensitivere Konstrukte verwendet werden, um einen Effekt des Rad26 beobachten zu können. Gleichzeitig konnten mögliche Beeinträchtigungen beseitigt werden, indem immer eine Vor-Inkubation durchgeführt wurde, um unspezifische Wechselwirkungen ausschließen zu können sowie vollständig komplementäre Sequenzen innerhalb der Transkriptionsblase verwendet wurden. Damit mußte lediglich die Sensitivität der Konstrukte optimiert werden.

7.10.5. Höhere Sensitivität durch veränderte Fluorophor-Ankerpunkte

Die RNS-DNS-Konstrukte, die dafür verwendet wurden, den Weg der RNS aus der Polymerase II herauszufinden, hatten den entscheidenden Vorteil, keine Fehlerquellen wie Schwankungen oder Dynamik aufzuweisen. Darüber hinaus wurde ihr Einsatz bereits erfolgreich etabliert und ausführliche Daten gesammelt. Sie schienen jedoch nicht optimal auf die Untersuchungen des Rad26 abgestimmt zu sein, was hauptsächlich an der Sensitivität des Systems lag. Erstens muß es so sensitiv wie möglich reagieren, auch wenn sehr geringe Distanzänderungen auftreten. Bei der FRET-Methode ist dies generell dann der Fall, wenn sich diese Distanzen um den Förster-Radius herum befinden. Zweitens wäre es vorteilhaft, wenn direkt größere Unterschiede in den Abständen auftreten würden.

Konkret heißt das, daß im direkten Vergleich der Einbau von nur drei Nukleotiden einen Unterschied in der FRET-Effizienz von mehr als 20 % hervorrufen sollte. Es ist nämlich eher unwahrscheinlich, daß das Rad26 eine Bewegung hervorruft, die einer Translokation um sieben Basen wie beim Konstrukt DNS(-10)-RNS(+17) entspricht.

Aus besagten Gründen, wurden daher Veränderungen der Gestalt eingeführt, daß neben dem Einsatz vollständig komplementärer DNS und der Vor-Inkubation auch ein neues Fluorophor-Paar (Alexa 555 / Alexa 647) eingebaut wurde, dessen Förster-Radius mit 47 Ångstrom eine bessere Sensitivität versprach. Obwohl noch eine Vielzahl an Positionen entlang der zu transkribierenden DNS bestanden, die sich prinzipiell für eine mögliche Anbindung der Fluorophore eigneten, erschöpften sich die in der Praxis nutzbaren in den vorher vorgestellten Konstrukten sowie dem Konstrukt DNS(+7) sowie DNS(+3) in Kombination mit verschiedenen RNS-Ankerpunkten.

Bei letzterem ergaben strukturelle Prognosen, daß die Distanz des Donor-Akzeptor-Paares nur in einem Bereich von 10 Ångstrom ansteigt bzw. fällt. Experimente diesbezüglich konnten dementsprechend keinen Unterschied vor und nach der Zugabe von Rad26 erkennen. Im Fall der Position DNS(+7) ergaben Experimente ebenfalls keinerlei Veränderungen der FRET-Effizienzen durch das Rad26. Dies ist um so erstaunlicher, da hier laut Prognose ein erstaunlich sensitives Konstrukt eingesetzt worden war.

An der RNS hingegen konnten nicht alle Basen als Ankerpunkt fungieren, insbesondere nicht im Inneren der Polymerase. Das frei zugängliche Volumen dort ist teils so beschränkt, daß bei einem zusätzlich anwesenden Farbstoff bereits das Assemblieren der Elongationskomplexe schwierig erscheint. Eine Verschiebung würde dann nahezu ausgeschlossen angesichts der räumlichen Verhältnisse. Ein Farbstoff würde nicht mehr als unbeteiligter Reporter funktionieren, sondern möglicherweise als gezielte Sperre.

Eine Alternative bot natürlich die nicht zu transkribierende DNS, hier lieferte jedoch die Kristallstruktur nur unzureichende Informationen. Es konnten jedoch weitergehende Daten hierzu gewonnen werden, die für eine Modellierung des gesamten RNS-DNS Systems genutzt wurden.

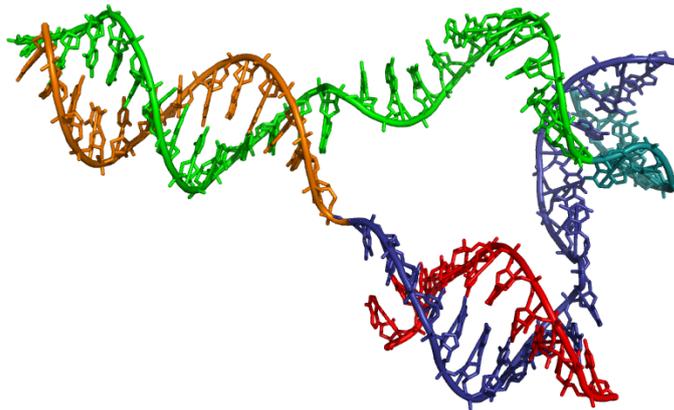


Abb. 59: Teilweise modellierte Kristallstruktur der Transkriptionsblase im Elongationskomplex.

Die zu transkribierende DNS (dunkelblau) verläuft in der Polymerase einzelsträngig, die RNS (rot) ist komplementär dazu und verläuft parallel. Nur ein Teil der nicht-transkribierten DNS (cyan) kann in der Kristallstruktur aufgelöst werden. Die restliche Abfolge der Basen wurde modelliert, die nicht-transkribierte DNS (grün) verläuft innerhalb der Polymerase nicht nach helikalem Muster. Erst durch die Rehybridisierung mit dem modellierten Bereich der zu transkribierenden DNS (orange) wird die Doppelhelix geformt. Die nicht-transkribierte DNS bietet sich ebenfalls als Ankerpunkt für Farbstoffe an. Die Strukturelemente der RNS-Polymerase II wurden der Übersichtlichkeit halber entfernt.

Bei der Betrachtung dieser nun vollständigen Struktur des Elongationskomplexes (Abb. 59) fällt auf, daß die Basen der nicht-transkribierten DNS innerhalb der Polymerase (grün) eine räumliche Abfolge besitzen, die von der herkömmlichen helikalen Struktur abweicht. Genau dieser Bereich bot sich an, neue Positionen für die Anbindung von Farbstoffen auszuwählen, da bei einer Verschiebung der größtmögliche Effekt zu erwarten war.

7.10.5.1. Konstrukt nb[tDNS(-10)-ntDNS(-7)] mit angepaßtem Förster-Radius

Es wurde also ein weiteres Konstrukt generiert, bei dem sich nunmehr sowohl Donor als auch Akzeptor auf der DNS befanden. Die folgende Abbildung (Abb. 60A) zeigt den Abstand der Farbstoffe im Ausgangszustand (orange Kugeln), sowie nach einer Verschiebung um ein bzw. drei Basen.

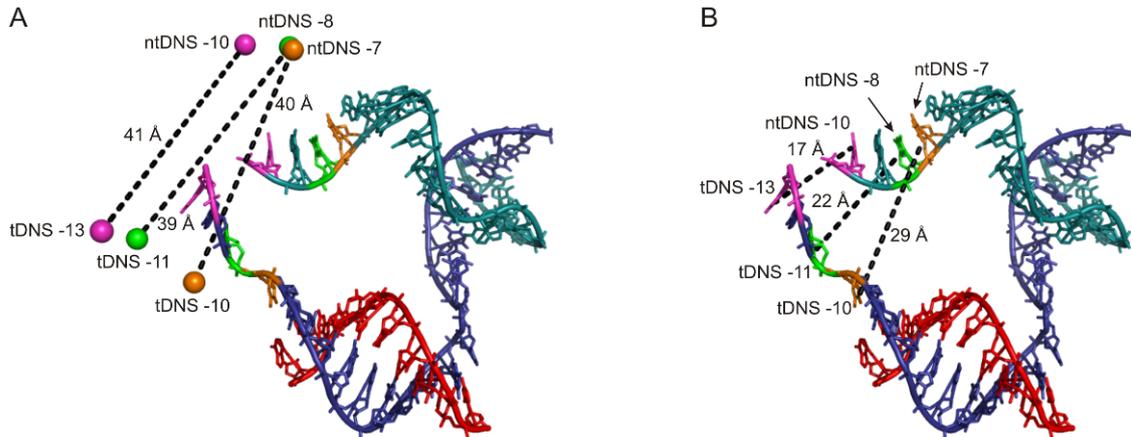


Abb. 60: Kristallstruktur der Transkriptionsblase im Elongationskomplex.

Die zu transkribierende DNS (tDNS, dunkelblau) verläuft in der Polymerase einzelsträngig, die RNS (rot) ist komplementär dazu und verläuft parallel. Ein Teil der nicht-transkribierten DNS (ntDNS, cyan) kann nicht in der Kristallstruktur aufgelöst werden und wurde daher modelliert. Im Ausgangszustand sind Farbstoffe an tDNS und ntDNS gebunden (Positionen: tDNS -10, ntDNS -7, orange). Die Strukturelemente der RNS-Polymerase II wurden der Übersichtlichkeit halber entfernt (A) Der Abstand der mittleren Aufenthaltsbereiche (orange Kugeln) beträgt knapp 40 Ångstrom. Vergleicht man dazu die Distanz der Farbstoffe nach einer virtuellen Verschiebung der Polymerase in Elongationsrichtung um ein Nukleotid (Positionen: tDNS -11, ntDNS -8, grün) ergibt sich ein Abstand in Höhe von 39 Ångstrom (grüne Kugeln). Eine nochmalige Verschiebung um zwei Nukleotide erhöht den Abstand auf 41 Ångstrom (Positionen: tDNS -13, ntDNS -10, magentafarbene Kugeln). Die mittleren Aufenthaltsbereiche der Farbstoffe geben den tatsächlichen Verlauf des Abstands der Basen zueinander nur unzureichend wieder. Eine größere Änderung der FRET-Effizienz ist anzunehmen. (B) Der Abstand der Ankerpunkte beträgt 29 Ångstrom. Vergleicht man dazu die Distanz der Basen nach einer virtuellen Verschiebung der Polymerase in Elongationsrichtung um ein Nukleotid (Positionen: tDNS -11, ntDNS -8, grün) ergibt sich ein Abstand in Höhe von 22 Ångstrom. Eine nochmalige Verschiebung um zwei Nukleotide senkt den Abstand weiter auf 17 Ångstrom (Positionen: tDNS -13, ntDNS -10, magentafarben). Obwohl nicht die Abstände der Farbstoffe betrachtet werden, suggeriert dies eine größere Änderung der FRET-Effizienz.

Anfangs sind die Farbstoffe im Mittel noch etwa 40 Ångstrom voneinander entfernt. Die Theorie besagt nun, daß sich Abstände bei der Elongation kaum verringern sollten. Der Einbau einer Base (Abb. 60A, grüne Kugeln) verändert die Distanz nur unmerklich auf gerade einmal 39 Ångstrom. Allenfalls die Umorientierung der Farbstoffe könnte hier zu einer Änderung der FRET-Effizienz führen. Nach weiteren zwei Basen erhöht sich der Abstand sogar wieder leicht auf nun 41 Ångstrom (Abb. 60A, magentafarbene Kugeln). Diese Abstandsänderungen sind im Prinzip denkbar ungeeignet als Reportersystem. Dennoch sind die Abstände der beteiligten Basen, also der Ankerpunkte nicht zu vernachlässigen, wie sie

in der folgenden Abbildung (Abb. 60B) aufgeführt sind. Dem Abstand von 29 Ångstrom im Ausgangszustand (Abb. 60B, orange) widerfährt nun ein wesentlich größerer Unterschied auf 22 Ångstrom, wie aus der simulierten Verschiebung um nur eine Base in Elongationsrichtung ersichtlich ist (Abb. 60B, grün). Weitere Translokation in diese Richtung führt zu Abständen von 18 Ångstrom bei zwei Basen Differenz, sowie 17 Ångstrom bei drei Basen (Abb. 60B, magentafarben). Diese Veränderungen ließen trotz der theoretischen Erkenntnisse auf ein sensibles Konstrukt hoffen.

7.10.5.2. Verschiebung in Transkriptionsrichtung am Konstrukt nb[tDNS(-10)-ntDNS(-7)]

Die Messung zum Elongationskomplex in dieser Konfiguration liefert folgendes Ergebnis, zu sehen in Abb. 61A.

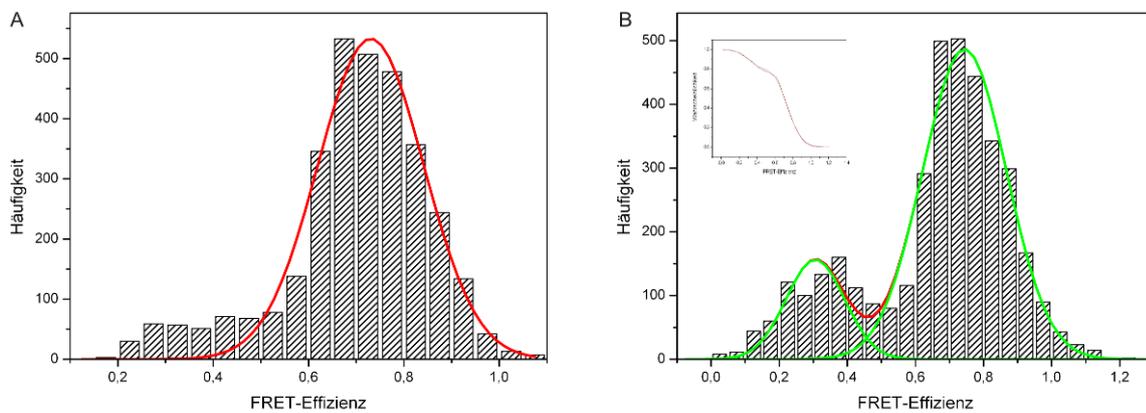


Abb. 61: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen am Konstrukt nb[tDNS(-10)-ntDNS(-7)].

(A) Ohne Rad26: Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gaußverteilung (rot) beschrieben werden, ist aber sehr breit aufgrund großer Bewegungsfreiheit des Donors an der nicht-transkribierten DNS. Das Maximum befindet sich bei 73 %, was sehr gut mit den prognostizierten 40 Ångstrom übereinstimmt. (B) Mit Nukleotiden U, G: Das Histogramm kann mit Hilfe zweier Gaußverteilungen (grün) unterschiedlicher Amplitude beschrieben werden. Die Maxima befinden sich bei 31 % bzw. 74 %. Die Verteilungen sind relativ breit, wobei die Verteilung bei 31 % die tatsächlichen Werte etwas unterrepräsentiert. Links oben ist die Beschreibung der Daten (schwarz) mit Hilfe der kumulativen Verteilungsfunktion (rot) gezeigt.

Die Verteilung ist sehr breit, was aber nur die große Bewegungsfreiheit des Donor-Farbstoffs widerspiegeln kann, da die Akzeptorposition bei -10 für dieses Konstrukt wie schon bei DNS(-10)-RNS(+17) beibehalten wurde. Das Maximum der Gaußverteilung bei 73 % paßt exzellent zusammen mit dem vorhergesagten mittleren Abstand der Farbstoffe in Höhe von 40 Ångstrom. In diesem Fall stimmte die Theorie sehr gut mit dem Experiment überein, weswegen ein möglicher Effekt des Rad26 höchstwahrscheinlich mehr an der Umorientierung der Farbstoffe festzumachen war als an Distanzänderungen selbiger.

Es stellt sich natürlich die Frage, in welche Richtung das Rad26 die Polymerase schiebt. Die Überlegungen anhand der Struktur würden im Fall des Zuwachses an FRET-Effizienz von einer Verschiebung in Elongationsrichtung ausgehen. Unter der Annahme eines Förster-Radius von 47 Ångstrom, unabhängig davon, ob die freie Beweglichkeit der Fluorophore eingeschränkt ist und dadurch der Wert für den Parameter κ^2 von $\frac{2}{3}$ abweicht, galt es herauszufinden, wie die Transkription die FRET-Effizienz des Konstrukts beeinflussen würde. Hier wurden aufgrund der Unterschiede in den theoretischen Vorhersagen (Aufenthaltsbereiche vs. Ankerpunkte) lediglich zwei Nukleotide eingesetzt. Die Sequenz läßt dann im Idealfall nur eine Transkription um 2 Basen zu.

Die Analyse dieser Messung lieferte jedoch ein verblüffendes Ergebnis (Abb. 61B). Augenscheinlich sinken die FRET-Effizienzen bei der Transkription, obwohl dies weder vom Vergleich der Aufenthaltsbereiche noch vom Vergleich der Basen vorhergesagt worden war. Die Maxima entstehen bei 31 % sowie bei 74 %. Hinter letzterem Wert verbirgt sich gleichzeitig auch die anteilmäßig größte Population, die durch nicht aktives Protein hervorgerufen wird. Die Werte stimmen sehr gut überein, auch der leicht asymmetrische Verlauf zu höheren FRET-Effizienzen hin ist analog zu Abb. 61A. Das andere Maximum konnte mit Hilfe der kumulativen Distributionsfunktion näher abgegrenzt werden. Offensichtlich verläuft die Transkription nicht vollständig, da die Verteilung dort sehr breit ist. Umgerechnet ergibt sich ein Abstand von etwa 55 Ångstrom.

Erklärt werden kann diese Diskrepanz zwischen struktureller Prognose und tatsächlichem Ergebnis anhand zweier Gründe, die in gewisser Weise aufeinander aufbauen. Einerseits spielt die bereits oft angesprochene freie Drehbarkeit der Farbstoffe eine große Rolle in der Bestimmung des Förster-Radius und damit der Umrechnung in reale Abstände. Durch das begrenzte Volumen im Inneren der Polymerase können die Farbstoffe nicht jede Orientierung annehmen, was die effektiv erzielbare FRET-Effizienz stark beeinflussen kann. Dies erklärt aber noch nicht die exakt gegensätzliche Entwicklung der Meßergebnisse im Vergleich zur strukturellen Prognose. Bedenkt man, daß die Orientierung der Farbstoffe nicht nur durch ein Volumen, in dem sie sich aufhalten, vorgegeben wird, sondern auch durch Interaktionen mit benachbarten Atomen bzw. Aminosäuren, dann liegt der Gedanke nicht fern, daß die Farbstoffe möglicherweise von der Umgebung stärker beeinflußt werden als durch relative Verschiebungen der Ankerpunkte an denen sie sich befinden. So wäre es durchaus vorstellbar, daß die Farbstoffe keine stufenlose Bewegung innerhalb der Polymerase durchlaufen, sondern an bevorzugten Positionen durch Wechselwirkungen stehen bleiben. Dies würde durch die Anbindung über eine Methylenkette vermutlich sogar begünstigt.

Der Gedanke liegt nahe, daß vorangehende Überlegungen anhand der Struktur der Transkriptionsblase wenig Informationsgehalt bieten. Genau aus diesem Grund liefert die Messung wertvolle Informationen und löst das Problem der Bewegungsrichtung selbst.

7.10.5.3. Rad26 am Konstrukt nb[tDNS(-10)-ntDNS(-7)]

Mit dem Experiment der Elongation war somit bekannt, welche FRET-Effizienz zu erwarten waren, wenn das Rad26 eine Verschiebung äquivalent zum Einbau von zwei Basen durchführt. Es war auch klar, daß die Vorhersage der zu erwarteten Distanzänderung kaum nützliche Informationen lieferten. Das heißt, die Methode der Wahl war der simple Vergleich des Produkts nach der Transkription mit demjenigen, welches nach Einfluß von Rad26 entstehen würde. Ähneln sich die Ergebnisse liegt der Verdacht nahe, daß das Rad26 in Elongationsrichtung schiebt, unterscheiden sie sich, erfolgt eine rückwärtsgerichtete Bewegung.

Die Zugabe des Rad26 in Anwesenheit von ATP zeigt eine deutlich veränderte Verteilung (Abb. 62)

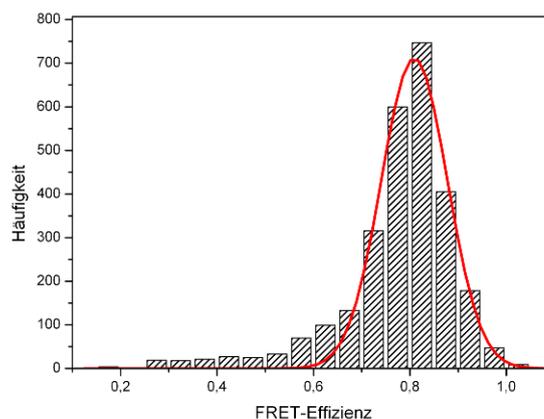


Abb. 62: Histogramm aller Werte der Einzelmolekül-FRET-Messungen am Konstrukt nb[tDNS(-10)-ntDNS(-7)] nach Vor-Inkubation mit Rad26 und ATP.

Das Histogramm kann mit Hilfe einer Gauß-Verteilung (rot) beschrieben werden. Das Maximum befindet sich bei 81 % und unterscheidet sich damit sowohl vom Ausgangszustand als auch vom Ergebnis der Elongation. Die Verschiebung durch das Rad26 findet rückwärtsgerichtet statt.

Das ehemals sehr breite Maximum bei 73 % verändert sich vollständig. Erstens steigt das Maximum auf 81 %, während zweitens die Breite der Verteilung von 22 % (Ausgangszustand, Abb. 61A) auf 13 % abnimmt. Dies ist immens im Vergleich zu allen vorher gezeigten Experimenten. Es entsteht auch keine Schulter wie bei den Experimenten mit Zugabe von Nukleotiden zur Transkription. Das könnte bedeuten, daß das Rad26 keinen Unterschied zwischen aktiven und nicht-aktiven Elongationskomplexen macht, was auch biologisch gesehen Sinn macht. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, daß das Rad26 zumindest eine Dynamik in den Intensitäts-Zeit-Spuren auslösen sollte, besonders für den Fall, daß keine Abstandsänderung eintritt. Womöglich ist es aber die Aufgabe des Rad26, stabil gebunden zu bleiben und die Polymerase in einer bestimmten Struktur zu fixieren, sei es um Zeit zu gewinnen bis zum Beispiel ein Transkriptionsfaktor wie TFIIS in der Lage ist, die fehlerhafte RNS zu kürzen, oder sei es damit die Polymerase als vollständig blockierter Komplex als Signal fungieren kann zur Rekrutierung anderer wichtiger Enzyme.

Es muß aber erwähnt werden, daß die Analyse dieser Messung eine Vielzahl an Molekülen lieferte, deren Akzeptor-Intensität stark schwankte, wie dies in Abb. 63 zu sehen ist. Diese Fluktuationen gingen soweit, daß der Akzeptor bei alternierender direkter Bestrahlung (ALEX) überhaupt nicht fluoreszierte. Da dies intervallartigen Charakter hatte, teilweise in Zeiträumen von 100 Millisekunden, teilweise auch bis zu einer Sekunde lang, sollte man von einer Art Blink-Verhalten ausgehen.

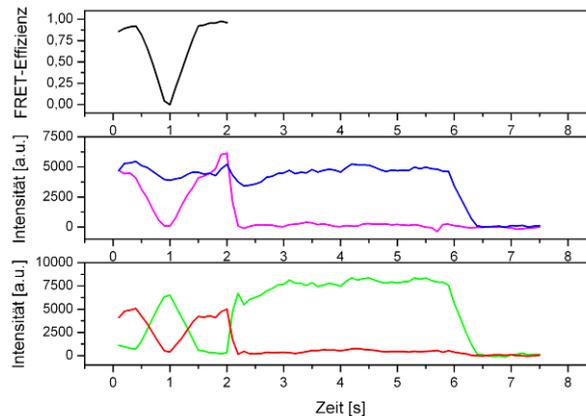


Abb. 63: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Zeit (unten und mitte) sowie der FRET-Effizienz (oben).

Starke Schwankungen in den Intensitäten des Akzeptors (rot) führen zu einer ebenso starken Variation der daraus errechneten FRET-Effizienz (schwarz). Die Gesamtintensität (blau) bleibt zwar relativ konstant, aber die Änderung der FRET-Effizienz beruht nur auf einem photophysikalischem Artefakt des Akzeptors. Nur die direkte Anregung (magentafarben) legt dies offen. Derartige Intensitäts-Zeitspuren müssen von der Analyse ausgenommen werden.

Diese Art der Schwankungen des Akzeptors führt natürlich zu einer dramatischen Verfälschung der Gesamtverteilung durch überproportionale Verstärkung sehr niedriger FRET-Effizienzen, weshalb derartige Moleküle nicht mit eingeschlossen wurden. Die Intensitäten des Akzeptors vor und nach einem solchen Blinken waren jedoch identisch. Es kann sich also nicht um den direkten Nachweis einer Verschiebung um eine Base handeln, da solche Sprünge nicht aus einem Niveau in ein anderes stattfanden. Vor und nach dem Blinken wiesen diese Moleküle meist eine FRET-Effizienz um 80 % auf, so daß auch hier keine Korrelation erstellt werden konnte.

Man sollte diese Moleküle aber nicht außer Acht lassen, zumal sich sowohl die Häufigkeit als auch die Dauer des Blinkens nach der Rad26 Zugabe deutlich steigerte. Es ist zwar offensichtlich, daß die FRET-Effizienz nicht aufgrund einer Abstandsänderung fällt. Dazu müßte eine Verschiebung um mindestens 20 - 25 Ångstrom stattfinden und zudem der Ausgangszustand innerhalb weniger Bruchteile einer Sekunde wiederhergestellt werden. Außerdem würde sich selbst eine so große Verschiebung nicht ausschließlich auf den Akzeptor auswirken. Wahrscheinlicher ist eine Konformationsänderung in der Art, daß der Akzeptor an der Position DNS(-10) in eine Umgebung gerät, in der seine Absorption vollstän-

dig gelöscht wird, da weder Energietransfer noch Photonenstrom zur Anregung in der Lage sind. Zwischenzeitlicher Kontakt mit einer Aminosäure könnte eine Ursache sein. Es kann deshalb nur wiederholt werden, wie wichtig es ist, die Aufnahme der Daten mit alternierender Anregungswellenlänge durchzuführen.

Die Experimente am Konstrukt nb[(tDNS(-10)-ntDNS(-7))] zeigen eindeutig, daß der Einfluß des Rad26 das Gegenteil der Transkription bewirkt. Selbst bei Vernachlässigung der Umrechnung in reale Abstände, kann festgestellt werden, daß die Transkription zu niedrigeren FRET-Effizienzen führt, während das Rad26 diese erhöht. Es wäre etwas zu weit gegriffen, dies alleine bereits als Beweis der Rückwärtsbewegung der Polymerase durch das Rad26 zu erachten. Daß jedoch eine Veränderung stattfindet, ist unumstritten.

Möglicherweise handelt es sich einfach um eine Konformationsänderung ohne Translokation. Dabei gilt es die Konformationsänderung als Mittel zur Freilegung einer Schadensstelle von einer möglichen Verschiebung abzugrenzen. Die ursprüngliche Hypothese der Verschiebung der Polymerase wurde gestützt durch Untersuchungen an TFIIS, das die bereits transkribierte DNS um bis zu 25 Basen weit freilegen konnte[113]. Nach dieser Definition unterschied auch die vorliegende Arbeit die Veränderungen voneinander. Eine Konformationsänderung betrifft aber nur die Grenzfläche zwischen RNS-Polymerase II und der Transkriptionsblase. Das Modellsystem der Elongationskomplexe als Reportersysteme funktioniert in diesem Zusammenhang nur, wenn bei reinen Konformationsänderungen auch die Transkriptionsblase davon betroffen wäre. Dies erscheint wahrscheinlich, bedenkt man die teilweise geringen, teilweise abgegrenzten Bewegungsfreiräume der Farbstoffe (Abb. 53). Veränderungen am Elongationskomplex nach Zugabe von Rad26 zeigten sich bereits in den Fluoreszenz-Anisotropien der verankerten Fluorophore (vgl. Kapitel 7.8.2). Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Farbstoffe in einer veränderten Struktur auch eine veränderte Umgebung vorfinden, die ihre Eigenschaften wie Quantenausbeute oder Fluoreszenz-Lebenszeit beeinflusst. Dies könnte auch die hier auftretenden Änderungen der FRET-Effizienzen erklären.

Man muß aber auch bedenken, daß eine Konformationsänderung zur Freilegung eines möglichen Schadens und zur Bindung von Reparaturenzymen einhergeht mit einer wesentlich größeren strukturellen Änderung der RNS-Polymerase als sie hier beobachtet werden konnte. Vieles spricht somit auf ein Binden des Rad26 zur Rekrutierung weiterer Enzyme, wobei es selbst eine leichte Änderung der Struktur der Polymerase hervorruft.

7.11. Zusammenfassender Überblick und Beurteilung der Hypothesen

Eines ist sicher, der Einsatz von Rad26 wirkt sich positiv auf die Elongation aus und erleichtert zum Teil die Reparatur des zu transkribierenden Strangs der DNS. Rad26 ist nötig, daß ein Schaden im zu transkribierenden Strang der DNS zeitnah repariert werden kann und nicht die RNS-Polymerase II soweit blockiert, daß unwiderruflich der Zelltod eintritt. Die Wissenschaftsgemeinde fragt sich aber seit seiner Entdeckung, wie es dazu in der Lage ist. Aufgrund der großen Homologie zwischen Rad26 und CSB werden wie in der Fragestellung zuvor, die übergreifenden Mechanismen verglichen.

Dabei geht man aber stillschweigend davon aus, daß das Rad26 völlig alleine agiert. Unterdessen gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß das Rad26 auf mechanistisch noch unbekannte Weise von anderen Proteinen ergänzt wird, insbesondere von Rad2, Rad7 und Rad16[3-10]. Zwar sind keine direkten Interaktionen des Rad26 oder seines menschlichen Homologs CSB mit diesen Proteinen bekannt, dennoch ist es durchaus möglich, daß das Rad26 mehr als nur eine Arbeitsweise besitzt. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nur das Rad26 alleine untersucht wurde, können die Ergebnisse auch nur diesen möglichen Teilbereich seines Mechanismus abdecken.

7.11.1. Auflösung des Elongationskomplexes

Schon eingangs dieser Arbeit wurde angedeutet, daß die bisher gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf Homologie zu TCRF wenige Gemeinsamkeiten ergaben[17]. Ebenso sprechen die Ergebnisse zu CSB eher gegen die Theorie, daß der Elongationskomplex aufgelöst wird. Daher verwundert es wenig, daß diese Hypothese von keinem Ergebnis in dieser Arbeit unterstützt wird. Insbesondere die Untersuchungen anhand der Gel-Retardation brachten keinerlei Hinweise, daß der Elongationskomplex in irgendeiner Weise destabilisiert würde. Weder stiegen die Konzentrationen an freien Nukleinsäuren, noch konnten Spaltprodukte nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die Anisotropie-Messungen keinen meßbaren Unterschied nach der Zugabe von Rad26. Lediglich die DNS scheint etwas mehr drehbar zu sein.

Im Prinzip geht diese Hypothese von der Abspaltung der gesamten Polymerase aus. Aber auch Experimente zur Abspaltung der weniger stark gebundenen Untereinheiten Rpb4/Rpb7 zeigten keine Abtrennung. Außerdem hätte jedes Einzelmolekül-Experiment stark beeinflusst werden müssen, insbesondere dann, wenn vorab der Immobilisierung inkubiert wurde. Nichts dergleichen wurde beobachtet.

7.11.2. Degradation durch Ubiquitinierung der Polymerase

Dieser Vorgang ist noch mehr als die Ablösung der Polymerase ein Weg, der wenig mit Reparatur gemein hat. Dies könnte auch nur als parallele Notlösung gesehen werden, für den Fall, daß der transkriptionsgekoppelte Reparaturmechanismus fehlschlägt, nicht aber als sein Bestandteil.

Für die Überprüfung dieser Hypothese fehlten dieser Arbeit wichtige Proteine wie Def1 oder Ubiquitin-Ligasen wie Rsp1 bzw. Rsp5. Def1 sollte beispielsweise im Komplex mit Rad26 auftreten und eben dann zur Ubiquitinierung führen, wenn der normale Reparaturvorgang durch das Rad26 zu langwierig wäre[78, 128]. Das Rad26 selbst ist weder zur Ubiquitinierung fähig noch funktioniert es als Signal für die Degradation der RNS-Polymerase. Daher konnte diese Hypothese auch nicht direkter Bestandteil dieser Arbeit sein, zumal nur die Aktivität des Rad26 alleine untersucht wurde.

7.11.3. Überspringen der Schadensstelle

Es ist bekannt, daß Polymerasen auch ohne Schaden relativ oft in einen pausierenden Modus verfallen, hauptsächlich zur Regulation der Genexpression[234, 235]. Da stellt sich natürlich die Frage, wie der transkriptionsgekoppelte Reparaturmechanismus spezifisch aktiviert werden sollte, wenn sich eine blockierte Polymerase kaum von einer pausierenden unterscheidet. Hier könnte eben das Rad26 bzw. das CSB eingreifen, indem es wie bereits gezeigt wurde, den Einbau eines weiteren Nukleotids durch die Polymerase stimuliert[90]. Man möchte zwar annehmen, daß diese Verbesserung der Elongation die allgemeine Notlage der Polymerase, also ihre Blockierung, sogar noch verschlimmert. Dies könnte aber genau das Schlüsselsignal sein, um weitere Reparaturenzyme zu rekrutieren.

Die vorgestellten Ergebnisse in dieser Arbeit legen besonders bei der Betrachtung der Einzelmolekül-Experimente zum Konstrukt nb[(tDNS(-10)-ntDNS(-7))] den Verdacht nahe, daß das Rad26 keine Bewegung in Elongationsrichtung bewirkt.

Sieht man sich den möglichen Effekt des Rad26 von einem rein energetischen Standpunkt aus an, so fällt auf, daß bereits eine Verschiebung um eine Base in Elongationsrichtung eine sehr große Energiemenge erfordert. Es stehen nämlich folgende Energiebeiträge nicht zur Verfügung. Erstens fehlt die Energie, die effektiv beim Einbau einer RNS-Base frei wird. Zweitens steht die Energie, die durch die Rehybridisierung der Transkriptionsblase gewonnen würde, nicht zur Verfügung. Drittens muß Energie aufgewendet werden für die Öffnung der DNS in Transkriptionsrichtung. In der folgenden Beispielrechnung wird der Einfachheit halber mit Energien für Desoxyribosen gerechnet[221, 236].

$\text{RNS}_n + \text{NTP} \rightarrow \text{RNS}_{n+1} + \text{PP}_i$	+ 46 kJ mol ⁻¹
Hybridisierungsenergie Heterodimer	+ 3.5 kJ mol ⁻¹
Hybridisierungsenergie upstream DNS	+ 3.5 kJ mol ⁻¹
Öffnung downstream DNS	+ 3.5 kJ mol ⁻¹
$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$	- 57 kJ mol ⁻¹
Summe:	- 0.5 kJ mol ⁻¹

Da alle Energien aufgebracht werden müssen und nicht freierwerden, ergibt sich eine Summe von 56.5 kJ mol⁻¹. Die Hydrolyse von ATP erbringt jedoch nur einen beinahe identischen Wert (54 - 60 kJ mol⁻¹)[222]. Vor allem der erste Beitrag muß vielleicht nicht in voller Höhe berechnet werden, aber wenn die RNS-Polymerase als ganzheitliche Maschine betrachtet wird, muß auch der Nichteinbau eines Nukleotids in Form einer abasischen Position registriert werden. Das Rad26 ist ja nicht in der Lage, die RNS-Polymerase in eine Helikase umzuwandeln. Daß also ein Weiterwandern in Elongationsrichtung zu einem sog. hypertranslocated state stattfinden würde, wäre extrem unwahrscheinlich.

Andererseits spricht das Fehlen beinahe jeglicher Dynamik in den Intensitäts-Zeit-Spuren dafür, daß ein Zustand von großer Stabilität entsteht. Wenn sich also die relative Distanz der verankerten Fluorophore geändert haben sollte, dann erstens in so geringem Maße, daß höchstens eine Bewegung um eine oder zumindest sehr wenige Basen hätte stattfinden können und zweitens definitiv nicht in Richtung der Elongation.

Einem Einsatz des TFIIS zusammen mit Rad26 widersprachen dagegen vorangegangene Untersuchungen, die keinen Effekt des TFIIS im transkriptions-gekoppelten Mechanismus sahen[118] bzw. sogar eine Inhibition durch das CSB / Rad26[90, 119].

Das Überspringen bzw. die Transkription über ein sperriges Dimers entlang der DNS in vivo wäre dagegen zweifelsfrei energetisch günstiger, da ein Nukleotid in die RNS eingebaut würde. Folglich könnte folgende Bilanz aufgestellt werden:

Öffnung downstream DNS	+ 3.5 kJ mol ⁻¹
Hybridisierungsenergie Heterodimer	+ 3.5 kJ mol ⁻¹
$\text{RNS}_n + \text{NTP} \rightarrow \text{RNS}_{n+1} + \text{PP}_i$	- 46 kJ mol ⁻¹
Hybridisierungsenergie upstream DNS	- 3.5 kJ mol ⁻¹
$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$	- 57 kJ mol ⁻¹
Summe:	- 99.5 kJ mol ⁻¹

Damit wäre genau doppelt soviel Energie vorhanden wie beim Einbau eines Nukleotids ohne vorhandenen Schaden frei würde. Diese Energie müßte dementsprechend zum Überspringen genutzt werden.

Man muß natürlich zugestehen, daß sämtliche Experimente ohne den Einsatz eines Defekts wie einem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer durchgeführt wurden. Auf der anderen Seite blockiert auch das Fehlen eines Nukleotids die Transkription. Genau hier konnte dementsprechend auch ein Effekt des Rad26 beobachtet werden, der aber im Vergleich zur Elonga-

tion genau umgekehrt ausfiel. Die Elongation mit zwei Nukleotiden führte zu deutlichen Populationen mit niedrigerer FRET-Effizienz als der des Ausgangszustands, während der Einsatz des Rad26 die FRET-Effizienz ansteigen ließ. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß das Rad26 allein durch die energetischen Verhältnisse seine Arbeit umkehrt.

7.11.4. Rückwärtsbewegung entgegen der Transkriptionsrichtung

Gestützt durch Erkenntnisse, daß Helikasen und helikase-ähnliche Proteine nicht nur zur Auftrennung doppelsträngiger DNS fähig sind, sondern insbesondere zur Verschiebung von Proteinkomplexen, vermutete man einen ähnlichen Effekt auch bei CSB und Rad26[120-122]. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen solchen Vorgang wäre die prozessive Translokation entlang der DNS.

In der vorliegenden Arbeit zeigen insbesondere die ATPase-Aktivitäten zwar Korrelation mit der Länge der vorgelegten DNS, aber keinen direkten Zusammenhang mit der Anzahl der Basen wie dies zu erwarten gewesen wäre. Als Alternative zur direkten Verschiebung waren auch Konformationsänderungen in der DNS im Gespräch, die das CSB beispielsweise durch Aufwickeln selbiger um sich herum einführen könnte[85]. Zwar wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Konformationsänderung und Ablösen der RNS-Polymerase angesprochen (Kapitel 2.8). Andererseits wäre es auch vorstellbar, daß die Polymerase mit einer Rückwärtsbewegung reagiert. Dazu ist zu sagen, daß im Prinzip bei einer Rückwärtsbewegung eines künstlich assemblierten Elongationskomplexes kein fester Startpunkt wie ein Promotor anvisiert würde. Die Polymerase müßte eine unbestimmte Anzahl an Basen zurückbewegt werden mit dem Effekt, daß am Ende der DNS der Komplex abfällt oder sich zumindest die Distanzen der Fluorophor-Paare drastisch verändern.

Keines von beiden konnte in dieser Arbeit beobachtet werden. Die gegenläufige Tendenz zur Elongationsrichtung ist nicht ausreichend, daß von einer Rückwärtsbewegung gesprochen werden sollte, zumal die Definition davon ausgeht, daß nicht nur eine oder zwei Basen zurückgewandert würde, sondern ein Dutzend oder mehr, genau wie es beim TFIIIS auch gesehen wurde[113]. Die Ergebnisse lassen es somit zu, eine Rückwärtsbewegung um mehr als zwei bis drei Basen auszuschließen.

7.11.5. Konformationsänderung des Elongationskomplexes

Es gibt zwei Varianten dieser Hypothese, in der einmal das Rad26 / CSB die Konformationsänderung selbst durchführt und einmal nur zur Rekrutierung und als Inhibitor eingesetzt wird. Bei letzterem stellt sich sofort die Frage, wozu das Protein dann über eine ausgeprägte ATPase-Aktivität verfügt. Auszuschließen ist es nicht, daß erst TFIIH die Schadensstelle freilegt, wahrscheinlich ist aber auch, daß CSB Vorarbeit leistet.

Anders als bei der bakteriellen Polymerase[185] konnte bei der verwendeten RNS-Polymerase II nur die ungünstig gelegene Untereinheit Rpb4/Rpb7 spezifisch mit Fluorophoren als Reporter-Moleküle markiert werden. Aussagekräftige Informationen über die Struktur oder die relative Position im Verhältnis zur DNS ließen sich so nicht erhalten. Es konnte somit nur auf die Transkriptionsblase als indirekten Reporter zurückgegriffen werden, der aber besser auf große Strukturänderungen reagieren kann.

Dieses Manko offenbart sich in den Messungen als wirkungsvolles Mittel, denn das Rad26 scheint keine dramatischen Veränderungen an der Polymerase zu bewirken. Viele RNS-DNS-Konstrukte, die für die Herstellung der Elongationskomplexe verwendet wurden, zeigten keinen meßbaren Unterschied durch die Zugabe des Enzyms. Nur mit einer Kombination konnte eine Veränderung aufgezeigt werden, die jedoch tendenziell entgegengesetzt zur Elongationsrichtung verlief. Die Anisotropiemessungen an RNS und DNS lieferten ebenfalls Hinweise auf Veränderungen der Umgebung des Farbstoffs an der DNS, die aber keinesfalls durch die Öffnung der Polymerase bzw. des aktiven Zentrums hätten begründet sein können. Die DNS war weiterhin fest gebunden.

Darüber hinaus konnte auch in den Einzelmolekülmessungen nie eine Dynamik beobachtet werden, die für ein Alleinagieren des Rad26 sprechen würde. Aus diesem Grund und wegen der niedrig ausfallenden Änderungen scheint die Umstrukturierung in Zusammenarbeit mit anderen Enzymen am wahrscheinlichsten. Das Rad26 alleine bewirkt jedenfalls noch keine drastische Konformationsänderung, die zur Freilegung einer möglichen Schadensstelle führt und wäre daher mit dieser Hypothese konform.

Abschließend muß festgestellt werden, daß kein unumstößlicher Nachweis geführt werden konnte, daß das Rad26 eine Rückwärtsbewegung der RNS-Polymerase II bewirkt. Eine dramatische Verschiebung um mehrere Nukleotide kann definitiv ausgeschlossen werden. Bedenkt man jedoch, daß das Rad26 nicht alleine agiert, sondern durch eine Vielzahl an anderen Enzymen komplettiert wird, dann weist dies vielmehr darauf hin, daß nicht unbedingt die eleganteste Methode verwendet wird. Zwar würde auf diesem Weg durch ein einzelnes Enzym die Schadensstelle freigelegt, aber genau dies birgt auch gleichzeitig Gefahren. Mutationen, die zu seiner Desaktivierung führen, müssen letal sein, denn die Arbeit des Proteins kann nicht einmal zu einem geringen Anteil von einem anderen übernommen

werden. Genau das ist aber zumindest bei Hefen der Fall. In Mutanten ohne Rad26 ist die transkriptionsgekoppelte Reparatur nicht vollständig unterbunden[65]. Dies untermauert die Vorstellung, daß das Rad26 nicht das allumfassende Enzym darstellt, das universell sowohl zur Translokation und zur Verschiebung der Polymerase wie auch zur Rekrutierung weiterer Proteine fähig ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen mit Sicherheit auf einen stabilen, aber nicht sehr veränderten Komplex hin. Möglicherweise handelt es sich ganz simpel um eine Art Festkeilen der Polymerase an ihrem momentanen Standort. Damit wäre zum einen die intrinsische Rückwärtsbewegung gehemmt. Zum anderen würde die Polymerase nicht kontinuierlich auf die Wiederaufnahme der Transkription zusteuern, nur um sofort erneut blockiert zu werden.

Zukünftige Experimente müssen den Mechanismus der Konformationsänderung noch näher beleuchten. Wenn dies durch relative Änderungen im Verhältnis zum RNS-DNS-Konstrukt geschieht, wäre eine spezifische Markierung der RNS-Polymerase II mit Farbstoffen unerlässlich. Auch wenn sensitiv reagierende Konstrukte eingesetzt würden, sollten dennoch Anstrengungen unternommen werden im Hinblick auf eine genauere Bestimmung der möglichen Positionen des Farbstoffs innerhalb der Polymerase. Eine computergestützte Simulation könnte hierbei große Fortschritte erzielen. Trotzdem ermöglicht das System der durchgehend komplementären DNS-Konstrukte durch die einfache Zugabe von Nukleotiden die Elongationsrichtung mit dem Effekt des Rad26 zu vergleichen.

8. Terrylen-Diimid-Farbstoff

Zur Untersuchung biologischer Systeme wird seit einigen Jahren vermehrt die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Aber gerade diese Messungen benötigen Farbstoffe, die spezielle Eigenschaften besitzen. Generell wird die Qualität von Fluoreszenz-Messungen durch den verwendeten Farbstoff limitiert. Besonders die Anzahl an emittierten Photonen begrenzt das Verhältnis von Signal zu Rauschen erheblich. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie im besonderen kann jedoch nur dann ihre Vorteile, wie die Möglichkeit dynamische Prozesse zu beobachten, ausspielen, wenn der eingesetzte Farbstoff beispielsweise hell und lange genug leuchtet und so über seine Umgebung berichten kann. Dann erst kann z. B. seine exakte Position lokalisiert oder seine Trajektorie verfolgt werden.

Meist emittieren Farbstoffe aber nur über einen sehr kurzen Zeitraum bis sie unwiederbringlich bleichen. Damit werden auch die Datenmenge und die Informationen, die daraus gewonnen werden können, stark eingeschränkt. Im Hinblick auf biologische Systeme sollte der Farbstoff obendrein wasserlöslich sein und ein langwelliges Emissionsspektrum besitzen, um den Hintergrund auf ein Minimum zu begrenzen.

8.1. Aufgabenstellung

Mit diesem Vorwissen sollten Untersuchungen an wasserlöslichem Terrylendiimid (WS-TDI) durchgeführt werden, das als geeigneter Kandidat erschien, die geforderten Bedingungen zu erfüllen. WS-TDI ist ausgesprochen stabil, sowohl chemisch wie auch photophysikalisch betrachtet und verfügt über ein langwelliges Emissionsspektrum[237, 238]. Bisher existieren jedoch nur wenige Daten zu biologischen Applikationen.

Nukleinsäuren werden oft, so auch in dieser Arbeit, als Substrate für Enzyme eingesetzt, um z.B. Bindungskonstanten zu bestimmen. Da ihre Struktur im Komplex mit Proteinen oft bekannt ist, können sie auch als Ankerpunkte für Farbstoffe dienen, um wie gezeigt Distanzmessungen durchzuführen. Aber auch ihre Struktur selbst ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen bei denen oft Farbstoffe als Reporter-Moleküle eingesetzt werden.

8.2. Kopplung von WS-TDI an DNS

Die chemische Anbindung erfolgte nach bekannter Vorschrift, die auch namhafte kommerzielle Hersteller wie IBA oder Atto-Tec veröffentlichen[239]. Zur Anbindung des WS-TDI an DNS wurde ein Derivat mit N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS) verwendet, das die gängigste Variante darstellt, einen Farbstoff sequenzspezifisch und kovalent an die DNS zu binden[240]. Als Substrat für die Kopplung des WS-TDI wurde eine einzelsträngige DNS mit frei zugänglicher Amingruppe an einer modifizierten Base eingesetzt.

Die DNS wurde mit einem zehnfachen molaren Überschuß an WS-TDI-NHS in einem leicht alkalischen, wäßrigen Puffer (pH 8.5) umgesetzt. Zur Optimierung der Ausbeute wurde die Temperatur auf 50 °C erhöht. Zur Aufreinigung wurde die Präzipitation der DNS mit Ethanol gewählt. Die Ausbeute der Markierung betrug etwa 30 %, was jedoch auch andere kommerziell erhältliche Farbstoffe nicht übertreffen, wie Experimente beispielsweise mit Atto647 (28 %) zeigten. Die Markierungseffizienzen wurden spektrometrisch anhand der Absorption des Proteins und der Farbstoffe bestimmt (siehe Kapitel A.4). Die Rückgewinnung der DNS betrug nicht weniger als 90 %. Eine abschließende Gel-Chromatographie wurde benutzt, um das Reaktionsgemisch vollständig von freiem Farbstoff (Nachweisgrenze der Absorption: 0.02) zu befreien.

Um unspezifische Anlagerung des Farbstoffs an die DNS auszuschließen, wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt mit DNS ohne entsprechender Amingruppe. Die Markierungseffizienz war unter 3 %, damit negativ und in dieser Hinsicht zufriedenstellend. Vorangegangene Experimente zur Anbindung an Proteine waren diesbezüglich durchweg problematisch. Das WS-TDI als Maleimid-Derivat führte dabei zu hohen Markierungseffizienzen, obwohl die Proteine über keine oder zumindest nicht über freie Thiolgruppen verfügten.

Die Präzipitation mit Ethanol ist eine sehr gängige Aufreinigungsmethode, im vorliegenden Fall wies sie noch einen zusätzlichen Vorteil auf. Bei der Zugabe unverdünnten Ethanols präzipitiert DNS für gewöhnlich. Der Farbstoff WS-TDI dagegen, obwohl er sehr gut wasserlöslich ist, wird aufgrund seines stark hydrophoben Kerns besser in der ethanolischen Lösung gehalten. Außerdem liegt in ethanolischer Lösung das WS-TDI als Monomer vor und bildet keine Aggregate. Daher wurden etwaige Multimere, die sich an der DNS befanden, abgetrennt, worauf nur einzelne gebundene Moleküle zurückblieben. Eine weitergehende Aufreinigung als über Size-Exclusion-Chromatographie war nicht nötig, da die DNS ohne WS-TDI nicht fluoreszent war und weitergehende Messungen nicht beeinträchtigte. Das Oligomer mit gekoppeltem WS-TDI wurde nämlich mit seinem komplementären Strang hybridisiert, der zur spezifischen Immobilisierung auf einer Oberfläche diente.

Auf Einzelmolekül-Niveau sollten dann doppelt-markierte Moleküle durch Kollokalisierung der beiden spektral getrennten Signale identifiziert werden (vgl. Kapitel 8.2.2). Weniger erfreulich ist jedoch die Erkenntnis, daß das an DNS kovalent gekoppelte WS-TDI nach der Aufreinigung erneut Aggregate bildete, deutlich zu erkennen im Absorptionsspektrum (Abb. 64)

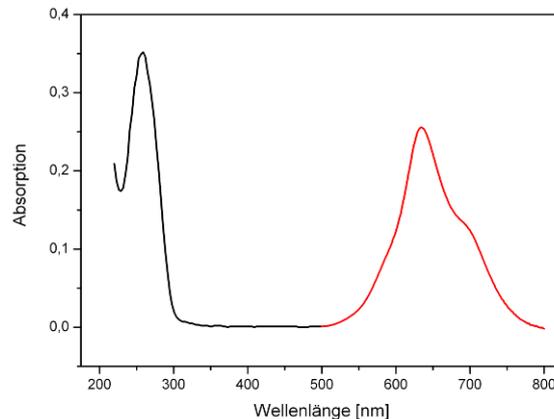


Abb. 64: Darstellung des Absorptionsspektrums von DNS mit gekoppeltem WS-TDI.

Deutlich zu erkennen ist das sehr breite Spektrum von TDI bei 635 nm mit einer kleinen Schulter bei 690 nm. Dies deutet auf die typische Bildung von H-Aggregaten hin. Das Spektrum der DNS (220 nm - 500 nm) wurde um den Faktor 100 nach unten skaliert.

Es zeigt sich die für H-Aggregate typische Form des Spektrums mit einem breiten Maximum bei etwa 635 nm und einer im Gegensatz zum Monomer verringerten Schulter um 690 nm. Normalerweise sollte das Spektrum invertiert vorliegen, also ein deutliches Maximum bei 690 nm besitzen. Das Spektrum der DNS (220 nm - 500 nm) wurde zum besseren Vergleich um den Faktor 100 nach unten skaliert. Bestätigt wird dieses Verhalten durch Messungen mittels Gel-Elektrophorese, bei denen ebenso Aggregate auftreten.

8.2.1. Analyse der Kopplung über Gelelektrophorese

Die DNS wurde nach der Hybridisierung mit ihrem komplementären Gegenstrang, der selbst mit Atto532 markiert war, auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel (5 %) analysiert und mit einem Gelscanner (Typhoon 9400, Amersham Biosciences) visualisiert (Abb. 65). Die Anregung fand bei 532 nm für Atto 532 und bei 633 nm für WS-TDI statt. Die Detektion lieferte wahlweise Bilder des Gels in Falschfarben oder in Monochrom. Werden Falschfarben gewählt, können beide spektralen Bereiche überlappt werden, d.h. Proben, die bei beiden Anregungswellenlängen fluoreszieren, erhalten die Mischfarbe orange. Liegt nur eine von beiden Fluoreszenzen vor, erscheint die Detektion entsprechend in grün (532 nm) bzw. rot (633 nm).

Vorab muß erwähnt werden, daß die gezeigten Bilder künstlich angepaßt wurden, um zwar die größtmögliche Sensitivität zu erreichen, aber die hellsten Bereiche nicht in Sättigung zu bringen. Die Aufnahmen fanden mit Parametern (PMT-Spannung < 750 Volt) statt,

die eine Sättigung oder Übersteuerung definitiv ausschlossen. Zudem wurde dies visuell bei der Aufnahme bestätigt. Es wurden aber auch gezielt Aufnahmen mit größtmöglicher Sensitivität (PMT > 850 V) erstellt, die aber keinen Unterschied zu den gezeigten Resultaten ergaben.

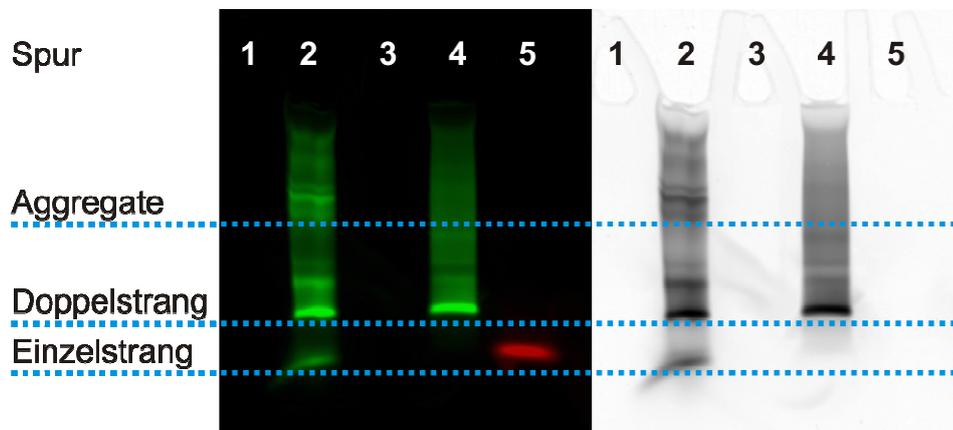


Abb. 65: Darstellung eines Polyacrylamid-Gels (5 %) zur Analyse der DNS mit gekoppeltem WS-TDI.

*Links: Fluoreszenz 570 nm + 670 nm, falschfarben, Rechts: Fluoreszenz 570 nm, monochrom
Spur 2 beinhaltet hybridisierten Doppelstrang mit Atto532 + WS-TDI in stöchiometrischem Verhältnis. In Spur 4 befindet sich Doppelstrang im Verhältnis 1:10 (Atto532-Strang:WS-TDI-Strang). In Spur 3 befindet sich Einzelstrang mit WS-TDI, in Spur 5 freier WS-TDI in ethanolischer Lösung (10-fach konzentriert). Nur bei Überschuss von TDI-Strang liegt ausschließlich hybridisierte DNS vor (Spur 4 vs. Spur 2). Daneben kommen bei beiden Proben Aggregate mit langsamerer Migration vor. TDI kann nur als freier Farbstoff und bei hoher Konzentration (Spur 5) detektiert werden. An DNS gebunden (Spur 2 - 4) ist keine Fluoreszenz zu erkennen. Spur 1 beinhaltet Referenzgrößen, die nach Bindung mit Interkalator detektiert werden konnten.*

In der zweiten und vierten Spur (Abb. 65) lief das hybridisierte Oligomer mit seinem komplementären Gegenstück, das mit Atto532 markiert war. In Spur 2 war eine stöchiometrische Mischung aus beiden DNS-Strängen, in Spur 4 dagegen eine Mischung im Verhältnis 1:10 Atto532-ssDNS:WS-TDI-ssDNS. Man sieht, daß im ersten Fall einzelsträngiges Oligomer unterhalb der hellsten Bande zu sehen ist (Einzelstrang). Das Hybrid läuft darüber (Doppelstrang), wobei noch zahlreiche andere relativ definierte Banden in Erscheinung treten (Aggregate). In Spur 4 dagegen sieht man nur eine definierte Bande sowie einen Schweif, aber keine schneller laufende Bande. In Spur 3 (Abb. 65, links) lief einzelsträngige DNS mit gekoppeltem WS-TDI, der aber selbst bei größtmöglicher Sensitivität nicht detektiert werden konnte. In Spur 5 (Abb. 65, links) befand sich als Referenz der in Ethanol gelöste, ungebundene Farbstoff in einer 10-fach höheren Konzentration (50 μ M) als die restlichen Proben, um sicherzustellen, daß seine Fluoreszenz überhaupt zu detektieren war. Die Hybridisierung verlief bei stöchiometrischen Verhältnissen nicht vollständig, zu erkennen an noch frei vorliegendem Einzelstrang (Spur 2). Erst bei zehnfachem Überschuss von WS-TDI-gekoppeltem Strang wurden alle Atto532-gebundenen Stränge hybridisiert. Dies deutet bereits auf eine schlechte Erreichbarkeit bzw. sterische Behinderung der WS-TDI-gekoppelten Stränge hin. Bei beiden eingesetzten Verhältnissen müssen außerdem Kon-

strukturen entstanden sein, die eine nur stark verminderte Migration im Gel zuließen. Dies deutet zusammengefaßt sehr auf eine Aggregation des WS-TDI hin, wie schon das Absorptionsspektrum anzeigte (Abb. 64).

Aggregate weisen keine Fluoreszenz auf, weshalb es nicht verwundert, daß in keiner Spur, außer dort wo freier Farbstoff in ethanolischer Lösung eingesetzt wurde (Spur 5), WS-TDI detektiert werden konnte. Selbst die Anpassung auf äußerst sensitive Detektion zeigte keinerlei Fluoreszenz von WS-TDI. Natürlich könnte argumentiert werden, daß die eingesetzte Probe nur eine Markierungseffizienz von 30 % aufwies. Der Einsatz von zehnmal mehr DNS in Spur 4 hätte die effektive Konzentration von WS-TDI dann aber verdreifacht. Zusammen mit dem knapp fünffach geringeren Extinktionskoeffizienten von WS-TDI (ϵ : $24.500 M^{-1}cm$) im Vergleich zu Atto 532 (ϵ : $115.000 M^{-1}cm$) hätte dies die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine Bande zu sehen. Die Migrationsfront von freiem WS-TDI (Spur 5) läßt vermuten, daß daran gekoppelte DNS (Spur 3) bei etwa ähnlicher Laufweite hätte detektiert werden sollen. Um zu verhindern, daß der freie Farbstoff selbst in Form von Aggregaten vorlag, wurde eine ethanolische Lösung für die Elektrophorese verwendet. Dies erzeugt zwar eine scharfe Bande, die Migration könnte jedoch aufgrund des Lösemittels im Vergleich zu den anderen Proben verändert worden sein.

Ein Blick auf die DNS, die nachträglich mit Interkalator sichtbar gemacht wurde, offenbarte sodann auch die zuvor nicht sichtbare Spur 3. Das einzelsträngige Oligomer mit gebundenem WS-TDI konnte detektiert werden, das aber zuvor in der direkten Bestrahlung mit Licht roter Wellenlänge überhaupt nicht fluoreszierte. Durch die zur Größenabschätzung in Spur 1 verwendete Referenz konnten abermals die enormen Unterschiede der Laufweiten der Aggregate aufgezeigt werden.

Experimente mit Detergenzien wie Pluronic 123 konnten nicht analysiert werden, da Lösungen mit 10 Gew.-% nicht kompatibel mit der Gelelektrophorese waren.

Zusammenfassend zeigen beide Analysen zwar die grundsätzliche Möglichkeit der Anbindung des Farbstoffs WS-TDI an DNS. Die Gelelektrophorese führt aber deutlich die Probleme vor Augen, die aufgrund der Aggregation des Farbstoffs entstehen. Sie bietet aber auch gleichzeitig die Methode, gezielt Banden bzw. Populationen aus einem derartigen Gemisch zu isolieren. Dennoch muß geklärt werden, ob nicht andere Derivate des Farbstoffs mit niedrigerer Tendenz zur Aggregatbildung besser geeignet wären. Pyridoxy-Derivate lieferten hierzu bereits interessante Ergebnisse[241].

Ob Experimente mit doppelsträngiger DNS durchgeführt werden konnten, sollten Experimente auf Einzelmolekül-Ebene klären, die auch den Einfluß der Kopplung auf die Photochemie näher untersuchen sollten.

8.2.2. Analyse der Kopplung über Co-Lokalisation

Obwohl bei der Überprüfung der Anbindung des WS-TDI an die DNS festgestellt werden mußte, daß trotz der besseren Wasserlöslichkeit noch immer Aggregate gebildet wurden, sollten Kolokalisationsexperimente mit Hilfe der Einzelmolekül-Mikroskopie endgültige Klarheit über die erfolgreiche Funktionalisierung bringen.

Wie Berechnungen im Zusammenhang mit Rad26 und RNS-Polymerase II ergeben hatten (Kapitel 7.7.2) liegt die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Moleküle unabhängig voneinander die gleiche Position einnehmen, unterhalb 2 %. Mit diesem Vorwissen wurden Experimente am TIRF-Mikroskop durchgeführt, das im Rahmen dieser Arbeit entworfen wurde. Nach der Hybridisierung mit Atto532 markiertem komplementärem Gegenstrang (70 Basen) wurde das nun doppelsträngige Oligomer auf einer Oberfläche immobilisiert, um 2-Farben-Fluoreszenz-Experimente durchzuführen. Wie bei der Analyse über Gelelektrophore, wurde auch hier ein zehnfacher Überschuß an WS-TDI-gekoppelter DNS eingesetzt, um jeden Atto532-Strang vollständig zu hybridisieren. Dies war wichtig, da sich dort gleichzeitig die Biotin-Gruppe zur Immobilisierung befand. Ein invertiertes Verhältnis hätte zwar die Wahrscheinlichkeit erhöht, alle WS-TDI-Stränge zu hybridisieren. Die Absolutzahl an immobilisierten einzelsträngigen Atto532-Strängen hätte um einen Faktor 9 überwogen.

Die Immobilisierung sowie die Messungen mit alternierender Anregungswellenlänge verliefen erfolgreich. Die Analyse lieferte jedoch das gleiche Bild wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde. FRET zwischen den beiden Fluorophoren konnte nicht beobachtet werden, da aufgrund des hohen Abstands von 26 Basen selbst im Idealfall nur eine FRET-Effizienz von maximal 15 % zu erwarten gewesen wäre. Eine typische Intensitäts-Zeitspur ist in Abb. 66 zu sehen.

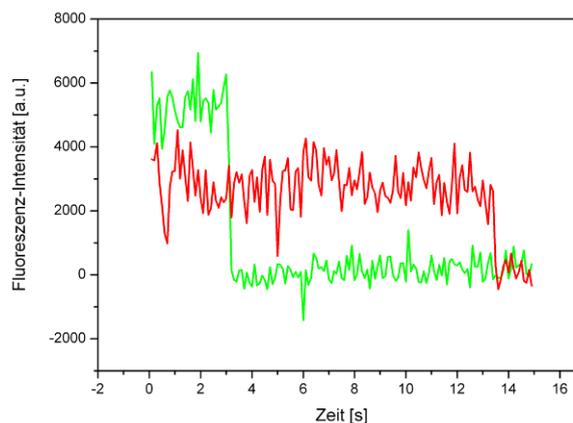


Abb. 66: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit.

Atto 532 (grün) fluoresziert heller, lebt aber vergleichsweise kurz und bleicht nach 3 Sekunden. Wesentlich länger lebt im Vergleich dazu WS-TDI (rot), bis es nach 13.3 Sekunden bleicht, obwohl es mit 5-fach höherer Leistungsdichte angeregt ($10 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$) wurde. Eine Korrektur der Detektionseffizienz wurde nicht durchgeführt.

Obwohl Atto532 (grüne Kurve) sehr photostabil ist, blüht er im Durchschnitt immer vor WS-TDI, hier bereits nach etwa drei Sekunden. Das WS-TDI (rote Kurve) hingegen lebte außerordentlich lange, auch oft mehr als 10 Sekunden, leuchtete dafür nicht so hell. Die Intensitäten wurden nicht um die Detektionseffizienz des Aufbaus korrigiert. Die Anregungsintensität bei der Wellenlänge 637 nm war jedoch 5 Mal größer ($10 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$) im Vergleich zu Atto 532. Als Erklärung mag der generell niedrige Extinktionskoeffizient dienen. Weiterhin ist ersichtlich, daß die Bleichschritte nur eine Stufe aufweisen, was charakteristisch ist für Einzelmolekül-Fluoreszenz. Prinzipiell weist dieses Ergebnis die erfolgreiche Anbindung des Farbstoffs an die DNS nach.

Die quantitative Auswertung führt jedoch zu einem erstaunlichen Ergebnis. Nur etwa 4 - 5 % aller fluoreszierenden Atto 532 Signale wiesen einen komplementären Partner im entsprechenden Fluoreszenzkanal des WS-TDI auf. Damit liegt der Wert zwar noch überhalb einer rein statistisch auftretenden Kollokalisierung von etwa 1 - 2 % (vgl. Kapitel 7.7.2). Bei einer Markierungseffizienz von 30 % müßten aber auch ebenso viele kollokalisierenden Signale auftreten. Das kann drei Gründe haben. Zum einen könnte der Atto532-Strang überhaupt nicht hybridisiert vorgelegen haben, was aber aufgrund des eingesetzten Überschusses an WS-TDI Strang unwahrscheinlich ist. Zum anderen war er möglicherweise hybridisiert, aber der Farbstoff lag gleichzeitig als Aggregat vor und fluoreszierte nicht. Die dritte Möglichkeit wäre, daß aggregierte WS-TDI Moleküle die Hybridisierung behindern und so bei einer Markierungseffizienz unter 100 % nicht-markierte DNS-Stränge bevorzugt binden. Unabhängig davon ist dieses Ergebnis für Experimente mit doppelt-markierter DNS mehr als unbefriedigend. Andererseits ist aber erstaunlich, wie groß die Bindungskräfte innerhalb der Aggregate sein müssen, um die Hybridisierung einer doppelsträngigen DNS mit einer Länge von 70 Basen zu beeinträchtigen.

Nach momentaner Lage können dagegen Experimente mit einzelsträngiger DNS und gebundenem WS-TDI durchaus durchgeführt werden.

8.3. Zusammenfassung

Weiterführende Untersuchungen bestätigten die generellen Vorteile, wie hohe Leuchtkraft und Photostabilität des WS-TDI, wonach die Eigenschaften von beispielsweise Atto647N bei weitem übertroffen werden[241]. Der Vergleich der emittierten Photonen zeigt, daß obwohl Atto647N im Durchschnitt genauso lange lebt, nur etwa ein Drittel der Photonen während dieser Zeit emittiert. Hauptgrund ist das Blinkverhalten von Atto647N, das sehr oft Phasen ohne Fluoreszenz durchläuft, während WS-TDI stabile Intensitäten liefert.

Jedoch muß der Unterschied zu den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erörtert werden. Das überragende Verhalten von WS-TDI konnte in wäßriger Lösung nicht nachvollzogen werden, was die Vermutung nahe legt, daß die völlig andere Umgebung in PVA dafür verantwortlich ist. Erstens fluoreszierte WS-TDI mit vielfach niedrigerer Fluoreszenz-Intensität im Vergleich zu allen vergleichbaren langwelligen Farbstoffen wie Atto647N, Cy5 oder Alexa647. Dies mag an den etwa 10 - 15-fach höheren Extinktionskoeffizienten liegen. Zweitens wurden viele Intensitäts-Zeitspuren beobachtet, die weitaus mehr Rauschen aufwiesen als Abb. 66 zeigt. Vor allem waren Schwankungen bei WS-TDI zu erkennen, die von den Dimensionen her mehr an Blinken erinnerten. Auch dies steht in Widerspruch zu Ergebnissen, die in PVA-Umgebung erzielt wurden. Dort befindet sich das WS-TDI durchschnittlich 2.8 Sekunden lang in einem fluoreszenten Zustand, während Atto647N nur 0.2 Sekunden fluoresziert. Das hieße, daß bei Atto647N extrem starke Schwankungen bzw. Rauschen auftreten müßten, während bei WS-TDI viel längere stabile Phasen zu sehen wären. Das Gegenteil war jedoch bei Messungen am TIRF-Mikroskop der Fall, wobei sich Probleme im Aufbau automatisch selbst ausschließen, angesichts des genau umgekehrten Verhaltens von Atto647N. Möglich ist, daß dies auf die Umgebung der Farbstoffe zurückzuführen ist.

Daß das WS-TDI generell zur Aggregation neigt, ist unbestreitbar. Andererseits bietet dieses scheinbare Artefakt nicht zwingend einen Nachteil, da das Hintergrundsignal nicht beeinflußt wird. Weitergehende Versuche besonders mit vielversprechenden Kandidaten wie dem Pyridoxy-Derivat könnten dieses Problem lösen. Der generellen Anbindung an biologische Moleküle wie DNS steht zumindest nichts im Wege.

9. Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse

Messungen auf Einzelmolekül-Niveau bieten generell die Möglichkeit anhand des Intensitätsverlaufs der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit, die Stöchiometrie bzw. die Anzahl der vorhandenen Fluorophore zu bestimmen. Liegen viele Moleküle vor, so kann nur eine exponentiell abfallende Kurve beobachtet werden als Einhüllende der Bleichschritte aller einzelnen Moleküle. Durch die große Verdünnung bzw. bei den niedrigen Konzentrationen, die verwendet werden, um wenige oder einzelne Moleküle zu detektieren, können dementsprechend auch einzelne Schritte des Bleichens verfolgt werden. Das Bleichen wird in diesem Zusammenhang gesehen als irreversibles Auslöschen der Fluoreszenz durch unbestimmte photophysikalische oder chemische Prozesse.

In der Praxis können aufgrund der begrenzten Dynamik der Detektion auf der einen Seite und einer erforderlichen Mindestintensität des Signals auf der anderen Seite maximal 5 - 8 Schritte unabhängig voneinander bestimmt werden. Dies ist meist weniger interessant, wenn es nur um den bloßen zeitlichen Verlauf geht und die entsprechenden Verhältnisse der Intensitäten. Vielmehr wird diese Möglichkeit dazu genutzt, die Stöchiometrie von Komplexen auf einfache Weise zu bestimmen[242].

Viele Komplexe sind nur *in vivo* zugänglich und erlauben es daher nicht, sie aus ihrer Umgebung zu entnehmen, ohne sie entscheidend zu beeinflussen. Die kovalente Markierung mit synthetischen Farbstoffen ist ohnehin praktisch ausgeschlossen, da sie weder quantitativ noch spezifisch genug durchgeführt werden kann. So können Membran gebundene Proteine, die oft als Multimere existieren, am besten in lebenden Zellmembranen untersucht werden, zumal gleichzeitig durch die Fusionierung mit fluoreszenten Proteinen wie GFP eine gezielte quantitative Methode zur Markierung eingesetzt werden kann[243]. Auch bei *in vitro* Experimenten bietet sich die Fusionierung mit Fluoreszenz-Proteinen an, häufig aufgrund der Größe der Komplexe und der damit verbundenen Schwierigkeit der spezifischen Markierung. Natürlich geht die Verwendung von GFP auch mit einigen Nachteilen einher. Synthetische Fluorophore müssen sich im Gegensatz zu fluoreszenten Proteinen nicht erst ordnungsgemäß falten, um in den aktiven Zustand zu gelangen. Zwar kennt man auch bei organischen Farbstoffen beispielsweise die Isomerisierung, bei dem im schlimmsten Fall eines der Isomere nicht-fluoreszent ist. Dies existiert aber nicht dauerhaft

nebenher, da man die Synthese entsprechend anpassen würde, sondern höchstens temporär bedingt durch photophysikalische Effekte. Auf die Faltung eines Proteins in vivo läßt sich hingegen viel weniger Einfluß ausüben, wobei sich durch Aufreinigungsmethoden noch nicht einmal der Anteil entfernen läßt, der nicht fluoresziert. So sind 20 - 30 % nicht-aktiver Anteil bei GFP keine Seltenheit[243].

Trotzdem ermöglicht die Bestimmung stöchiometrischer Verhältnisse weitreichende Applikationen, besonders bei biologischen Systemen, die zwar in vitro zugänglich sind, jedoch nicht über zielgerichtete Mutagenese für eine spezifische Markierung verändert werden können. Hierzu zählen große Proteinkomplexe wie beispielsweise Ribosomen oder Membranproteine.

9.1. Aufgabenstellung

Im Prinzip bedarf die Analyse der Bleichschritte einzelner Fluorophore keiner aufwendigen Methode. Im einfachsten Fall läßt sich deren Anzahl manuell bestimmen. Leider ist dies ein sehr zeitraubender Prozeß und benötigt einen aufmerksamen Benutzer. Eine automatische Analyse hingegen umgeht diese Nachteile und bietet gleichzeitig die Möglichkeit, wesentlich größere Datenmengen mit gleichbleibenden Kriterien zu untersuchen. Für eine repräsentative Aussage bezüglich der Probe ist dies unerlässlich.

Folglich ist ein automatisches Auswerteprogramm zur Analyse von Bleichschritten sehr nützlich, weshalb sich ein Teil dieser Arbeit abschließend darauf konzentrierte.

9.2. Computergestützte Suche nach Bleichschritten

Es wurde ein automatisches Auswerteprogramm zur Analyse von Bleichschritten entwickelt, das ähnlich des FRET-Analyseprogramms nach der Extraktion der Signalintensitäten aus einem Meßvideo ansetzt.

Das grundlegende Prinzip besteht darin, die Position der Stufen, die durch das Bleichen entstehen, zu detektieren (Abb. 67). Im ersten Schritt müssen also alle Schwankungen, die ebenfalls als Stufe interpretiert werden könnten, beseitigt werden. Insbesondere das Rauschen des Signals nach dem vollständigen Bleichen muß begrenzt werden, aber auch Intensitätsschwankungen während der Fluoreszenz sind auszugleichen. Andererseits dürfen große Sprünge bzw. scharfe Kanten, wie sie beim Bleichen auftreten, nicht verändert werden. Die größte Schwierigkeit offenbart sich bei kleinen relativen Intensitätsunterschieden in Folge eines Bleichschritts. Ein ungeeigneter Filter glättet nicht nur Schwankungen auf-

grund photophysikalischer Effekte innerhalb des Fluoreszenzintervalls, sondern auch den Schritt selbst und liefert ein stetiges Abfallen zum nächsten niedrigeren Niveau. Dies wird sich insgesamt nachteilig auswirken auf das automatische Herausfinden dieser Stufen, da zwei benachbarte Intensitäten zu einer gemeinsamen zusammengefaßt würden.

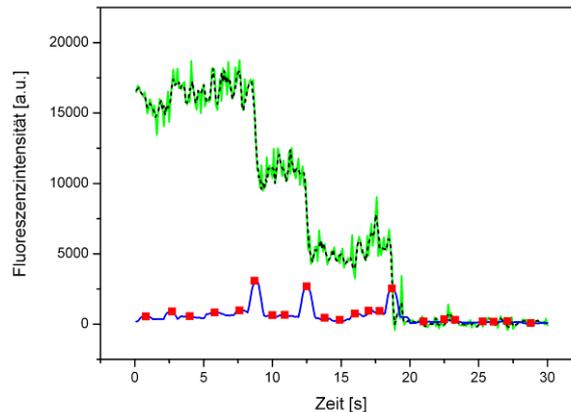


Abb. 67: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit.

Die ursprünglichen Daten (grün) werden gefiltert (gleitender Durchschnitt, Filterbreite 5, schwarz) und abschnittsweise nach Änderungen der Standardabweichung (blau) abgerastert. Die Standardabweichung zeigt die größten Veränderungen an den drei Bleichschritten (8.8 s, 12.5 s, 18.7 s). Es werden aber viele weitere potentielle Punkte des Bleichens gefunden (rot), die aussortiert werden müssen.

Zu diesem Zweck wird die gesamte Intensitäts-Zeitspur (Abb. 67, grün) mit Hilfe eines Filters, der auf der Berechnung des gleitenden Durchschnitts basiert, geglättet. Als passend erwies sich der „rlowess“-Filters (Abb. 67, schwarz), bei dem die Regression über die Beschreibung der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe eines Polynoms 1. Grades stattfindet, wobei Ausreißer weniger stark gewichtet werden. Als Filterbreite bewährte sich ein Wert von 5.

Als zweites wird die Standardabweichung der Kurve abschnittsweise berechnet und als neue Datenreihe abgespeichert, d. h. es wird die Standardabweichung der Intensitäten in einem Fenster von fünf Datenpunkten um jeden ursprünglichen Zeitpunkt herum ermittelt, außer am Anfang und Ende der Kurve natürlich, wo nur in einer Richtung Werte existieren. Diese neue Kurve von Standardabweichungen (Abb. 67, blau) wird nun erneut mit einem fünf Punkte großen Fenster auf lokale Maxima abgetastet, wonach die Werte der Standardabweichung an diesen Positionen extrahiert werden (Abb. 67, rot). Starkes Rauschen nach dem letzten Bleichschritt kann diese Maxima verfälschen und zusätzliche nicht vorhandene Bleichschritte vortäuschen.

Zur Unterscheidung zwischen echten Stufen und Hintergrundrauschen wird ein Grenzwert errechnet, der sehr kleine lokale Maxima (Abb. 68, rot) herausfallen läßt. Mathematisch wird hierzu der Median der bis dahin gefundenen lokalen Maxima (Abb. 68, alle Punkte) ermittelt. Nur Maxima, die überhalb diesem Median liegen, werden im Folgenden

weiter betrachtet (Abb. 68, blau und magentafarben). Diese Daten werden aber noch immer durch Schwankungen während der Fluoreszenz beeinträchtigt, weshalb ein zweiter Grenzwert eingeführt werden muß. Analog wird der Median der noch übriggebliebenen Maxima errechnet und nur solche oberhalb selektiert.

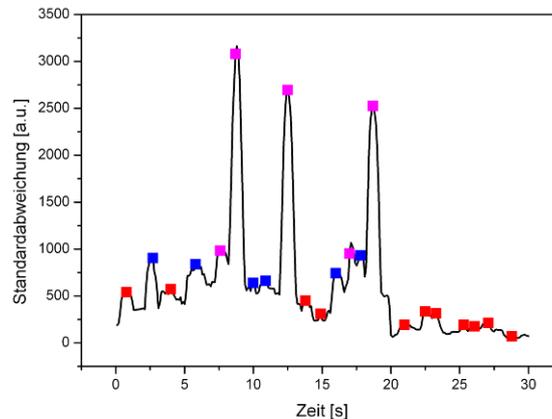


Abb. 68: Darstellung der Standardabweichung der Einzelmolekül-Intensitäts-Zeitspur (vgl. Abb. 67).

Die Suche nach lokalen Maxima ergibt sehr viele potentielle Bleichschritte (alle Farben zusammen). Die Berechnung des Median als Grenzwert führt zur Aussortierung aller niedrigen Werte (rot). Das Setzen eines zweiten Grenzwerts (Median der übrig gebliebenen Maxima blau + magentafarben) liefert beinahe alle drei tatsächlichen Bleichschritte (8.8 s, 12.5 s, 18.7 s).

Es bleiben nur die größten Maxima übrig (Abb. 68, magentafarben), die weitestgehend durch die Bleichschritte hervorgerufen wurden. Allein Intensitätsschwankungen, die sich in derselben Größenordnung wie ein Bleichschritt bewegen, werden noch daneben indiziert. Die Bereiche zwischen diesen Maxima werden nun zu Intervallen zusammengefaßt. Für den Fall, daß eine Zeitspur durchgehend gleichbleibende Intensitäten, also de facto keinen Bleichschritt aufweist, würde sie im Anschluß verworfen.

Im nächsten Schritt werden die Stufen auf ihre Länge hin überprüft, da die Stabilität des Niveaus nicht ohne gewisse Mindestdauer kontrolliert werden kann. Die Dauer ist der Filterbreite entsprechend ebenfalls fünf Zeitpunkte lang. Alle Stufen, die kürzer sind werden mit dem vorhergehenden Niveau zu einem neuen vereinigt. Somit spielen auch Schwankungen in der Fluoreszenz keine Rolle mehr. Die folgende Abbildung (Abb. 69) zeigt alle Niveaus, die mit der erwähnten Methode detektiert werden.

Nachfolgend muß jedes Intervall einer weiteren Anforderung genügen. Die Niveaus der Intensitäten (Abb. 69) müssen genügend weit auseinander liegen, um als getrennt identifiziert werden zu können. Dazu werden die Mittelwerte der verbleibenden Intervalle berechnet und aufsteigend miteinander verglichen. Hier bedarf es erstmals der Einführung eines empirischen Zahlenwerts. Der ursprüngliche Gedanke dahinter bestand darin, daß das Rauschen eines zufällig ablaufenden Prozesses, in diesem Fall der Emission von Photonen, eine Poisson-Verteilung verfolgt und durch die Wurzel seines Signals beschrieben werden

kann. Da die Aufzeichnung der Daten über die CCD-Kamera einer Verstärkung unterliegt, muß der dazugehörige Umrechnungsfaktor bestimmt werden, was zeitaufwendig ist und von Messung zu Messung variieren kann. Obendrein wird dieser eingeführte Zahlenwert empirisch bleiben.

Alternativ dazu kann trotzdem definiert werden, daß die Niveaus ein Vielfaches der Wurzel des höheren Signals auseinander liegen müssen, wenngleich nicht vergessen werden darf, daß kein Bezug mehr zu tatsächlich gemessenen Größen wie der Anzahl der Photonen besteht. Aus dem zuvor mathematisch begründbaren Gedanken des poissonbedingten Signalrauschens wurde ein rein empirisches Kriterium, welches sich aber flexibel an die jeweils gegebenen Daten anpassen läßt. Um nun zuverlässig Stufen unterscheiden zu können, muß die Differenz zweier Niveaus mindestens das 30-fache der Wurzel der mittleren Intensität des höher gelegenen Niveaus betragen, ansonsten werden sie ebenfalls verschmolzen. Konkret kann dieses Vorgehen am Beispiel in Abb. 69 betrachtet werden.

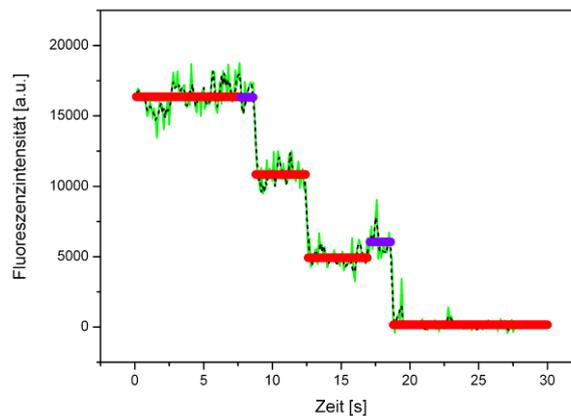


Abb. 69: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit.

Die ursprünglichen Daten (grün) werden gefiltert (gleitender Durchschnitt, Filterbreite 5, schwarz) und intervallweise zu Niveaus (rot, violett) zusammengefaßt. Außer den drei tatsächlichen Niveaus (8.8 s, 12.5 s, 18.7 s, rot) werden noch zwei weitere mit ähnlicher Intensität gefunden (violett). Sie unterscheiden sich nicht stark genug und werden mit den jeweils vorhergehenden zusammengezählt.

Das erste Niveau (rot) besitzt eine mittlere Intensität von knapp 16.500. Das zweite (violett) hingegen zeigt einen Mittelwert von 16.200, die Differenz der beiden beträgt also 300. Um als eigenständiges Niveau gewertet werden zu können, müßte die Differenz das 30-fache der Wurzel von 16.500 betragen, also etwa 3.850. Dieser Wert wird aber erst bei der Stufe nach 8.8 Sekunden mit 5.500 überschritten, weshalb erst dort der Bleichschritt zu setzen ist.

Als weiterer Gesichtspunkt für die Eignung, wird die Varianz des Signals betrachtet. So darf die Varianz innerhalb eines Intervalls nicht mehr als das 100-fache der Wurzel seines mittleren Signals betragen. Auch hier wurde empirisch ein Zahlenwert gefunden, der hervorragende Ergebnisse liefert für die Beseitigung von Zeitspuren, die hohe, aber zeitlich nur sehr kurze Fluktuationen aufweisen.

Ein weiteres wichtiges Merkmal ist, daß von einem Bleichschritt zum nächsten monoton fallende Intensitäten auftreten müssen, andernfalls liegt kein Bleichen, sondern ein Blinken des Farbstoffs vor (Abb. 69, zweites violettes Niveau). Hierzu werden die gefundenen Intensitätslevel der Größe nach sortiert und die neue Reihenfolge mit der alten unsortierten verglichen. Tritt kein Blinken auf stimmen die Reihenfolgen überein. Andernfalls fällt die Reihe nicht monoton und die gesamte Zeitspur wird verworfen.

Die Daten werden in einer Struktur ausgegeben und gespeichert, die nach der automatischen Analyse noch eine manuelle Überprüfung zuläßt. Hier können bei Bedarf Zeitspuren in die Auswertung mitaufgenommen bzw. herausgelöscht werden oder aber nur partiell verändert werden, wenn beispielsweise eine Stufe falsch detektiert wurde. Aus der Struktur können aber auch automatisch sowohl ein Histogramm mit der Anzahl der Bleichschritte erstellt werden wie auch eine Übersicht der aufgetretenen Intensitäten.

9.2.1. Bestimmung der Bleichschritte an mehrfach markierter DNS

Eine einfache Möglichkeit, auf dem in dieser Arbeit erstellten TIRF-Mikroskop Proben mit mehreren Fluorophoren zu messen, war, auf DNS mit Mehrfachmarkierung zurückzugreifen. Im Gegensatz zu fluoreszenten Proteinen, die nur begrenzt kommerziell erhältlich sind, ist DNS mit gekoppelten Farbstoffen ein sehr gängiges und leicht erhältliches Produkt. Der Grad der Mehrfachmarkierung läßt in der Theorie sogar die vollständige Kopplung jedes Nukleotids in der Sequenz zu. Laut Hersteller ist bei einer gleichzeitigen Kopplung mehrerer Farbstoffe an einen DNS-Strang mit einer eingeschränkten und inhomogenen Markierungseffizienz zu rechnen. Üblich sind bei der Verwendung eines Farbstoffmoleküls etwa 90 - 95 %. In diesem Fall sollte angeblich die Effizienz deutlich geringer sein als die theoretischen 65 - 81 %, wenn man von der gleichen Kopplungseffizienz für alle vier Farbstoffe ausgeht. Ein bestimmter Wert konnte vom Hersteller aber nicht angegeben werden. Daß ein derartiges Produkt im Endeffekt aus einer inhomogen verteilten Mischung aller vier möglichen Endstufen besteht, eröffnet die Möglichkeit, die Funktionsweise des Analyseprogramms in Abhängigkeit der Anzahl der Bleichschritte mit nur einer Meßreihe zu ermitteln.

GFP wäre in dieser Hinsicht nicht so geeignet, um es als eine Art Vorexperiment einzusetzen, da man normalerweise nicht mehr an den Eigenschaften des GFP selbst interessiert ist, sondern es mittlerweile nur noch als Reportermolekül verwendet[244]. In der Praxis wäre eine Mehrfachexpression von GFP wesentlich aufwendiger, wobei man es zudem an eine Art zentralen Adapter fusionieren müßte.

Als Referenzprobe zum Test des Analyseprogramms wurde somit eine mehrfach markierte DNS untersucht. Dazu wurde ein an vier definierten Positionen mit Atto 532 markiertes Oligonukleotid (IBA) auf einer Quarzglasoberfläche mittels Biotin-NeutrAvidin-

Bindung immobilisiert. Die Messung beinhaltete die Beobachtung der Fluoreszenz bei Einstrahlung mit Licht der Wellenlänge 532 nm bis zur vollständigen Auslöschung bzw. dem letzten Bleichschritt, der das Signal auf Hintergrundniveau fallen ließ. Ein mehrstufiges Bleichen als Indikator für mehrere Farbstoffe ist in der folgenden Abbildung (Abb. 70) gut ersichtlich.

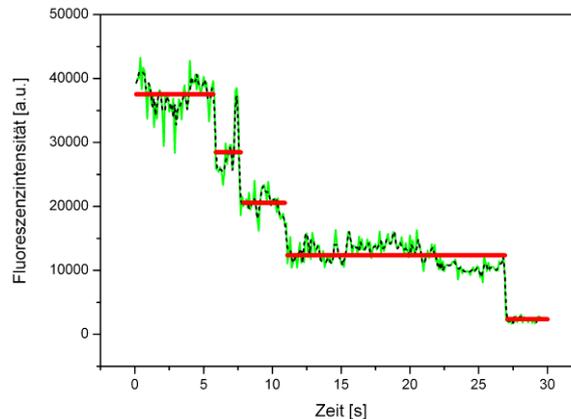


Abb. 70: Darstellung der Einzelmolekül-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit.

Die ursprünglichen Daten (grün) werden gefiltert (gleitender Durchschnitt, Filterbreite 5, schwarz) und intervallweise zu Niveaus (rot) zusammengefaßt. Es werden vier Bleichschritte (5.9 s, 7.8 s, 11.0 s, 27.0 s, rot) gefunden.

Anhand der entsprechenden Stufen ist die Anwesenheit von vier Farbstoffen zu erkennen. In grün sind die ungefilterten Datenpunkte abgebildet, während die schwarze, gestrichelte Linie die zur Auswertung verwendeten Daten nach dem Filtern mit einem 5-Punkt-Filter (gleitender Durchschnitt) wiedergibt. Mittlere Ausreißer durch Schwankungen in der Fluoreszenzintensität wurden geglättet, wie beispielsweise zu Zeitpunkten um 2.1 Sekunden bzw. 2.9 Sekunden gut zu sehen ist. Außerdem sind in rot die vom Programm automatisch erkannten Niveaus eingezeichnet. Die Länge der Niveaus ist sehr unterschiedlich, die Höhe nimmt vom zweiten zum dritten und zum letzten Farbstoff hin ab. Die Höhe ist aber von vielen Parametern abhängig, so zum Beispiel von der Orientierung des Absorptionsdipols im Vergleich zum Polarisationswinkel des Anregungslichts, aber auch von der Quanteneffizienz des Farbstoffs. Letztere kann durch den Einfluß benachbarter Nukleotide oder durch Anlagerung an die Oberfläche abgeschwächt werden. Im Prinzip sollte er aber frei beweglich sein und keine Vorzugsorientierung einnehmen. Insgesamt beträgt die Fluoreszenz aller vier Farbstoffe etwa 27 Sekunden, wobei nach 11 Sekunden bereits drei gebleicht sind.

Atto 532 ist als sehr photostabil und resistent bekannt, weshalb die gezeigten Messungen mit maximaler Laserintensität (100 mW, $40 \mu\text{W}\mu\text{m}^{-2}$) durchgeführt wurden, also mit dem vier- bis fünffachen der üblichen Leistung, um in den meisten Fällen sicher zu gehen, alle gebundenen Farbstoffe auch irreversibel zu bleichen.

Die mittlere Länge der Intervalle wurde nicht untersucht, da daraus keine zusätzliche Information zum Bleichverhalten des Farbstoffs hätte gewonnen werden können. Das bedeutet nicht, daß die Länge der Intervalle keinen Einfluß auf die Detektion einer Stufe ausübt. Bleichen zwei Farbstoffe nahezu zeitgleich, ergibt sich für den länger lebenden eine Stufe mit nicht ausreichender Mindestlänge, die nicht detektiert werden kann. Die Mindestlänge zwischen zwei Bleichschritten wurde auf 0.5 Sekunden festgesetzt.

Die Häufigkeit der aufgetretenen Bleichschritte wurde zusammengefaßt, und in folgendem Histogramm (Abb. 71) abgebildet.

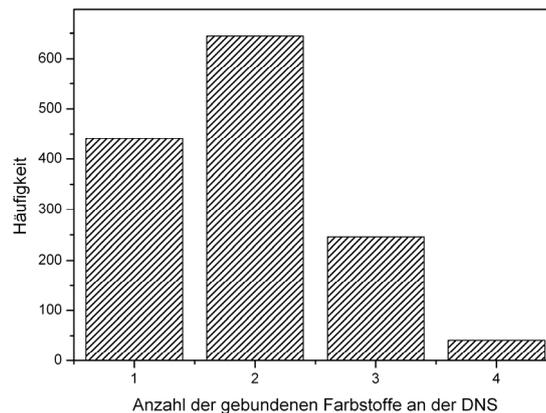


Abb. 71: Histogramm zur Übersicht der gebundenen Farbstoffe an mehrfach markierter DNS.

Es zeigt sich eine poisson-ähnliche Verteilung mit einem Maximum bei 2 Farbstoffen pro DNS Molekül.

Auf den ersten Blick zeigt sich, daß mit 47 % die am häufigsten vorkommende Population nur zwei Farbstoffe trägt. Danach folgen mit 33 % Konstrukte, die sogar nur einen Farbstoff gebunden haben. Diese erstaunlich niedrige Zahl kann auch nicht auf ein Artefakt in der Auswertungs-Software entstanden sein, da auch bei manueller Analyse kaum vier Bleichschritte zu beobachten waren. Da die Anbindung während der Farbstoffmarkierung der DNS irreversibel abläuft, kann die Effizienz durch Zugabe weiterer Äquivalente an Farbstoff bzw. durch längere Reaktionsdauer kinetisch kontrolliert werden. Man hätte die gewählten Bedingungen demnach weiter in Richtung höherer Markierungseffizienzen steigern können. Prinzipiell wäre eine Auswertung nach der tatsächlichen Markierungseffizienz möglich, aber für diese Referenzsubstanz ohne nennenswertes Interesse.

Bedenkt man aber, daß für jedes eingesetzte Äquivalent an Farbstoff Kosten in derselben Höhe anfallen, wäre das vierte Äquivalent mit nur knapp 3 % Anteil das am teuersten zu bezahlende. Als Referenzsubstanz für die generelle Prüfung der Tauglichkeit der Software eignete sich die DNS jedenfalls ausgezeichnet. Vor allem zeigt der Farbstoff Atto 532 ein klares Signal mit wenig Rauschen und daher guter Abstufung der Niveaus.

9.2.2. Voraussichtliche Applikationsmöglichkeiten der Software

Die Messungen an mehrfach markierter DNS zeigten, daß ein funktionsfähiges Programm entworfen werden konnte, das auf einfache Weise über die Stöchiometrie eines fluoreszenzmarkierten Konstruktes Aufschluß geben kann. Die Möglichkeit, über die simple Ermittlung der Bleichschritte auf die Zusammensetzung eines Komplexes zurückzuschließen, bietet nur die Einzelmolekül-Technik. Sämtliche Ensemble-Meßtechniken müssen hier auf aufwendige Art und Weise die zufallsmäßig verteilten und überlappenden Zerfallszeiten auflösen.

Es muß sich noch zeigen, in wie weit diese Methode auf andere Fluorophore angewendet werden kann. Fluoreszente Proteine bzw. Farbstoffe, die kein mit Atto 532 vergleichbares Signal liefern, sind weitaus schwerer auszuwerten. Teilweise ist sogar die manuelle Auswertung nicht durchführbar, da die Fluoreszenz zu großen Schwankungen unterliegt.

Das Programm sollte jedoch keinesfalls verglichen werden mit Software, die nach der Hidden-Markov-Methode vorgeht und in der Lage ist, versteckte nicht sichtbare Zustände zu extrahieren. Die Software wurde vielmehr mit dem Ziel einer schnellen Analyse bei großem Datendurchsatz entworfen.

Mögliche Applikationen mit biologischem Hintergrund wären zum Beispiel die Aufklärung des genauen molekularen Mechanismus beim Proteintransport vom Ribosom zum ER. Bisher konnte hier nur die Struktur des Translocons, also des Transportkanals vom Ribosom zum ER, bei Bakterien aufgeklärt werden[245]. Bei Eukaryonten dagegen ist noch unklar, wie der Kanal genau aufgebaut ist. Zwar sind die Komponenten des Sec61, eines der wichtigsten Translocon-Proteine, bekannt, nicht aber aus wie vielen dieser Heterotrimere ein solcher Kanal besteht[246].

10. Zusammenfassung und Ausblick

Die vielschichtigsten und komplexesten molekularen Maschinen sind biologischer Natur. Dazu zählen insbesondere molekulare Motoren wie die Motorproteine Kinesin und Myosin oder die DNS und RNS Polymerasen, kurzum essentielle Bestandteile allen Lebens. So ist zum Beispiel ein wichtiger Bestandteil des transkriptionsgekoppelten Reparaturmechanismus TCR just ein molekulares Motorprotein, das zur Familie der SWI2/SNF2-Enzyme gehört.

Hier setzte die vorliegende Arbeit an und untersuchte zwei Vertreter dieser Proteinfamilie. Zum einen wurde SSO1653 betrachtet, zum anderen Rad26, das als naher Verwandter bei TCR ausschlaggebend ist. Zur Untersuchung wurden Fluoreszenzexperimente im besonderen auf Basis des resonanten Energietransfers (FRET) durchgeführt.

Experimentell wurde zuweilen im Ensemble, aber größtenteils auf Einzelmolekül-Niveau gearbeitet. Dazu wurde ein sensitives Fluoreszenzmikroskop auf Basis der totalen internen Reflexion durch ein Prisma gebaut, das mit seiner Multikanalanregung und Detektion für Einzelpaar-FRET-Messungen genutzt wurde. Der Aufbau trug aber nicht nur zu dieser Arbeit maßgeblich bei. Ebenso erfolgreich fand er Anwendung in der Aufklärung der bis vor kurzem unbekannt Positionen von m-RNS und nicht-transkribierter DNS innerhalb des RNS-Polymerase II Elongationskomplexes. Außerdem wurden mit dem Aufbau Messungen erzielt, die zu einer Weiterentwicklung der verwendeten Analysemethoden führten.

Als wichtigste Punkte in diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, daß es einerseits gelang, Quarzglas-Oberflächen gegenüber unspezifischer Anbindung von Proteinen zu passivieren. Andererseits ließen die erarbeiteten Modifikationen es zu, die untersuchten Probenmoleküle spezifisch zu immobilisieren. Des weiteren wurde eine Software entworfen, die die Analyse der immensen Datenmengen durch Automation gravierend beschleunigt und vereinfacht.

Es bleibt dennoch Raum für weitergehende Untersuchungen und Verbesserungen am Fluoreszenzmikroskop. Bei letzterem ist es möglich, durch zusätzliche Komponenten wie z.B. einem AOTF, die zeitliche Auflösung zu verbessern oder durch Einbau weiterer Anregungsquellen die Zahl der simultan aufgezeichneten Detektionskanäle auf drei und mehr zu erhöhen. Auch eine weitgehende Automatisierung des Aufnahmeprozesses wäre denkbar.

Auf biochemischer Seite zählt zu den weiteren in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen erstens die Bestätigung der postulierten Konformationsänderung des SSO1653. Dazu wurde das Protein gleichzeitig mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, ohne eine Beeinträchtigung seiner Funktion hervorzurufen. Diese beiden Fluorophore dienten im Anschluß als Reporter der strukturellen Änderung des Proteins in Abhängigkeit des zugegebenen Substrats. Es stellte sich heraus, daß das SSO1653 in Abwesenheit von DNS eine offene Konformation einnimmt, die sich nach Zugabe von DNS schließt. Dabei rotiert eine der beiden Domänen des SSO1653 um 180° und führt zur Annäherung der beiden Farbstoffe, was sich in einer dramatischen Erhöhung der betrachteten FRET-Effizienz zeigte. Aus diesen Ergebnissen konnte in Kombination mit bereits bekannten Resultaten aus der Literatur ein Mechanismus postuliert werden, der übergreifend die Fortbewegung von SWI2/SNF2-ATPasen entlang des DNS Doppelstrangs zu erklären vermag.

Im Hinblick auf eine Fortführung der Experimente scheint das Protein SSO1653 nur wenig Spielraum zu bieten. Zwar wären möglicherweise zusätzliche Mutanten zugänglich, die die Konformationsänderung im post-hydrolytischen Zustand noch eingehender entschlüsseln könnten, dafür müßten dann aber erneut Ensemble-Messungen durchgeführt werden. Die extreme Temperatur von 60°C , die zur vollen Aktivität des Enzyms führt, ist für Einzelmolekül-Messungen schwer zugänglich.

Der Mechanismus, der hingegen formuliert werden konnte, wäre ein interessanter Ansatz für weitergehende Messungen im Bezug auf Proteine, sog. nucleosome remodeler, die an der Umstrukturierung von Nukleosomen beteiligt sind.

Zweitens wurde die potentielle biologische Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs Terrylen-Diimid anhand der kovalenten Anbindung an DNS nachgewiesen. Über Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie konnte die erfolgreiche Kopplung bestätigt und das Verhalten des Farbstoffs an einem biologischen Substrat charakterisiert werden. Es offenbarten sich jedoch die bereits bekannten Nachteile der Aggregation des Farbstoffs und der damit verbundene Verlust an Fluoreszenz. Die Umgebung des Farbstoffs spielte dabei jedoch eine entscheidende Rolle. In hydrophober Umgebung zeigte sich das an DNS gebundene Terrylen-Diimid anderen Farbstoffen gegenüber als weit überlegen.

Die Messungen wiesen daraufhin, daß der Farbstoff somit nur teilweise biologisch kompatibel ist. Gelingt es jedoch, die Aggregation des Farbstoffs unter Kontrolle zu bringen, gibt es keine Bedenken anzumerken. Andernfalls müßten verwandte Farbstoffe wie Perrylene eingesetzt werden.

Drittens konnte die Fluoreszenzmikroskopie an einzelnen Molekülen erfolgreich genutzt werden, um stöchiometrische Verhältnisse zu bestimmen. Ein charakteristisches Merkmal einzelner Fluorophore sind ihre separat detektierbaren Bleichschritte. Aus diesem Grund wurde eine Software entwickelt, die es ermöglicht aus Intensitäts-Zeitspuren mehrfach

markierter Moleküle, die Anzahl der daran gebundenen Farbstoffe zu extrahieren. Als Modellsystem wurde dazu eine einzelsträngige DNS mit bis zu vier Farbstoffen untersucht.

Besonders hilfreich ist diese Methode beispielsweise bei der Untersuchung von Multi-proteinkomplexen. Generell existiert eine Vielzahl von Applikationen, bei denen die Anzahl von Untereinheiten bestimmt werden soll.

Viertens konnten verschiedene Hypothesen zum TCR Reparaturvorgang und der Beteiligung des Enzyms Rad26 anhand seiner Wirkung auf die RNS-Polymerase II entkräftet bzw. bestätigt werden. Hierzu wurde der bestens charakterisierte Elongationskomplex aus RNS-Polymerase II, doppelsträngiger DNS sowie einzelsträngiger RNS als Modellsystem für die Interaktion mit Rad26 eingesetzt. Der Elongationskomplex wurde dabei aus Konstrukten der Nukleinsäuren, die eigens mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen worden waren, assembliert und unter Zugabe von Rad26 analog der Messungen zur Aufklärung der Positionen von m-RNS und nicht-transkribierter DNS vermessen. Die erwartete Interaktion mit Rad26 konnte festgestellt werden, obgleich sie weder in dramatischen Konformationsänderungen noch zu weitreichender Verschiebung der RNS-Polymerase II entlang des DNS-Doppelstrangs führte. Dies mag angesichts der verschiedenen in der Literatur postulierten Vorgänge unbefriedigend wirken. Dennoch kann unter Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse definitiv ausgeschlossen werden, daß das Rad26 eine dem TFIIS entsprechende ortsverändernde Wirkung der RNS-Polymerase II um mehrere Dutzend Basen aufweist. Gleiches gilt für die Auflösung des Elongationskomplexes als Ganzes. Vielmehr scheint eine leichte Konformationsänderung bzw. eine Verschiebung um eine oder höchstens wenige Basen entgegen der Transkriptionsrichtung einzutreten, was eine entsprechende Hypothese erhärtet.

Der nächste Schritt müßte der gezielte Einbau von Schäden in die DNS des Elongationskomplexes sein. Das Assemblieren der Polymerase an künstlichen Nukleinsäure-Konstrukten ermöglicht deren gezielte Positionierung entlang der Transkriptionsblase. Eine interessante Möglichkeit wäre auch die Verwendung basaler Transkriptionsfaktoren, im besonderen des TFIIS. Die Zugabe von Nukleotiden ermöglicht schon jetzt die Verschiebung in Elongationsrichtung zu beobachten, der Einsatz des TFIIS würde zusätzlich die veränderte Situation der RNS-Polymerase II nach der Verschiebung entgegen der Transkriptionsrichtung experimentell zugänglich machen. Beide Ergebnisse ließen sich dann wiederum mit dem von Rad26 vergleichen und so dessen Effekt endgültig bestimmen.

A. Methoden und experimentelle Durchführung

Dieses Kapitel befaßt sich ausschließlich mit der technischen Umsetzung bezüglich des Apparateaufbaus sowie mit der praktischen Durchführung von biochemischen bzw. molekularbiologischen Arbeiten. Der Großteil der Experimente aus der vorliegenden Arbeit fand im Arbeitskreis Prof. Bräuchles bzw. Prof. Michaelis statt. Lediglich die Expression und anschließende Aufreinigung der untersuchten Enzyme SSO1653 und Rad26 wurde in Kooperation mit Prof. Hopfner im Genzentrum der LMU München durchgeführt. Hiermit sei ihm und seinen Mitarbeitern nochmals gedankt für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung von Instrumentarium.

Sofern nicht anders erwähnt wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Reagenzien, Verbrauchsmittel oder Gerätschaften benutzt. Spezial angefertigte Teile werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

A.1. Generelle Verfahrensweisen und übergreifende Bedingungen

▪ Lösungsmittel

Für sämtliche Versuche wurde entionisiertes und aufbereitetes Reinstwasser (Millipore, 18.2 M Ω -cm, TOC mindestens < 20 ppb) verwendet. Organische Lösemittel wurden ausschließlich in HPLC-Qualität oder in spektroskopischem Reinheitsgrad eingesetzt.

▪ Reagenzien

Sämtliche Reagenzien wiesen eine Reinheit von min. 98 % auf.

▪ Reaktionsgefäße, Glas- und Plastikware

Alle Gefäße, insbesondere Eppendorf-Cups, wurden vor Benutzung bei 121 °C autoklaviert. Pipettenspitzen wurden entweder autoklaviert oder vom Hersteller γ -bestrahlt. Sterile Spritzen und Kanülen wurden einmal verwendet.

▪ Pufferlösungen

Alle Pufferlösungen wurden vor Verwendung steril filtriert (0.22 μ m).

▪ **Nukleinsäure- und Proteinanalytik**

Agarose- und Polyacrylamid-Gele (PAGE) wurden nach Literaturvorschrift hergestellt[247]. Als Gel-Loading-Buffer wurde eine auf Ficoll 400 (Amersham Biosciences) basierte Farbstofflösung aus Bromphenolblau und Xylol Cyanol verwendet bzw. bei Bedarf reines Ficoll 400 ohne zusätzliche Marker-Farbstoffe. Die Elektrophorese von Agarose-Gelen fand bei konstanten 30 - 50 V statt, bei PAGE wurde sie variiert. Bei nicht-denaturierenden Gelen in den ersten 10 Minuten und bei SDS-Gelen im Bereich des Sammelgels wurden 5 - 8 mA bzw. 100 - 120 V verwendet. Danach wurden die Werte auf 200 - 220 V bzw. 10 - 15 mA erhöht.

Die Detektion von nicht markierten Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe von Sybr-Gold bzw. Sybr-Green (beide Invitrogen), die nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt wurden. Es wurde kein Ethidium-Bromid verwendet. Anfärbung von nicht markierten Proteinen erfolgte ebenfalls nach Herstellervorschrift mit Sypro-Orange (Invitrogen) oder Coomassie Brilliant Blue G. Die Entfärbung von Coomassie Brilliant Blue G wurde ebenfalls nach Literaturvorschrift ausgeführt[247].

Agarose-Gele und Polyacrylamid-Gele wurden auf einem Biorad GelDoc EQ System untersucht sowie gegebenenfalls auf einem Amersham Typhoon 9400 im Fluoreszenzmodus. Die Anregungswellenlängen und Emissionsfilter wurden entsprechend den eingesetzten Farbstoffen nach Herstellerempfehlung eingestellt. Die Scangenaugigkeit lag bei 100 µm. Für die Auswertung kam Imagequant V5.1 bzw. Quantity One V4.6 zum Einsatz.

▪ **Aufreinigung von Nukleinsäuren und Proteinen**

Falls nicht anders angegeben, wurden zur Proteinaufreinigung Spin-Columns (Microspin und Probequant G-50, Amersham Biosciences bzw. Micro BioSpin P-6 oder P-30, Bio-Rad) nach Herstellervorschrift verwendet. Zur Vorbereitung wurde immer ein Pufferwechsel vorgenommen. Dazu wurde das Säulenmaterial durch kurzes Vortexen resuspendiert, worauf die G-50 Spin-Columns bei 750 x g und die P-6 bzw. P-30 Säulen bei 1.000 x g je eine Minute zentrifugiert wurden. Zum Waschen des Säulenmaterials wurden zweimal hintereinander je 400 µl des gewünschten Puffers aufgetragen und erneut für eine Minute zentrifugiert. Die Auftragung der Probe erfolgte nach dem dritten Zentrifugationsschritt, wonach die G-50 Spin-Columns zwei Minuten und die P-6 bzw. P-30 Säulen vier Minuten zentrifugiert wurden.

▪ **Herstellung von doppelsträngigen Nukleinsäure-Oligomeren**

Zur Hybridisierung der einzelsträngigen DNS- oder RNS-Oligomere wurde ein spezielles Aufheiz-/Abkühlverfahren eingesetzt. Jeweils gleiche Volumina zweier komplementärer Stränge wurden vermischt und für 10 min. auf 95 °C erhitzt. Nach dem sofortigen Abkühlen auf 55 °C, wurde die Temperatur in einem Zeitraum von 1 h schrittweise um 1 °C (1.5 min / 1 °C) bis auf 16 °C verringert. Bei extrem kurzen doppelsträngigen Oligomeren (< 15 Basen) lag die Endtemperatur bei 4 °C.

- **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Proteinen und Farbstoffen**

UV-VIS-Spektroskopie wurde entweder auf einem Varian Cary 50 Spektrometer oder auf einen Nanodrop ND-1000 durchgeführt.

Küvetten (Hellma) wurden vor jeder Messung mit speziellem Küvettenreiniger (Hellmanex II) und Reinstwasser gespült.

- **Aufbewahrung**

Alle Reagenzien wurden bei den vom Hersteller vorgesehenen Temperaturen eingelagert. Sämtliche kommerziell erhältlichen Enzyme, Nukleinsäuren und anderen Biomoleküle wurden bei -21 °C eingefroren. Eine zwischenzeitliche Lagerung bei 4 °C fand maximal für 5 Tage statt. Die beiden Proteine SSO1653 und Rad26 wurden in verflüssigtem Stickstoff schockgefrostet und bei -78 °C aufbewahrt.

- **Fluoreszenz-Messungen**

Als Fluoreszenz-Spektrometer im steady-state Betrieb kam ein F900 (Edinburgh Instruments) zum Einsatz. Fluoreszenz-Lebenszeiten wurden auf einem Fluorocube (Horiba Jobin Yvon) bestimmt.

- **Einzelmolekül-Messungen**

Kommerzielle Anregungsquellen sowie Detektionssysteme werden im Anschluß vorgestellt. Spezielle Reinigungsmethoden für Quarzglas-Objektträger sowie Deckgläser sowie deren Beschichtung zur späteren Immobilisierung der Biomoleküle wurden bereits beschrieben.

A.2. Verwendete Puffer

ATPase-Puffer (SSO1653, pH 5.5):

25 mM MES

5 mM MgCl₂

100 mM NaCl

1 mM DTT

0.1 mg/ml BSA

PBS Puffer (pH 7.4 und pH 8.0):

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

A.2. Verwendete Puffer

Assembly-Puffer (pH 7.5):

50 mM HEPES
40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
5 mM MgCl_2
10 μM ZnCl_2
5 mM DTT
5 % Glycerin

Puffer J (pH 7.5):

50 mM HEPES
150 mM NaCl
5 mM MgCl_2
10 % Glycerin

ATPase-Puffer (Rad26, pH 7.5):

50 mM HEPES
150 mM NaCl
5 mM MgCl_2
5 mM DTT
10 % Glycerin
0.1 mg/ml BSA

Carbonat-Bicarbonat Puffer (pH 9.4):

12.4 mM Na_2CO_3
87.6 mM NaHCO_3

Tetraborat-Puffer (pH 8.5):

25mM Tetraborat
75 mM NaCl

A.3. Expression der Proteine

Alle Proteine wurden im Rahmen des SFB 646 in Kollaboration mit den Arbeitskreisen um Prof. Hopfner und Prof. Cramer im Genzentrum der LMU München exprimiert und aufgereinigt. Größtenteils wurde dies anhand etablierter Protokolle durchgeführt, die im Anschluß wiedergegeben werden. Für eine detaillierte Beschreibung wird auf weiterführende Literatur verwiesen.

A.3.1. Expression von SSO1653

Nach der Transformation wurden *E.coli* BL21 Rosetta (DE3) Zellen (Novagen) in LB Medium mit 0.5 mM IPTG für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie zentrifugiert (15 min., 7000 x g), in Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 300 mM KCl, 1 mM DTT) resuspendiert, mit PMSF (1:1000) versetzt und über Ultraschall-Sonifikation (3 x 3 min., 1 Hz) geöffnet. Nach erneuter Zentrifugation (30 min., 15.000 x g) wurde die Proteinlösung für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt und abermals zentrifugiert (5 min., 20.000 x g)

Der Überstand wurde über Ni-Affinitätschromatographie (6x His-Tag) aufgereinigt, indem das immobilisierte Protein ausgiebig mit Äquilibrierungspuffer (20 mM Tris pH 7.2, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen wurde. Daraufhin wurde es mit Elutionspuffer (gleiche Zusammensetzung wie Äquilibrierungspuffer) unter Zusatz von 250 mM Imidazol eluiert und gegen Puffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert. Danach wurde es auf einen äquilibrierten Ionenaustauscher (Resource S, Amersham Biosciences) geladen und an einem ÄKTA System (Amersham Biosciences) eluiert. Dazu wurde in 20 Säulenvolumina ein Gradient von Puffer A zu Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 M NaCl, 1 mM EDTA) gefahren. Bei Bedarf weiterer Aufreinigung wurde eine Size-Exclusion Chromatographie (Sephadex S200, Amersham Biosciences) durchgeführt in Puffer S (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).

A.3.2. Klonierung und Mutagenese von SSO1653

Das Gen, das für das N-terminale (ORF SSO1653) sowie das C-terminale (ORF SSO1655) Fragment codiert, wurde über PCR mit entsprechenden Primern aus der genomischen DNS vervielfacht und mit überlappender PCR kombiniert, um das Transposon (Aminosäuren 790 - 802 ORF SSO1653 und 1 - 7 ORF SSO1655) herauszuschneiden. Weitere PCR am DNS-Konstrukt führte zum Wegfall der Aminosäuren 1 - 429, das im Anschluß in den pET28b Expressionsvektor (Novagen) kloniert wurde. Um die gewünschte Mutation einzuführen, wurden spezielle komplementäre Oligonukleotide entworfen, so daß mittels PCR zwei

überlappende DNS Fragmente generiert werden konnten. Dazu wurden je zwei mutierte Primer sowie zwei unmodifizierte Primer gleichzeitig eingesetzt. Die entstehenden Fragmente sind dadurch zueinander komplementär und besitzen eine Schmelztemperatur von 60 - 75 °C. In einer darauffolgenden PCR wurden diese Fragmente vervollständigt und vervielfacht. Die überlappende PCR wurde hierzu mit einer Annealing Temperatur von 48 °C gestartet und für 5 Zyklen beibehalten. Danach wurde die Temperatur in den nächsten Zyklen bis auf 55 °C erhöht. Der korrekte Einbau der Mutation wurde mittels DNS Sequenzierung nachgewiesen.

In der Mutante 2X wurden Cysteine eingeführt an den Aminosäuren K629 und K697, während in Mutante 4X native Cysteine zu Serinen mutiert wurden an den Positionen C499 und C670. Die zusätzliche fünfte Mutation in Mutante 5X wurde an Position C466 durchgeführt. Für die Mutante EQ wurde die Position E563 verändert.

A.3.3. Expression von Rad26 (Vollängen-Konstrukt)

Nach der Klonierung des Gens über PCR in einen pFBDM Expressionsvektor erfolgte die Expression in HighFive Insektenzellen (Invitrogen). Die Zellen wurden in einem Liquidizer bei 20 kbar aufgeschlossen und in Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren (45 Min., 15.000 Upm SS34) wurde die lösliche Fraktion über eine Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach der Elution in einem Gradient von 20 mM bis 300 mM Imidazol wurden die Fraktionen mit höchster Dichte auf eine Strep-Tactin Säule (IBA) geladen und gewaschen.

Die Elution erfolgte danach mit Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2.5 mM Desthiobiotin). Die dichtesten Fraktionen wurden dann gegen Transkriptionspuffer (20 mM Hepes pH 7.6, 60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mM MgSO_4 , 10 μM ZnCl_2 , 10 mM DTT, 10 % Glycerol) dialysiert.

A.3.4. Expression von Rad26-R881

Die Expression erfolgte in *E. coli*. Nach dem Zellaufschluß über Sonifikation in Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol) wurde die Lösung abzentrifugiert (45 Min., 15.000 Upm SS34), worauf der Überstand über eine Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde. Nach der Elution in einem Gradient von 20 mM bis 300 mM Imidazol wurden die Fraktionen mit höchster Dichte vereinigt und gegen Q-Sepharose-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) dialysiert. Danach wurde die Lösung über einen Ionenaustauscher (Resource Q, Amersham Bi-

osciences) gereinigt. Dazu wurde das Protein über einen NaCl Gradienten von 100 mM zu 1 M eluiert. Die dichtesten Fraktionen wurden wieder vereinigt und gegen Transkriptionspuffer (20 mM Hepes pH 7.6, 60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mM MgSO_4 , 10 μM ZnCl_2 , 10 mM DTT, 10 % Glycerol) dialysiert.

A.4. Markierung der Proteine mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Im folgenden wird eine generelle Vorschrift (Tab. 16) präsentiert, die für alle eingesetzten Farbstoffe und Proteine übergreifend gilt. Im späteren Verlauf wird einzeln detailliert auf die konkreten Bedingungen wie pH-Wert oder Temperatur eingegangen.

Proteinmarkierung		
Extinktionswert Protein A_{Protein}		1
Extinktionskoeffizient Protein $\epsilon_{\text{Protein}}$	$\left[\frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}} \right]$	50.000
Molekulargewicht Protein M_{Protein}	$\left[\frac{g}{\text{mol}} \right]$	50.000
Ursprungskonzentration Protein $U = \frac{A}{\epsilon_{\text{Protein}}} \times M_{\text{Protein}}$	$\left[\frac{\mu g}{\mu l} \right]$	1
Endkonzentration Protein $E = U \times 0.8$	$\left[\frac{\mu g}{\mu l} \right]$	0.8
Gesamtvolumen G	$[\mu l]$	50
aufzufüllendes Volumen an Protein $\frac{E \times G}{U}$	$[\mu l]$	40
Extinktionskoeffizient Farbstoff $\epsilon_{\text{Farbstoff}}$	$\left[\frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}} \right]$	100.000
Extinktionswert $A_{\text{Farbstoff}}$	$\left[\frac{l}{\text{mol} \times \text{cm}} \right]$	100
Stöchiometrie Farbstoff : Protein Z		2
Einzusetzendes Volumen Farbstoff $F = \frac{Z \times E \times G \times \epsilon_{\text{Farbstoff}}}{M_{\text{Protein}} \times A_{\text{Farbstoff}}}$	$[\mu l]$	1.6
Einzusetzendes Volumen Puffer $P = G - F$	$[\mu l]$	8.4

Tab. 16: Übersicht über das Protokoll zur Proteinmarkierung.

Als erstes wird das Protein aus seinem nativen Puffer in PBS überführt, worauf seine Konzentration U bestimmt wird. Der unvermeidliche Verdünnungseffekt durch die Zugabe der Farbstofflösung soll möglichst minimiert werden, weshalb eine größtmögliche Konzentration an Farbstoff in 10 - 15 μl Wasser gelöst wird. Bei stöchiometrischem Einsatz der Konzentrationen von Farbstoff und Protein wäre dies beispielsweise ab einem Extinktionswert von 50 der Fall, sofern der Extinktionskoeffizient des Farbstoffs zwischen $100.000\text{ M}^{-1}\text{cm}$ und $250.000\text{ M}^{-1}\text{cm}$ liegen würde. Zur Messung muß dazu eine kleine Menge (1 - 2 μl) zwischenzeitlich soweit verdünnt werden (100 - 500-fach), daß die Absorption noch innerhalb des dynamischen Bereichs des UV-VIS-Spektrometers bleibt. Aus dem Verdünnungsfaktor und dem Extinktionswert am Absorptionsmaximum wird unter Zuhilfenahme des vom Hersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten die Konzentration des Farbstoffs in den ursprünglichen 10 - 15 μl errechnet. Die gewünschte Farbstoffkonzentration bzw. ggf. der benötigte Überschuß im Verhältnis zur Proteinkonzentration U kann dann über das eingesetzte Volumen F variiert werden.

Der Farbstoff wird vorgelegt und mit der berechneten Menge Puffer P vermischt. Es wird mit Protein auf ein Gesamtvolumen G von 50 μl aufgefüllt und für eine Stunde inkubiert. Tab. 16 soll anhand eines fiktiven Beispiels einen Überblick über die einzusetzenden Konzentrationen und Volumina geben. Die Endkonzentration des Proteins E soll durch die Zugabe der Farbstofflösung um 20 % sinken.

Überschüssiger, nicht-reagierter Farbstoff wird zweimal hintereinander über Size-Exclusion-Chromatographie abgetrennt. Die Markierungseffizienz wird anschließend spektroskopisch nach folgender Gleichung bestimmt.

$$\text{Effizienz} = \frac{\varepsilon_{\text{Protein}} \times A_{\text{Farbstoff}}^{\lambda \text{ max}}}{\left(A_{\text{Protein}}^{280\text{nm}} - c_f \times A_{\text{Farbstoff}}^{\lambda \text{ max}} \right) \times \varepsilon_{\text{Farbstoff}}}$$

Gl. 51

Bei den meisten Farbstoffen muß ein Korrekturfaktor c_f eingeführt werden, da auch in höher gelegene elektronische Niveaus absorbiert werden kann. Für Cy3 wurde ein Wert von 0.08 ermittelt, 0.05 für Cy5 und 0.04 für Alexa 647. Die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe wurden vom Hersteller übernommen, mit $150.000\text{ M}^{-1}\text{cm}$ für Cy3, $250.000\text{ M}^{-1}\text{cm}$ für Cy5 und $239.000\text{ M}^{-1}\text{cm}$ für Alexa647.

A.4.1. Markierung des SSO1653

Als Donor wurde ein sechsfacher Überschuß an Cy3-Maleimid eingesetzt, während als Akzeptor ein zehnfacher Überschuß an Cy5-Maleimid (beide Amersham Biosciences) bzw. Alexa647-Maleimid (Invitrogen) verwendet wurde. Atto647N wurde analog zu den beiden

anderen Akzeptoren verwendet, jedoch nicht mit Donor kombiniert. Die Inkubation fand statt in PBS (pH 8.0) bei 37 °C für eine Stunde. Bei der doppelten Markierung mußten beide Farbstoffe vorab vermischt werden, damit die Reaktion gleichzeitig starten konnte. Der Extinktionskoeffizient für SSO1653 wurde mit $57.995 M^{-1}cm$ bestimmt.

A.4.2. Markierung und Biotinylierung des SSO1653

Zur zusätzlichen Biotinylierung wurde ein fünffacher Überschuß an Biotinamidohexan-1-yl-6-aminohexansäure-N-Hydroxysuccinimid-Ester bzw. Biotin-XX-NHS (Invitrogen) gleichzeitig zur Markierungsreaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt. Hierzu wurde das Enzym analog mit einem sechsfachen Überschuß an Cy3-Maleimid und einem zehnfachen Überschuß an Cy5-Maleimid bzw. Alexa647-Maleimid in PBS (pH 8.0) bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

A.4.3. Markierung des Rad26

Das R881-Konstrukt wurde mit einem 15-fachen Überschuß an Alexa647-NHS-Ester in Puffer J bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 20 Minuten. Als Extinktionskoeffizient für Rad26-R881 wurde $103.500 M^{-1}cm$ eingesetzt.

A.4.4. Kopplung von Terrylen-Diimid (WS-TDI) an einzelsträngige DNS

50 µl einzelsträngige DNS (100 µM, 70 Basen, Linker an Base 41) wurde mit 20 µl Tetra- borat-Puffer (5-fach konzentriert) versetzt. Der Farbstoff wurde analog zu den Markierungs- vorschritten für Proteine vorbereitet. Eine größtmögliche Menge an TDI-NHS wurde dazu in 10 - 15 µl Wasser gelöst. Die Konzentration wurde über Absorptionmessung ($\epsilon = 24.500 M^{-1}cm$) bestimmt und auf 2 mM eingestellt. Die Verdünnung zur Messung an einem UV-VIS Spektrometer darf hier nicht mehr als etwa 100-fach betragen.

25 µl TDI-NHS (2 mM in H₂O) wurde dann zu den 75 µl DNS-Lösung gegeben und mit 5 µl H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wurde 1 Stunde bei 50 °C inkubiert. Es folgte eine Ethanol-Präzipitation der DNS nach Literaturvorschrift[247]. Die DNS wurde darauf in 50 µl PBS resuspendiert und mit der Size-Exclusion-Chromatographie über Bio- Rad P6 gereinigt.

A.4.5. Hybridisierung von WS-TDI-DNS mit komplementärem Strang

Das einzelsträngige Oligomer mit WS-TDI wurde mit seinem komplementären Gegenstrang im Verhältnis 10:1 zusammengegeben und über das beschriebene Aufheiz-/Abkühlverfahren (Kapitel A.1) hybridisiert. Die doppelsträngige DNS wurde anschließend auf einem nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gel (5 %) analysiert.

A.5. Aktivitätstest der Proteine

Die nachfolgende Beschreibung des Aktivitätstests gilt für beide untersuchten Proteine gleichermaßen. Lediglich die Reaktionsbedingungen wie Temperatur oder pH-Wert wurden variiert, die jedoch mit entsprechenden Referenzmessungen berücksichtigt wurden. Für jedes Protein mußten insgesamt fünf Messungen durchgeführt werden, um den durch bereits hydrolysiertes ATP entstandenen Hintergrund abzuziehen, aber auch zur Bestimmung der möglichen Absorption durch Protein und DNS.

Probe 1: ATP (Hintergrund)

Probe 2: Protein + DNS ohne ATP (Nullprobe)

Probe 3 - 5: Protein + DNS + ATP

Für die effektive Menge Phosphat wird das Ergebnis der Hintergrund-Probe und der Nullprobe vom Ergebnis der eigentlichen Probenansätze abgezogen. Die Menge an Phosphat ist gleichzusetzen mit der Menge an verbrauchtem ATP und muß nach folgender Gleichung auf ein Enzymmolekül gerechnet werden.

$$[PO_4^{3-}] = [ATP_{\text{verbraucht}}^{\text{gesamt}}] \Rightarrow \text{ATPase - Aktivität} = \frac{[PO_4^{3-}]}{[\text{Protein}]}$$

Gl. 52

A.5.1. Kalibrierungskurve

Da die Herstellerangaben zur Aufnahme einer Eichgeraden zum einen nicht ausgelegt waren auf die zu erwarteten Phosphatkonzentrationen und zum anderen ungeeignet waren wegen zu großer Probenvolumina mußte eine kompatible und genauere Eichgerade erstellt werden. Dazu wurde ein Phosphatstandard (800 µM) in Wasser in folgenden Konzentrationsstufen verdünnt: 0, 5 µM, 6.25 µM, 7.5 µM, 10 µM, 12.5 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM, 120 µM, 160 µM und 200 µM. Um den Fehler zu mi-

nimieren, wurden drei unterschiedliche Startkonzentrationen (240 μM , 200 μM und 160 μM) jeweils fünf Mal halbiert. Jede Reihe wurde zwei Mal erstellt. Zu je 50 μl der verdünnten Phosphatlösung wurden 500 μl Biomol Green gegeben und anschließend 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe erfolgte zeitversetzt, um trotz der Aufnahmedauer eines UV-VIS-Spektrums eine identische Inkubationszeit für alle Proben zu gewährleisten.

Die Proben wurden in Einmalküvetten (1 ml) von 600 - 700 nm vermessen, um den maximalen Absorptionswert ablesen zu können. Die Absorption steigt nicht nur mit höherwerdender Phosphatkonzentration, sie verschiebt sich auch ins längerwellige. Als absolute Nullreferenz im Spektrometer wurde reines Biomol Green verwendet. Zur Auswertung wurden die Datenpunkte mit einer linearen Ausgleichsgerade angenähert.

A.5.2. Aktivitätstest an SSO1653

In einem Gesamtvolumen von 50 μl wurden 2.5 nM Protein mit 50 nM polydA-polydT-DNS (Amersham Biosciences) sowie 1mM ATP in ATPase Puffer bei 60 °C für 30 Minuten inkubiert. Analog dazu wurde mit der Nullprobe (Protein + DNS ohne ATP) und der Hintergrund-Probe verfahren. Eine Tabelle verdeutlicht die absolut eingesetzten Mengen (Tab. 17). Alle Bestandteile wurden vorab in ATPase-Puffer gelöst bzw. verdünnt.

ATPase-Aktivitätstest SSO1653			
	ATP (Hintergrund) [μl]	Protein + DNS (Nullprobe) [μl]	Probenansätze [μl]
Protein (5 nM)	0	25	25
polydA-polydT-DNS (0.1 mg/ml)	0	5	5
ATP (10 mM)	5	0	5
ATPase-Puffer (10x)	5	5	5
H ₂ O	40	15	10
Gesamtvolumen	50	50	50

Tab. 17: Übersicht über das Protokoll zum ATPase-Aktivitätstest des SSO1653.

Die Reaktion wurde gestoppt durch die Zugabe von 500 μl Biomol Green, worauf die Mischung stark gevortext und für weitere 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 600 - 700 nm wurden die Mengen an entstandenem Phosphat anhand des Absorptionswerts am Maximum der Kurve unter Einsatz der zuvor beschriebenen Kalibrierungskurve bestimmt.

Es wurden neben dem Wildtyp auch alle Mutanten (2X, 4X, EQ, 5X) gemessen. Bei mit Farbstoff markiertem Protein wurde vorab ein doppelter Pufferwechsel vorgenommen.

A.5.3. Aktivitätstest an Rad26

25 nM Protein wurden entweder mit je 1 μ M dsDNS (25 bp, 60 bp, 100 bp, 200 bp), je 1 μ M ssDNS (25 b, 60 b, 100 b), je 1 μ M ssRNS (26 b, 35 b) bzw. 700 nM polydA-polydT-DNS oder 960 nM polydT-DNS sowie 1 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nullprobe (Protein + DNS ohne ATP) und Hintergrund-Probe wurden entsprechend gehandhabt. Die folgende Tabelle (Tab. 18) veranschaulicht die eingesetzten Mengen. Alle Komponenten wurden zuvor in Assembly-Puffer verdünnt.

ATPase-Aktivitätstest Rad26			
	ATP (Hintergrund) [μ l]	Protein + DNS (Nullprobe) [μ l]	Probenansätze [μ l]
Protein (50 nM)	0	25	25
DNS / RNS (Oligos 5 μ M, polydA-polydT 0.5 mg/ml)	0	10	10
ATP (5 mM)	10	0	10
Assembly-Puffer (1x)	5	5	5
Gesamtvolumen	50	50	50

Tab. 18: Übersicht über das Protokoll zum ATPase-Aktivitätstest des Rad26.

Die Reaktion wurde gestoppt durch die Zugabe von 500 μ l Biomol Green, worauf die Mischung stark gevortext und für weitere 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 600 - 700 nm wurden die Mengen an entstandenem Phosphat anhand des Absorptionswerts am Maximum der Kurve unter Einsatz der zuvor beschriebenen Kalibrierungskurve bestimmt. Die Messungen wurden sowohl mit dem Vollängen-Konstrukt als auch mit dem gekürzten Konstrukt (R881) durchgeführt.

Um zu testen, wie das Rad26 auf unterschiedliche Längen des DNS-Substrats reagiert, wurde das Protokoll wie folgt geändert. Zu 700 nM Rad26 wurden entweder 5 μ M ssDNS (25 b) oder 391 nM polydT-DNS (319 b) gegeben und in Anwesenheit von 1 mM ATP für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 50 μ l. Die Tab. 18 gilt entsprechend.

Für die Inaktivierung möglicher RNase-Aktivität wurden auch Versuche mit einem Inhibitor (Superase-In, Ambion) durchgeführt. Dazu wurden die 5 μ l Assembly-Puffer durch Inhibitor ersetzt, wie nach Herstellervorgaben empfohlen. Vorab wurde mit Hilfe von Bio-Spin P-6 Spin Columns ein Pufferwechsel zu Assembly-Puffer vorgenommen werden.

A.6. RNS-Polymerase II Elongationskomplexe

- Oligomersequenzen (5' → 3', Ankerpunkte relativ zu Registerposition +1):

transkribierte DNS:

GGG TAT AGG TTT TCC AAG CTC AAG TAC TTA CGC CTG GTC ATT ACT AGT
ACT GCC GGT CAC CAT CCG TCG (herkömmliches Konstrukt, xDNS-Konstrukt)

nicht-transkribierte DNS:

GCC GAC GGA TGG TGA CCG GCA GTA CTA GTA AAC TAG TAT TGA AAG TAC
ATG AGC TTG GAA AAC CTA TAC (herkömmliches Konstrukt, xDNS-Konstrukt)

RNS:

AAC AUU ACA CGA AUA UAU AUG CAU AAA GAC CAG GC

A.6.1. Herstellung mit nicht-komplementärem RNS-DNS-Hybrid

Zu 10 µl BSA (0.1 mg/ml in Assembly-Puffer) wurden 1 µl RNS-DNS-Hybrid (RNS, nt-DNS, t-DNS je 3.3 µM) sowie 1 µl core-RNS-Polymerase II (2.1 µM) zugegeben und zusammen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Rpb4/Rpb7 (21 µM) zugefügt und erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Elongationskomplex wurde mit Hilfe einer Zentrifugen-Filtermembran (Microcon YM-100, Millipore) von ungebundenem Rpb4/Rpb7 und überschüssigem RNS-DNS-Hybrid aufgereinigt. Dazu wurde die Membran vorab mit 100 µl BSA (0.01 mg/ml in Assembly-Puffer) gegen unspezifische Adsorption beschichtet und 30 Sekunden bei 14.000 x g und 8 °C zentrifugiert. Die Membran, auf der sich noch zwischen 10 µl und 30 µl BSA befanden, wurde mit dem aufzureinigenden Elongationskomplex beschickt und mit weiteren 400 µl Assembly-Puffer verdünnt. Nach dem anschließenden Zentrifugieren bei 14.000 x g und 8 °C für drei Minuten, wurden wiederum 400 µl Assembly-Puffer zugegeben und es wurde abermals bei 14.000 x g und 8 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Zwischenzeitlich mußte das Auffanggefäß ersetzt werden. Zur Rückgewinnung des nun aufgereinigten Elongationskomplexes, wurde die Membran invertiert, in ein frisches Auffanggefäß gesteckt und bei 1.000 x g für 4 Minuten zentrifugiert.

Eine Konzentration des Elongationskomplexes konnte aufgrund der Anwesenheit des stabilisierenden BSA nicht bestimmt werden. Das Protokoll ist allgemeingültig für alle eingesetzten Längen der RNS bzw. DNS.

A.6.2. Herstellung mit natürlichem RNS-DNS-Hybrid

Es wurden 1 μl RNS-Polymerase II (3 μM) mit 1 μl natürlichem RNS-DNS-Hybrid (RNS, t-DNS je 5 μM) zu 10 μl BSA (0.1 mg/ml, verdünnt in Assembly-Puffer) gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 μl nicht-transkribierte DNS (15 μM) dazugegeben und für weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte analog zu den nicht-komplementären RNS-DNS-Hybriden.

Das Protokoll ist allgemeingültig für alle eingesetzten Längen der RNS bzw. DNS.

A.6.3. Herstellung mit markiertem Rpb4/Rpb7

4 μl einer Lösung von BSA (0.1 mg/ml in Assembly-Puffer) wurden vorgelegt, mit 1 μl RNS-DNS-Hybrid (RNS, nt-DNS, t-DNS je 3.3 μM) sowie 1 μl core-RNS-Polymerase II (2.1 μM) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 7 μl markiertes Rpb4/Rpb7 (3.3 μM) zugegeben und nochmals 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte analog zu den nicht-komplementären RNS-DNS-Hybriden.

A.6.4. Transkriptionsreaktion der Elongationskomplexe

In einem Gesamtvolumen von 25 μl wurden 1 μl Elongationskomplex und 2.5 μl Nukleotid-Mix (rU, rA, rG je 10 mM) in Assembly-Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

Die Vorschrift gilt für beide Varianten der Elongationskomplexe und alle RNS-DNS-Hybride gleichermaßen.

A.6.5. Ablösen der RNS-Polymerase vom Elongationskomplex

In einem Gesamtvolumen von 12 μl wurden 5 μl Rad26-R881 (100 nM) und 5 μl Elongationskomplex (xDNS1-RNS17) in Assembly-Puffer verdünnt und mit 2 mM ATP versetzt. Die Reaktionsdauer betrug zehn Minuten bzw. eine Stunde bei Raumtemperatur. Um die Aktivität möglicher RNasen zu inhibieren, wurden analog dazu Ansätze mit 2 μl Superase-In (10 U/ μl , Ambion) durchgeführt.

Die Proben wurden anschließend auf einem nicht-denaturierendem Polyacrylamid-Gel (5 %) analysiert.

A.6.6. Ablösen der Untereinheit Rpb4/Rpb7 durch Binden des Rad26

Für die Untersuchung des Verdrängens der Untereinheit Rpb4/Rpb7 aus dem Elongationskomplex mußte die Gesamtfluoreszenz von drei verschiedenen Meßreihen miteinander verglichen werden. Als Referenz für maximal erreichbare Fluoreszenz wurden 15 µl Elongationskomplex (DNS1-RNS17) mit Alexa647-markiertem Rpb4/Rpb7 durch Zugabe von 45 µl Assembly-Puffer auf 60 µl Gesamtvolumen verdünnt. 15 µl einer zweiten Kontrollprobe wurden mit 18 µl Assembly-Puffer auf 33 µl Gesamtvolumen verdünnt, während eine Meßprobe mit 12 µl Rad26 (500 nM) und 6 µl Assembly-Puffer versetzt wurde. Zu einer zweiten Probe wurden statt dessen 12 µl Rad26 (500 nM) sowie 6 µl ATP (10 mM) gegeben. Es folgte jeweils eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Reaktionsmischungen wurden jeweils auf Zentrifugenfiltermembranen (Microcon YM-100, Millipore) gegeben und mit weiteren 27 µl Puffer auf 60 µl Gesamtvolumen gebracht. Danach wurde manuell solange bei 14.000 x g zentrifugiert bis 10 µl auf der Membran verblieben waren. Dementsprechend befanden sich im Durchlauf 50 µl. Es wurden weitere 60 µl Assembly-Puffer hinzugefügt und abermals bei 14.000 x g zentrifugiert bis sich sowohl auf der Membran wie auch im Durchlauf jeweils 60 µl Lösung befanden. Der Überstand auf der Membran wurde durch Invertieren in ein frisches Gefäß zentrifugiert (1.000 x g, 4 Minuten).

Generell wurde von allen Proben ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum von 560 - 700 nm bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm aufgenommen und durch Integration dessen Gesamtintensität berechnet. Die Integrationszeit wurde auf 0.5 Sekunden pro Wellenlänge gesetzt. Außer für die Referenz mußten alle Spaltbreiten auf 750 µm gestellt werden. Für die Referenz selbst genügten 500 µm.

A.7. Ensemble-Fluoreszenz-Messungen

A.7.1. Generelle Einstellungen am Fluoreszenz-Spektrometer

Bevor Messungen am Fluoreszenz-Spektrometer durchgeführt werden konnten, mußte das Gerät mindestens 30 Minuten auf Betriebstemperatur gebracht werden.

Wegen des verwendeten Photomultipliers durfte die Konzentration nicht beliebig hoch gewählt werden, aber auch die Spaltbreiten der Monochromatoren mußten auf das Sättigungsverhalten des Detektors angepaßt werden. Die Zählrate wurde bei den FRET-Messungen somit zwischen 60.000 und 120.000 Photonen pro Sekunde gehalten, bei den Anisotropie-Messungen zwischen 50.000 und 80.000 Photonen pro Sekunde, da keine ma-

thematische Korrektur des Sättigungsverhaltens angewendet werden konnte. Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen wie beschrieben gewählt. Außerdem wurden folgende Einstellungen am Fluoreszenz-Spektrometer vorgenommen.

▪ **Spaltbreiten:**

Anisotropie-Messungen:

Beide Spaltbreiten wurden auf 400 - 600 μm gestellt, je nach Polarisation des Anregungsstrahls und eingesetzter Konzentration.

FRET-Messungen:

Am Anregungsmonochromator betragen sie zwischen 110 μm und 165 μm , was einer spektralen Auflösung von 2 nm bzw. 3 nm entspricht. Am Emissionsmonochromator wurden sie deutlich höher gewählt zwischen 350 μm und 400 μm .

▪ **Probenraum:**

Der Küvettenhalter wurde bei den Messungen zum SSO1653 mit Hilfe eines Wasserbades geheizt. Vor jeder Messung wurde jeweils 30 Sekunden bis zur Temperaturkonstanz gewartet.

▪ **Küvette:**

Es wurden ausschließlich Ultramikroküvetten aus Quarzglas (Suprasil) mit 50 μl Nominalvolumen (60 μl effektiv) und einer Apertur von 3 mm verwendet. Nach jeder Messung wurde die Probe wieder entfernt und die Küvette fünf Mal mit Reinstwasser gespült.

▪ **Spektrenaufnahme:**

Alle Spektren wurden mit einer Schrittweite von 1 nm aufgenommen. Die interne Referenzdiode blieb deaktiviert.

A.8. Anisotropie-Messungen

Sämtliche Anisotropie-Messungen wurden mit identischen Parametern am Spektrometer durchgeführt. Nur die Anregungswellenlänge und die untersuchten Emissionsbereiche wurden entsprechend der verwendeten Farbstoffe angepaßt. Die Polarisatoren wurden von der Steuerungssoftware automatisch eingestellt.

A.8.1. Aufnahme des G-Faktors

Der G-Faktor konnte komfortabel durch eine eingebaute Funktion der Software bestimmt werden und wurde pro Meßreihe einmal aufgenommen und gespeichert. Dazu wurde der Polarisator des Anregungsstrahlengangs auf 0° gestellt, worauf zwei Emissionsspektren aufgezeichnet wurden, einmal mit dazu senkrechter Polarisation und einmal mit

paralleler Ausrichtung. Die Zählrate des Photomultipliers wurde bei der Kombination $0^\circ / 0^\circ$ mit Hilfe der Spaltbreiten auf etwa 50.000 bis 80.000 Photonen pro Sekunde eingestellt.

A.8.2. Aufnahme der Anisotropie-Spektren

Die Berechnung der Anisotropie bei gegebenem G-Faktor wurde durch die Steuerungssoftware automatisch übernommen. Der Anregungspolarisator wurde dafür auf 90° gestellt, worauf je ein Emissionsspektrum mit senkrechter und paralleler Polarisation aufgezeichnet wurde. Die Zählrate mußte für die Kombination $90^\circ / 90^\circ$ mit Hilfe der Spaltbreiten auf 50.000 bis 80.000 Photonen pro Sekunde eingeregelt werden. Die Integrationszeit betrug 0.3 Sekunden pro Wellenlänge.

A.8.3. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

- Oligomersequenz (5' → 3'): TAMRA-TAT TTA TGA AAC TTT TCC GGT TTA A

A.8.3.1. Dissoziationskonstante des SSO1653 in Abwesenheit von Nukleotiden

In einem Gesamtvolumen von 60 μl wurden 6.25 nM dsDNS (25 bp) mit einer steigenden Konzentration an SSO1653 zusammengegeben und in ATPase-Puffer für 30 Minuten inkubiert. Jeweils zwei Meßreihen wurden sowohl bei Raumtemperatur wie auch bei 40°C gemessen. Die Schritte der Verdünnungsreihe wurden wie folgt gewählt: 0 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM, 1200 nM. Die folgende Tabelle (Tab. 19) gibt einen Überblick über die eingesetzten Mengen an Protein, DNS und weiteren Zusatzstoffen.

Dissoziationskonstante SSO1653	
	Volumen [μl]
Protein (100 nM - 2400 nM)	30
DNS (25 nM)	15
DTT (10 mM)	6
ATPase-Puffer (1x)	9
Gesamtvolumen	60

Tab. 19: Übersicht über das Protokoll zur Bestimmung der Dissoziationskonstante von SSO1653.

Alle Bestandteile wurden vorab in ATPase-Puffer verdünnt.

Aus allen Anisotropiewerten der Emissionswellenlängen 570 - 610 nm wurde der Mittelwert gebildet, der global über die beiden Meßreihen mittels folgender Funktion angenähert wurde.

$$r_{Probe} = r_{Ref} + \frac{(r_{100\%} - r_{Ref}) \cdot P_{total}^n}{K_d^n + P_{total}^n}$$

Gl. 53

r_{Probe} steht für den Meßwert der untersuchten Probe, r_{Ref} ist konstant und gibt die Anisotropie an, die die Probe vor der Zugabe von Protein aufweist. $r_{100\%}$ wird extrapoliert und beschreibt die Proteinkonzentration in der Sättigung. P ist die eingesetzte Proteinkonzentration in nM, K_d ist die gesuchte Dissoziationskonstante und n steht für den Hill Koeffizienten. Da kein kooperatives Verhalten zu Grunde liegt, wurde der Koeffizient fix auf 1 gestellt.

A.8.3.2. Dissoziationskonstante des SSO1653 in Anwesenheit von Nukleotiden

Zu 6.25 nM dsDNS (25 bp) wurden zwei unterschiedliche Proteinkonzentrationen (100 nM und 200 nM) gegeben und in ATPase-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 5 Minuten vor jeder Messung wurden die Proben zusätzlich mit jeweils 1 mM Nukleotid versetzt. Jeweils zwei Meßreihen wurden bei Raumtemperatur und bei 40 °C gemessen. Die Tab. 19 für die Messung ohne Nukleotide gilt analog, wobei statt reinem ATPase-Puffer 9 µl Nukleotid-Lösung (6.67 mM in ATPase-Puffer) eingesetzt wurde.

Die Anisotropiewerte wurden über die Emissionswellenlängen 570 - 610 nm gemittelt und global über die vier Meßwerte der beiden Konzentrationen mit folgender Funktion angenähert.

$$K_d = \left(\frac{(r_{100\%} - r_{Ref}) \cdot P_{total}^n}{r_{Probe} - r_{Ref}} - P_{total}^n \right)^{1/n}$$

Gl. 54

Für $r_{100\%}$ und r_{Ref} wurden die jeweiligen Werte aus der Bestimmung ohne Nukleotide verwendet. Die Proteinkonzentration P ist unterdessen bekannt, während für den Hill-Koeffizienten weiter 1 eingesetzt wurde.

A.8.3.3. Dissoziationskonstante des Rad26 in Abwesenheit von Nukleotiden

In insgesamt 60 µl Assembly-Puffer wurden 5 nM dsDNS (25 bp) bzw. ssRNS (26 b) mit zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (250 nM, 2 µM) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Tabelle Tab. 20 gibt detaillierten Aufschluß über die eingesetzten Mengen.

Dissoziationskonstante Rad26	
	Volumen [µl]
Protein (500 nM bzw. 4 µM)	30
DNS (20 nM)	15
Assembly-Puffer (1x)	15
Gesamtvolumen	60

Tab. 20: Übersicht über das Protokoll zur Bestimmung der Dissoziationskonstante von Rad26.

Alle Bestandteile wurden vorab in Assembly-Puffer verdünnt. Die Anisotropiewerte wurden über die Emissionswellenlängen 570 - 610 nm gemittelt und in folgende Funktion eingesetzt:

$$K_d = \left(\frac{(r_{2\mu M} - r_{Ref}) \cdot P_{total}^n}{r_{250nM} - r_{Ref}} - P_{total}^n \right)^{1/n}$$

Gl. 55

Die Anisotropiewerte der beiden Probenkonzentrationen sowie einer separat gemessenen Nullprobe wurden entsprechend eingesetzt. Die Proteinkonzentration P war 250 nM, der Hill-Koeffizient n wurde auf 1 festgesetzt.

A.8.4. Interaktionen des Rad26 mit dem Elongationskomplex

A.8.4.1. Bewegung der DNS durch Binden des Rad26

In einem Gesamtvolumen von 60 µl Assembly-Puffer wurden 30 µl Elongationskomplex (Alexa647-DNS1-RNS17) mit 30 µl Rad26 (100 nM) unter Zusatz von 2 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Kontrollmessungen wurden mit dem freien RNS-DNS-Hybrid sowie dem Elongationskomplex ohne ATP durchgeführt. Die Anisotropiewerte der einzelnen Meßreihen von 660 - 720 nm wurden gemittelt und miteinander verglichen.

A.8.4.2. Bewegung der RNS durch Binden des Rad26

Analog zu der Bewegung der DNS wurden 30 µl Elongationskomplex (DNS1-RNS17-TAMRA) mit 30 µl Rad26 (100 nM) und 2 mM ATP in Assembly-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Kontrollmessungen wurden analog durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Meßreihen nach Zugabe von 1 U/µl RNase-Inhibitor (Superase-In, Ambion)

wiederholt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Mittelwerte der Anisotropien zwischen 570 - 610 nm.

A.8.4.3. Binden des Rad26 an den Elongationskomplex

Zu 30 μl mit Alexa647 markiertem Rad26 (10 nM) wurden 30 μl core-RNS-Polymerase II (400 nM) gegeben und in Assembly-Puffer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle wurde auf die Zugabe der RNS-Polymerase II verzichtet und das Volumen durch Puffer ersetzt. Alle Anisotropiewerte der einzelnen Meßreihen wurden zwischen 660 - 720 nm gemittelt und miteinander verglichen.

A.9. Ensemble-FRET-Messungen am SSO1653

A.9.1. Zusammensetzung der Proben

Insgesamt wurde für jede Mutante des SSO1653 eine Meßreihe aus fünf verschiedenen Zusammensetzungen erstellt. Frisch markiertes Protein wurde dazu in einer Konzentration von 250 nM mit ggf. 120 nM DNS und 670 μM Nukleotiden zusammengegeben und bei 60 °C gemessen. Im Fall von AlF_3 wurden zusätzlich 1.33 mM AlCl_3 sowie 6.66 mM NaF eingesetzt.

Die folgende Tabelle Tab. 21 gibt einen Überblick über die eingesetzten Mengen an Protein, DNS sowie Nukleotiden und weiteren Zusatzstoffen.

Ensemble-FRET-Messungen SSO1653				
	- DNS	+ DNS	+ DNS + Nukleotide	+ DNS + ADP / AlF_3
Protein (7.5×10^{-7} M)	20	20	20	20
DNS (0.5 mg/ μl)	0	2.5	2.5	2.5
ATP-Analoga (20 mM)	0	0	2	2
NaF(400 mM) + AlCl_3 (40 mM)	0	0	0	1 + 2
ATPase-Puffer (10x)	6	6	6	6
H_2O	34	31.5	29.5	26.5
Gesamtvolumen	60	60	60	60

Tab. 21: Übersicht des Protokolls zu den Ensemble-Fluoreszenzmessungen an SSO1653.

Es wurde immer der verdünnte Puffer vorgelegt, dann das Protein zugegeben und erst anschließend die DNS. Erst unmittelbar vor der eigentlichen Aufnahme der Spektren wurden die Nukleotide eingesetzt.

A.9.2. Aufnahme der Fluoreszenzspektren

- **Polarisatoren:**

Alle Messungen wurden unter dem magischen Winkel von 54.7° durchgeführt, um polarisationsbedingte Artefakte ausschließen zu können. Dazu wurde der Polarisator im Anregungsstrahlengang auf 90° gestellt, der im Emissionsstrahlengang auf 35.3° . Dadurch fiel anders als bei $0^\circ / 54.7^\circ$ deutlich mehr Anregungslicht auf die Probe.

- **Spektrenaufnahme:**

Die Integrationszeit pro Wellenlänge betrug 0.2 Sekunden. Nicht für jede Meßreihe waren letztendlich die gleichen Spektren nötig:

Emissionsspektrum 540 - 700 nm, Anregung 530 nm

Emissionsspektrum 640 - 700 nm, Anregung 630 nm (außer Donor-markierte Proben)

Anregungsspektrum 500 - 560 nm, Emission 570 nm (nur Donor-markierte Proben)

Anregungsspektrum 500 - 660 nm, Emission 670 nm (nur Akzeptor-markierte Proben)

A.10. Einzelmolekül-Messungen

A.10.1. Reinigung und Beschichtung der Glasplatten

Objektträger aus Quarzglas ($76 \times 26 \times 1$ mm, G. Finkenbeiner bzw. H. Baumbach) wurden an zwei vordefinierten Stellen mit Diamant-beschichteten Spezialbohrern ($\varnothing 0.75$ mm, UKAM) durchbohrt. Damit im späteren Verlauf die Kammer nur mit Hilfe der Gravitation befüllt werden konnte, befanden sich die beiden Löcher nicht parallel auf einer Höhe, sondern versetzt zueinander.

Anschließend wurden die Objektträger in einer Lösung aus konzentrierter Salzsäure (HCl, 37 % und Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30 %) im Verhältnis 1:3 bis zum vollständigen Abreagieren eingelegt. Nach dem Spülen mit VE-Wasser, wurden sie zusammen mit den Deckgläsern (24×60 mm, Marienfeld) in eine Lösung aus Hellmanex II (Hellma) in Reinstwasser (2 Vol. %) getaucht, die bis zum Sieden erwärmt wurde. Nach dreimaligem Spülen mit siedendem Reinstwasser wurden beide Gläserarten im Stickstoffstrom getrocknet. Verbleibende Partikel wurden mit einem Butangasbrenner oxidiert.

Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger in eine Lösung aus (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (Sigma-Aldrich) in Aceton (2 Vol.-%) eingelegt und dort 30 Minuten silanisiert. Danach wurden sie erneut mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Als nächstes wurden die Objektträger mit einer Lösung aus mPEG-Succinimidyl-Carbonat (40 Gew.-%, 5.000 Da, Laysan Bio) und Biotin-PEG-Succinimidyl-Carbonat (1 Gew.-%, 5.000 Da, Laysan Bio) in Carbonat-Bicarbonat-Puffer bedeckt und eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger erneut mit Reinstwasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der PEG-Mischungen stark variiert, da aufgrund der Einstellung verschiedener Produkte nicht dauerhaft auf das Originalprotokoll zurückgegriffen werden konnte. Hauptsächlich davon betroffen war das nicht-funktionalisierte PEG-Derivat, das von ursprünglichem mPEG-Succinimidyl-Propionat über -Carboxymethyl zu -Carbonat und -Valerat gewechselt wurde. Erkennbare Unterschiede ließen sich unterdessen nie feststellen. Gleiches gilt für die biotinylierte Variante, bei dem zusätzlich das verwendete Molekulargewicht von 3.400 Da auf 5.000 Da erhöht wurde.

A.10.2.Zusammenbau der Flußkammer

Mit Hilfe einer Metallmaske wurde ein Kanal (45 x 3.5 mm) aus einem Stück Nescofilm (Carl Roth) herausgeschnitten, der sodann auf dem beschichteten Objektträger plazierte wurde und die beiden anfangs hergestellten Bohrlöcher verband. Darauf wurde ein zuvor gereinigtes Deckglas gelegt und manuell fixiert. Dieser noch lose Verbund wurde nachfolgend auf eine 120 °C - 150 °C heiße Heizplatte aufgebracht und für 30 Sekunden erhitzt. In dieser Zeit wurde von oben mit Hilfe von Metallstangen und -platten ein möglichst großer und gleichmäßiger Druck aufgebaut, um den Sandwichkomplex so weit wie möglich zusammenzupressen. Aufgrund der Erwärmung schmilzt nämlich der Nescofilm und bildet einen Kanal. Die Flußkammer wurde nach dem Abkühlen in einen dafür vorgesehenen Metallhalter eingespannt, sodaß die Bohrlöcher auf die Gewindebohrungen im Halter zentriert waren. In diese Schraubgewinde wurden anschließend durchhöhlte Madenschrauben gedreht, um einen zuvor darin eingefädelt Silikonschlauch (Innen-Ø: 0.8 mm, Außen-Ø: 2.4 mm, Saint-Gobain Verneret) an die noch offene Seite der Bohrlöcher anzubringen. Der Schlauch mußte dazu etwa 0.5 mm - 1 mm aus den Madenschrauben herausragen, um die Bohrlöcher vollständig abdichten zu können. Die Zu- und Ablaufschläuche (Innen-Ø: 0.58 mm, Außen-Ø: 0.96 mm, SIMS Portex) wurden danach in die Silikonschläuche gesteckt und auf etwa 15 cm Länge geschnitten.

A.10.3. Befüllung der Flußkammer

Zur Prüfung auf Dichtigkeit wurde jede Kammer zunächst mit PBS (pH 7.4) gespült. Dafür wurde eine Spritze auf den Ablaufschlauch montiert, während der Zulauf in einem Vorratsgefäß hing. Durch Aufziehen der Spritze wurde soviel PBS in die Kammer gesogen, daß sie vollkommen frei von Luftblasen war. Als nächstes wurden 100 µl einer Lösung aus NeutrAvidin (Invitrogen) in PBS (0.5 mg/ml) in die Flußkammer eingeleitet und für 10 Minuten inkubiert. Das überschüssige NeutrAvidin wurde durch Spülen mit weiteren 100 µl PBS wieder herausgewaschen, worauf der für den jeweiligen Versuch nötige Puffer eingesogen wurde.

A.10.4. Einbau und Positionierung der Flußkammer

Die mit Puffer befüllte Kammer wurde über eine montierbare Stange auf einen Mikrometertisch befestigt, während die am Ablaufschlauch befestigte Spritze in eine Spritzenpumpe (PHD 2000 Infuse/Withdraw, Harvard Instruments) eingebaut wurde. Nachdem mit Hilfe des Fokussierstrahls im Aufbau die Probenoberfläche fokussiert worden war, wurde mit Hilfe aller drei verfügbaren Anregungsquellen (Cobolt Calypso, Spectra-Physics Excelsior, Coherent CUBE) unerwünschte restliche Hintergrund-Fluoreszenz gebleicht. Dazu wurde die Kammer in 100 µm Schritten rasterartig verschoben, während ein Abschnitt (70 x 35 µm²) für jeweils fünf Sekunden bei maximaler Leistung der Laser (491 nm:50 mW, 532 nm:100 mW, 637 nm:25 mW) beleuchtet wurde.

A.10.5. Probenbeladung der Flußkammer

Die jeweiligen Proben wurden entweder direkt immobilisiert (Elongationskomplexe, biotinyliertes SSO1653) oder über ein vorab gebundenes Substrat wie beispielsweise biotinylierte DNS oder RNS (SSO1653) angebracht. Für jede Art der Immobilisierung wurde das jeweilige System in die Flußkammer eingeleitet und für 10 Minuten inkubiert, worauf ungebundene Moleküle durch Spülen mit mindestens 100 µl des jeweiligen Puffers herausgewaschen wurden. Generell wurde die Kammer vor jedem Einleiten einer neuen Substanz mit mindestens 100 µl Puffer gespült.

A.10.5.1. Probenbeladung für SSO1653 (Immobilisierung an DNS)

Im ersten Schritt wurden 250 pM dsDNS (100 bp) in ATPase-Puffer (pH 5.5) in die Kammer eingeleitet, inkubiert und gespült. Anschließend wurden 500 pM markiertes SSO1653 eingefüllt, abermals inkubiert und gespült.

A.10.5.2. Probenbeladung für biotinyliertes SSO1653 (direkte Immobilisierung)

Es wurden 150 pM biotinyliertes SSO1653 in ATPase-Puffer (pH 5.5) in die Kammer eingeführt, inkubiert und gespült.

A.10.5.3. Probenbeladung für Elongationskomplexe

Elongationskomplex allein wurde gemessen, indem 100 µl einer 1:1000 verdünnten Lösung des aufgereinigten Komplexes in Assembly-Puffer in die Flußkammer eingeleitet, inkubiert und gespült wurden. Transkription innerhalb der Kammer wurde über die Zufuhr von 100 µl einer 1 mM ATP-Lösung in Assembly-Puffer gestartet. Hiernach wurde zur Inkubation jedoch nicht gespült. Die Anregungsquellen blieben unterdessen ausgeschaltet.

A.10.5.4. Probenbeladung für Elongationskomplexe und Rad26

Nach der analogen Immobilisierung einer 1:1000 verdünnten, aufgereinigten Elongationskomplexes in Assembly-Puffer wurde gespült, worauf die Kammer mit einer 1 nM Lösung von Rad26 wahlweise mit und ohne 1 mM ATP in Assembly-Puffer beschickt wurde. Es fand kein weiteres Spülen statt, die Anregungsquellen wurden abgeschaltet.

A.10.5.5. Probenbeladung für Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse

Es wurden 50 pM ssDNS (4-fach markiert mit Atto532) in PBS-Puffer (pH 7.4) in die Kammer eingeleitet, inkubiert und gespült.

A.10.6. Aufnahme der Meßvideos

Die Parameter im Steuerprogramm (iXon und SOLIS V4.0 - V4.3) der Kamera (DU-897BV und DU-887BV, Andor) wurden bis auf die Aufnahmedauer nicht variiert. Je nach eingesetztem Farbstoff wurden zwischen 25 und 40 Sekunden aufgezeichnet bei einer Bildwiederholrate von 10 Hz. Die übrigen Parameter waren wie folgt:

SETUP ACQUISITION

Setup CCD:

Acquisition Mode: Kinetic

Triggering: Internal

Readout Mode: Image

Exposure Time: 0.1015 secs.

Number of Accumulations: 1
Accumulation Cycle Time: 0.1015 secs
Kinetic Series Length: 250 - 400
Kinetic Cycle Time: 0.10324 secs.
Number of prescans: 0
Frame Transfer: Yes
Baseline Clamp: No
Vertical Pixel Shift Speed: 3.3 μ s
Vertical Clock Voltage Amplitude: Normal
Readout Rate: 3 MHz at 14-bit
Pre-Amplifier Gain: 4.6x (DU-887BV) bzw. 5x (DU-897BV)
Output Amplifier: Electron multiplying
Electron Multiplier Gain Enabled: Yes
Electron Multiplier DAC Setting: 225

Binning:

Sub Image: 512 x 512 (Full)
Binning: 1 x 1
Auto-Save:
Enabled: Yes
Append AutoIncrement: Yes
Start Value: 1
Pad Width: 1

Spooling:

Enable Spooling: No
Image Orientation:
90 degree rotation: None
Flip Horizontally: No
Flip Vertically: No

Video Mode:

Use Settings from Setup CCD: Yes
Moving Calculation: Average 1 Image Store Size
Photon Counting:
Photon Counting Enable: No

SHUTTER CONTROL:

Permanently OPEN
TTL level required to open your shutter: High
Time to open /close (ms): 10/5

TEMPERATURE:

Temperature Setting: - 85 °C

Cooler: On

Cooler On at program startup: Yes

FAN CONTROL:

Fan speed: High

Alle weiteren veränderbaren Optionen wirkten sich nur auf die Erscheinung bzw. nicht auf die Aufzeichnung der Rohdaten aus und können auf den jeweiligen Benutzer individuell eingestellt werden.

Aufnahmen mit alternierenden Anregungsquellen wurden immer mit einer abwechselnden Sequenz (532 nm – 637 nm – 532 nm...) durchgeführt.

A.10.7.Intensität der Anregungsquellen

Licht der Wellenlänge 491 nm wurde ausschließlich zur Vorbehandlung und zum Bleichen der Oberflächen verwendet bei der maximalen Leistung von etwa 2 kW/cm². Licht mit 532 nm Wellenlänge wurde auf etwa 1 kW/cm² eingeregelt, während die Leistung des Lichts bei 637 nm nur 0.2 kW/cm² betrug.

A.11. Burst-Analysis Messungen

A.11.1.Zusammensetzung der Proben

In 10 µl ATPase-Puffer (pH 5.5) wurden 20 pM markiertes SSO1653 mit 200 nM dsDNS (25 bp) vermischt und bei Raumtemperatur gemessen. ATP und ADP wurden zu je 1 mM eingesetzt.

A.11.2.Aufnahme und Auswertung der Konfokal-Messungen

Für eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Aufbaus und die Auswertung der Daten wird auf Literatur verwiesen[163, 212].

B. Literaturverzeichnis

1. Crick, F., *Central Dogma of Molecular Biology*. Nature, 1970. 227(5258): p. 561-563.
2. Andrecka, J., et al., *Single-molecule tracking of mRNA exiting from RNA polymerase II*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(1): p. 135-140.
3. Sudarsanam, P. and F. Winston, *The Swi/Snf family: nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control*. Trends in Genetics, 2000. 16(8): p. 345-351.
4. Pazin, M.J. and J.T. Kadonaga, *SWI2/SNF2 and Related Proteins: ATP-Driven Motors That Disrupt-Protein-DNA Interactions?* Cell, 1997. 88(6): p. 737-740.
5. Cairns, B.R., et al., *A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. 91(5): p. 1950-1954.
6. Peterson, C.L. and J.W. Tamkun, *The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine?* Trends in Biochemical Sciences, 1995. 20(4): p. 143-146.
7. Becker, P.B. and W. Horz, *ATP-DEPENDENT NUCLEOSOME REMODELING*. Annual Review of Biochemistry, 2002. 71(1): p. 247-273.
8. Imbalzano, A.N., et al., *Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA*. Nature, 1994. 370(6489): p. 481-485.
9. Gorbalenya, A.E. and E.V. Koonin, *Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships*. Current Opinion in Structural Biology, 1993. 3(3): p. 419-429.
10. Flaus, A., et al., *Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs*. Nucl. Acids Res., 2006. 34(10): p. 2887-2905.
11. Lusser, A. and J.T. Kadonaga, *Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines*. BioEssays, 2003. 25(12): p. 1192-1200.
12. Richmond, E. and C.L. Peterson, *Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2*. Nucl. Acids Res., 1996. 24(19): p. 3685-3692.
13. Travers, A.A., *The reprogramming of transcriptional competence*. Cell, 1992. 69(4): p. 573-575.
14. Cote, J., et al., *Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex*. Science, 1994. 265(5168): p. 53-60.
15. Henikoff, S., *Transcriptional activator components and poxvirus DNA-dependent ATPases comprise a single family*. Trends in Biochemical Sciences, 1993. 18(8): p. 291-292.
16. Auble, D.T., et al., *Molecular analysis of the SNF2/SWI2 protein family member MOT1, an ATP-driven enzyme that dissociates TATA-binding protein from DNA*. Mol. Cell. Biol., 1997. 17(8): p. 4842-4851.
17. Svejstrup, J.Q., *Rescue of arrested RNA polymerase II complexes*. J Cell Sci, 2003. 116(3): p. 447-451.
18. Carlson, M. and B.C. Laurent, *The SNF/SWI family of global transcriptional activators*. Current Opinion in Cell Biology, 1994. 6(3): p. 396-402.
19. Licht, C.L., T. Stevensner, and V.A. Bohr, *Cockayne Syndrome Group B Cellular and Biochemical Functions*. The American Journal of Human Genetics, 2003. 73(6): p. 1217-1239.
20. Sukhodolets, M.V., et al., *RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription*. Genes Dev., 2001. 15(24): p. 3330-3341.
21. Park, J.-S., M.T. Marr, and J.W. Roberts, *E. coli Transcription Repair Coupling Factor (Mfd Protein) Rescues Arrested Complexes by Promoting Forward Translocation*. Cell, 2002. 109(6): p. 757-767.
22. Cairns, B.R., et al., *RSC, an Essential, Abundant Chromatin-Remodeling Complex*. Cell, 1996. 87(7): p. 1249-1260.

23. Hamiche, A., et al., *Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(25): p. 14316-14321.
24. Varga-Weisz, P.D., et al., *Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II*. Nature, 1997. 388(6642): p. 598-602.
25. Ito, T., et al., *ACF, an ISWI-Containing and ATP-Utilizing Chromatin Assembly and Remodeling Factor*. Cell, 1997. 90(1): p. 145-155.
26. Fan, H.-Y., et al., *Swapping Function of Two Chromatin Remodeling Complexes*. Molecular Cell, 2005. 17(6): p. 805-815.
27. Miki, H., Y. Okada, and N. Hirokawa, *Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function*. Trends in Cell Biology, 2005. 15(9): p. 467-476.
28. Hodge, T. and M.J. Cope, *A myosin family tree*. J Cell Sci, 2000. 113(19): p. 3353-3354.
29. Varga-Weisz, P.D. and P.B. Becker, *Chromatin-remodeling factors: machines that regulate?* Current Opinion in Cell Biology, 1998. 10(3): p. 346-353.
30. Osley, M.A., T. Tsukuda, and J.A. Nickoloff, *ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2007. 618(1-2): p. 65-80.
31. Haushalter, K.A. and J.T. Kadonaga, *Chromatin assembly by DNA-translocating motors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(8): p. 613-620.
32. Jaskelioff, M., et al., *SWI-SNF-Mediated Nucleosome Remodeling: Role of Histone Octamer Mobility in the Persistence of the Remodeled State*. Mol. Cell. Biol., 2000. 20(9): p. 3058-3068.
33. Bazett-Jones, D.P., et al., *The SWI/SNF Complex Creates Loop Domains in DNA and Polynucleosome Arrays and Can Disrupt DNA-Histone Contacts within These Domains*. Mol. Cell. Biol., 1999. 19(2): p. 1470-1478.
34. Havas, K., et al., *Generation of Superhelical Torsion by ATP-Dependent Chromatin Remodeling Activities*. Cell, 2000. 103(7): p. 1133-1142.
35. Längst, G. and P.B. Becker, *Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2004. 1677(1-3): p. 58-63.
36. Fan, H.-Y., et al., *Distinct Strategies to Make Nucleosomal DNA Accessible*. Molecular Cell, 2003. 11(5): p. 1311-1322.
37. Alexeev, A., A. Mazin, and S.C. Kowalczykowski, *Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament*. Nat Struct Mol Biol, 2003. 10(3): p. 182-186.
38. Citterio, E., et al., *ATP-Dependent Chromatin Remodeling by the Cockayne Syndrome B DNA Repair-Transcription-Coupling Factor*. Mol. Cell. Biol., 2000. 20(20): p. 7643-7653.
39. Subramanya, H.S., et al., *Crystal structure of a DExx box DNA helicase*. Nature, 1996. 384(6607): p. 379-383.
40. Kim, J.L., et al., *Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding*. Structure, 1998. 6(1): p. 89-100.
41. Velankar, S.S., et al., *Crystal Structures of Complexes of PcrA DNA Helicase with a DNA Substrate Indicate an Inchworm Mechanism*. Cell, 1999. 97(1): p. 75-84.
42. Soutanas, P., et al., *Uncoupling DNA translocation and helicase activity in PcrA: direct evidence for an active mechanism*. EMBO J., 2000. 19(14): p. 3799-3810.
43. Jaskelioff, M., et al., *Rad54p Is a Chromatin Remodeling Enzyme Required for Heteroduplex DNA Joint Formation with Chromatin*. J. Biol. Chem., 2003. 278(11): p. 9212-9218.
44. Game, J.C. and R.K. Mortimer, *A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1974. 24(3): p. 281-292.
45. Symington, L.S., *Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2002. 66(4): p. 630-670.
46. Klein, H.L., *RDH54, a RAD54 Homologue in Saccharomyces cerevisiae, Is Required for Mitotic Diploid-Specific Recombination and Repair and for Meiosis*. Genetics, 1997. 147(4): p. 1533-1543.
47. Shinohara, M., et al., *Characterization of the Roles of the Saccharomyces cerevisiae RAD54 Gene and a Homologue of RAD54, RDH54/TID1, in Mitosis and Meiosis*. Genetics, 1997. 147(4): p. 1545-1556.

48. Kanaar, R., et al., *Human and mouse homologs of the Saccharomyces cerevisiae RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation*. *Current Biology*, 1996. 6(7): p. 828-838.
49. Tanaka, K., et al., *Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54*. *Nucl. Acids Res.*, 2002. 30(6): p. 1346-1353.
50. Petukhova, G., et al., *Yeast Rad54 Promotes Rad51-dependent Homologous DNA Pairing via ATP Hydrolysis-driven Change in DNA Double Helix Conformation*. *J. Biol. Chem.*, 1999. 274(41): p. 29453-29462.
51. Swagemakers, S.M.A., et al., *The Human Rad54 Recombinational DNA Repair Protein Is a Double-stranded DNA-dependent ATPase*. *J. Biol. Chem.*, 1998. 273(43): p. 28292-28297.
52. Van Komen, S., et al., *Superhelicity-Driven Homologous DNA Pairing by Yeast Recombination Factors Rad51 and Rad54*. *Molecular Cell*, 2000. 6(3): p. 563-572.
53. Ristic, D., et al., *The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98(15): p. 8454-8460.
54. Amitani, I., R.J. Baskin, and S.C. Kowalczykowski, *Visualization of Rad54, a Chromatin Remodeling Protein, Translocating on Single DNA Molecules*. *Molecular Cell*, 2006. 23(1): p. 143-148.
55. Nimonkar, A.V., et al., *Single Molecule Imaging of Tid1/Rdh54, a Rad54 Homolog That Translocates on Duplex DNA and Can Disrupt Joint Molecules*. *J. Biol. Chem.*, 2007. 282(42): p. 30776-30784.
56. Firman, K. and M.D. Szczelkun, *Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement*. *EMBO J.*, 2000. 19(9): p. 2094-2102.
57. Raoul Tan, T.L., R. Kanaar, and C. Wyman, *Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination*. *DNA Repair*, 2003. 2(7): p. 787-794.
58. Petukhova, G., S. Stratton, and P. Sung, *Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins*. *Nature*, 1998. 393(6680): p. 91-94.
59. Jiang, H., et al., *Direct Association between the Yeast Rad51 and Rad54 Recombination Proteins*. *J. Biol. Chem.*, 1996. 271(52): p. 33181-33186.
60. Clever, B., et al., *Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins*. *EMBO J.*, 1997. 16: p. 2535-2544.
61. Mazin, A.V., A.A. Alexeev, and S.C. Kowalczykowski, *A Novel Function of Rad54 Protein. STABILIZATION OF THE Rad51 NUCLEOPROTEIN FILAMENT*. *J. Biol. Chem.*, 2003. 278(16): p. 14029-14036.
62. Alexiadis, V. and J.T. Kadonaga, *Strand pairing by Rad54 and Rad51 is enhanced by chromatin*. *Genes Dev.*, 2002. 16(21): p. 2767-2771.
63. Dürr, H., et al., *X-Ray Structures of the Sulfolobus solfataricus SWI2/SNF2 ATPase Core and Its Complex with DNA*. *Cell*, 2005. 121(3): p. 363-373.
64. Guzder, S.N., et al., *RAD26, the Yeast Homolog of Human Cockayne's Syndrome Group B Gene, Encodes a DNA-dependent ATPase*. *J. Biol. Chem.*, 1996. 271(31): p. 18314-18317.
65. van Gool, A.J., et al., *RAD26, the functional S. cerevisiae homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6*. *EMBO J.*, 1994. 13(22): p. 5361-5369.
66. Verhage, R.A., et al., *Double mutants of Saccharomyces cerevisiae with alterations in global genome and transcription-coupled repair*. *Mol. Cell. Biol.*, 1996. 16(2): p. 496-502.
67. Tijsterman, M. and J. Brouwer, *Rad26, the Yeast Homolog of the Cockayne Syndrome B Gene Product, Counteracts Inhibition of DNA Repair Due to RNA Polymerase II Transcription*. *J. Biol. Chem.*, 1999. 274(3): p. 1199-1202.
68. Lee, S.-K., et al., *Requirement for Yeast RAD26, a Homolog of the Human CSB Gene, in Elongation by RNA Polymerase II*. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. 21(24): p. 8651-8656.
69. Li, S. and M.J. Smerdon, *Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 2002. 21(21): p. 5921-5929.
70. Tijsterman, M., et al., *Transitions in the coupling of transcription and nucleotide excision repair within RNA polymerase II-transcribed genes of Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. 94(15): p. 8027-8032.
71. Jansen, L.E.T., et al., *Spt4 modulates Rad26 requirement in transcription-coupled nucleotide excision repair*. *EMBO J.*, 2000. 19(23): p. 6498-6507.

72. Teng, Y. and R. Waters, *Excision repair at the level of the nucleotide in the upstream control region, the coding sequence and in the region where transcription terminates of the Saccharomyces cerevisiae MFA2 gene and the role of RAD26*. Nucl. Acids Res., 2000. 28(5): p. 1114-1119.
73. You, Z., W.J. Feaver, and E.C. Friedberg, *Yeast RNA Polymerase II Transcription In Vitro Is Inhibited in the Presence of Nucleotide Excision Repair: Complementation of Inhibition by Holo-TFIID and Requirement for RAD26*. Mol. Cell. Biol., 1998. 18(5): p. 2668-2676.
74. Lee, S.-K., et al., *Yeast RAD26, a Homolog of the Human CSB Gene, Functions Independently of Nucleotide Excision Repair and Base Excision Repair in Promoting Transcription through Damaged Bases*. Mol. Cell. Biol., 2002. 22(12): p. 4383-4389.
75. Yu, S.-L., et al., *The Stalling of Transcription at Abasic Sites Is Highly Mutagenic*. Mol. Cell. Biol., 2003. 23(1): p. 382-388.
76. Zhou, W. and P.W. Doetsch, *Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. 90(14): p. 6601-6605.
77. Viswanathan, A. and P.W. Doetsch, *Effects of Nonbulky DNA Base Damages on Escherichia coli RNA Polymerase-mediated Elongation and Promoter Clearance*. J. Biol. Chem., 1998. 273(33): p. 21276-21281.
78. Woudstra, E.C., et al., *A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage*. Nature, 2002. 415(6874): p. 929-933.
79. Gregory, S.M. and K.S. Sweder, *Deletion of the CSB homolog, RAD26, yields Spt- strains with proficient transcription-coupled repair*. Nucl. Acids Res., 2001. 29(14): p. 3080-3086.
80. Yu, S., et al., *RAD9, RAD24, RAD16 and RAD26 are required for the inducible nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers from the transcribed and non-transcribed regions of the Saccharomyces cerevisiae MFA2 gene*. Mutation Research/DNA Repair, 2001. 485(3): p. 229-236.
81. Li, S., et al., *The roles of Rad16 and Rad26 in repairing repressed and actively transcribed genes in yeast*. DNA Repair, 2007. 6(11): p. 1596-1606.
82. Citterio, E., et al., *Biochemical and Biological Characterization of Wild-type and ATPase-deficient Cockayne Syndrome B Repair Protein*. J. Biol. Chem., 1998. 273(19): p. 11844-11851.
83. Selby, C.P. and A. Sancar, *Human Transcription-Repair Coupling Factor CSB/ERCC6 Is a DNA-stimulated ATPase but Is Not a Helicase and Does Not Disrupt the Ternary Transcription Complex of Stalled RNA Polymerase II*. J. Biol. Chem., 1997. 272(3): p. 1885-1890.
84. Christiansen, M., et al., *The Cockayne syndrome group B protein is a functional dimer*. FEBS Journal, 2005. 272(17): p. 4306-4314.
85. Beerens, N., et al., *The CSB Protein Actively Wraps DNA*. J. Biol. Chem., 2005. 280(6): p. 4722-4729.
86. Newman, J.C., A.D. Bailey, and A.M. Weiner, *Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. 103(25): p. 9613-9618.
87. Balajee, A.S., et al., *Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B-cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. 94(9): p. 4306-4311.
88. Dianov, G.L., et al., *Reduced RNA polymerase II transcription in extracts of cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome cells*. Nucl. Acids Res., 1997. 25(18): p. 3636-3642.
89. Proietti-De-Santis, L., P. Drané, and J.-M. Egly, *Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation*. EMBO J., 2006. 25(9): p. 1915-1923.
90. Selby, C.P. and A. Sancar, *Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. 94(21): p. 11205-11209.
91. van Gool, A.J., et al., *The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex*. EMBO J., 1997. 16(19): p. 5955-5965.
92. Tantin, D., A. Kansal, and M. Carey, *Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes*. Mol. Cell. Biol., 1997. 17(12): p. 6803-6814.

93. Dianov, G., et al., *Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells.* Nucl. Acids Res., 1999. 27(5): p. 1365-1368.
94. Tuo, J., et al., *The Cockayne Syndrome Group B Gene Product Is Involved in General Genome Base Excision Repair of 8-Hydroxyguanine in DNA.* J. Biol. Chem., 2001. 276(49): p. 45772-45779.
95. Tuo, J., et al., *The Cockayne Syndrome Group B Gene Product Is Involved in Cellular Repair of 8-Hydroxyadenine in DNA.* J. Biol. Chem., 2002. 277(34): p. 30832-30837.
96. Tuo, J., et al., *Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress.* FASEB J., 2003. 17(6): p. 668-674.
97. Stevnsner, T., et al., *The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging.* Mechanisms of Ageing and Development, 2008. 129(7-8): p. 441-448.
98. Stevnsner, T., et al., *Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B.* Oncogene, 2002. 21(57): p. 8675-8682.
99. Bradsher, J., et al., *CSB Is a Component of RNA Pol I Transcription.* Molecular Cell, 2002. 10(4): p. 819-829.
100. Tantin, D., *RNA Polymerase II Elongation Complexes Containing the Cockayne Syndrome Group B Protein Interact with a Molecular Complex Containing the Transcription Factor IIH Components Xeroderma Pigmentosum B and p62.* J. Biol. Chem., 1998. 273(43): p. 27794-27799.
101. Iyer, N., et al., *Interactions Involving the Human RNA Polymerase II Transcription/Nucleotide Excision Repair Complex TFIIH, the Nucleotide Excision Repair Protein XPG, and Cockayne Syndrome Group B (CSB) Protein.* Biochemistry, 1996. 35(7): p. 2157-2167.
102. Yuan, X., et al., *Activation of RNA Polymerase I Transcription by Cockayne Syndrome Group B Protein and Histone Methyltransferase G9a.* Molecular Cell, 2007. 27(4): p. 585-595.
103. Christiansen, M., et al., *Functional consequences of mutations in the conserved SF2 motifs and post-translational phosphorylation of the CSB protein.* Nucl. Acids Res., 2003. 31(3): p. 963-973.
104. Hoeijmakers, J.H.J., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.* Nature, 2001. 411(6835): p. 366-374.
105. Lindahl, T. and R.D. Wood, *Quality Control by DNA Repair.* Science, 1999. 286(5446): p. 1897-1905.
106. Hakem, R., *DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly.* EMBO J, 2008. 27(4): p. 589-605.
107. Cline, S.D. and P.C. Hanawalt, *Who's on first in the cellular response to DNA damage?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(5): p. 361-373.
108. Hanawalt, P.C. and G. Spivak, *Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(12): p. 958-970.
109. Bohr, V.A., et al., *DNA repair in an active gene: Removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall.* Cell, 1985. 40(2): p. 359-369.
110. Mellon, I., G. Spivak, and P.C. Hanawalt, *Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene.* Cell, 1987. 51(2): p. 241-249.
111. Mellon, I., et al., *Preferential DNA repair of an active gene in human cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. 83(23): p. 8878-8882.
112. Selby, C.P. and A. Sancar, *Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline.* Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1994. 58(3): p. 317-329.
113. Tornaletti, S., D. Reines, and P.C. Hanawalt, *Structural Characterization of RNA Polymerase II Complexes Arrested by a Cyclobutane Pyrimidine Dimer in the Transcribed Strand of Template DNA.* J. Biol. Chem., 1999. 274(34): p. 24124-24130.
114. Svejstrup, J.Q., *Mechanisms of transcription-coupled DNA repair.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(1): p. 21-29.
115. Nospikel, T., *Nucleotide excision repair and neurological diseases.* DNA Repair, 2008. 7(7): p. 1155-1167.
116. Selby, C.P. and A. Sancar, *Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. 88(18): p. 8232-8236.
117. Fousteri, M., et al., *Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo.* Molecular Cell, 2006. 23(4): p. 471-482.

118. Verhage, R.A., et al., *Transcription elongation factor S-II is not required for transcription-coupled repair in yeast*. Molecular and General Genetics MGG, 1997. 254(3): p. 284-290.
119. Tremeau-Bravard, A., et al., *Fate of RNA Polymerase II Stalled at a Cisplatin Lesion*. J. Biol. Chem., 2004. 279(9): p. 7751-7759.
120. Morris, P.D. and K.D. Raney, *DNA Helicases Displace Streptavidin from Biotin-Labeled Oligonucleotides*. Biochemistry, 1999. 38(16): p. 5164-5171.
121. Byrd, A.K. and K.D. Raney, *Protein displacement by an assembly of helicase molecules aligned along single-stranded DNA*. Nat Struct Mol Biol, 2004. v11(n6): p. 531-538.
122. Byrd, A.K. and K.D. Raney, *Displacement of a DNA binding protein by Dda helicase*. Nucl. Acids Res., 2006. 34(10): p. 3020-3029.
123. Sarker, A.H., et al., *Recognition of RNA Polymerase II and Transcription Bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: Insights for Transcription-Coupled Repair and Cockayne Syndrome*. Molecular Cell, 2005. 20(2): p. 187-198.
124. Brueckner, F., et al., *CPD Damage Recognition by Transcribing RNA Polymerase II*. Science, 2007. 315(5813): p. 859-862.
125. Brégeon, D., et al., *Transcriptional Mutagenesis Induced by Uracil and 8-Oxoguanine in Escherichia coli*. Molecular Cell, 2003. 12(4): p. 959-970.
126. Bregman, D.B., et al., *UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. 93(21): p. 11586-11590.
127. Lommel, L., M.E. Bucheli, and K.S. Sweder, *Transcription-coupled repair in yeast is independent from ubiquitylation of RNA pol II: Implications for Cockayne's syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(16): p. 9088-9092.
128. Reid, J. and J.Q. Svejstrup, *DNA Damage-induced Def1-RNA Polymerase II Interaction and Def1 Requirement for Polymerase Ubiquitylation in Vitro*. J. Biol. Chem., 2004. 279(29): p. 29875-29878.
129. Anindya, R., O. Aygün, and J.Q. Svejstrup, *Damage-Induced Ubiquitylation of Human RNA Polymerase II by the Ubiquitin Ligase Nedd4, but Not Cockayne Syndrome Proteins or BRCA1*. Molecular Cell, 2007. 28(3): p. 386-397.
130. Groisman, R., et al., *The Ubiquitin Ligase Activity in the DDB2 and CSA Complexes Is Differentially Regulated by the COP9 Signalosome in Response to DNA Damage*. Cell, 2003. 113(3): p. 357-367.
131. Groisman, R., et al., *CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome*. Genes & Development, 2006. 20(11): p. 1429-1434.
132. Svejstrup, J.Q., *Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation*. Trends in Biochemical Sciences, 2007. 32(4): p. 165-171.
133. Herschel, J.F.W., No. I. *On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1845. 135: p. 143-145.
134. Jabłoński, A., *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1935. 94(1): p. 38-46.
135. Kasha, M., *Characterization of electronic transitions in complex molecules*. Disc. Faraday Soc., 1950. 9: p. 14 - 19.
136. Stokes, G.G., *On the Change of Refrangibility of Light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1852. 142: p. 463-562.
137. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. 437(1-2): p. 55-75.
138. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed. 1999, New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
139. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967. 58(2): p. 719-726.
140. Stryer, L., *Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler*. Annual Review of Biochemistry, 1978. 47(1): p. 819-846.
141. Wu, P.G. and L. Brand, *Resonance Energy Transfer: Methods and Applications*. Analytical Biochemistry, 1994. 218(1): p. 1-13.

142. Murchie, A.I.H., et al., *Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules*. *Nature*, 1989. 341(6244): p. 763-766.
143. Clegg, R.M., D.M.J. Lilley, and J.E. Dahlberg, *Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids*, in *Methods in Enzymology*. 1992, Academic Press. p. 353-388.
144. Hickerson, R., et al., *Measurement of Internal Movements within the 30 S Ribosomal Subunit Using Förster Resonance Energy Transfer*. *Journal of Molecular Biology*, 2005. 354(2): p. 459-472.
145. Borgia, A., P.M. Williams, and J. Clarke, *Single-Molecule Studies of Protein Folding*. *Annual Review of Biochemistry*, 2008. 77(1): p. 101-125.
146. Weiss, S., *Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy*. *Nat Struct Mol Biol*, 2000. 7(9): p. 724-729.
147. Joo, C., et al., *Advances in Single-Molecule Fluorescence Methods for Molecular Biology*. *Annual Review of Biochemistry*, 2008. 77(1): p. 51-76.
148. Dale, R.E. and J. Eisinger, *Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor*. *Biopolymers*, 1974. 13(8): p. 1573-1605.
149. Haas, E., E. Katchalski-Katzir, and I.Z. Steinberg, *Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization*. *Biochemistry*, 1978. 17(23): p. 5064-5070.
150. Funatsu, T., et al., *Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution*. *Nature*, 1995. 374(6522): p. 555-559.
151. Moerner, W.E. and D.P. Fromm, *Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy*. *Review of Scientific Instruments*, 2003. 74(8): p. 3597-3619.
152. Hecht, E., *Optik*. 3. ed. 2001, München: Oldenbourg.
153. Hell, S.W., et al., *Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution*. *Applied Physics Letters*, 1994. 64(11): p. 1335-1337.
154. Axelrod, D., *Methods in Cell Biology*, ed. D. Taylor and Y. Wang. Vol. 30. 1989, New York: Academic Press.
155. Ambrose, W.P., P.M. Goodwin, and J.P. Nolan, *Single-molecule detection with total internal reflection excitation: Comparing signal-to-background and total signals in different geometries*. *Cytometry*, 1999. 36(3): p. 224-231.
156. Axelrod, D., *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology*. *Traffic*, 2001. 2(11): p. 764-774.
157. Sako, Y., S. Minoghchi, and T. Yanagida, *Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells*. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(3): p. 168-172.
158. Antos, J.M. and M.B. Francis, *Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. 10(3): p. 253-262.
159. Foley, T.L. and M.D. Burkart, *Site-specific protein modification: advances and applications*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007. 11(1): p. 12-19.
160. Jan H. van Maarseveen, J.N.H.R.J.W.B., *Transition-Metal Catalysis as a Tool for the Covalent Labeling of Proteins*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006. 45(12): p. 1841-1843.
161. Schluesche, P., et al., *NC2 mobilizes TBP on core promoter TATA boxes*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. 14(12): p. 1196-1201.
162. Eggeling, C., et al., *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. 95(4): p. 1556-1561.
163. Müller, B.K., et al., *Pulsed Interleaved Excitation*. *Biophysical Journal*, 2005. 89(5): p. 3508-3522.
164. Eggeling, C., et al., *Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection*. *Journal of Biotechnology*, 2001. 86(3): p. 163-180.
165. Harder, K.W., et al., *Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides*. *Biochem. J.*, 1994. 298(2): p. 395-401.
166. Hess, H.H. and J.E. Derr, *Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range*. *Analytical Biochemistry*, 1975. 63(2): p. 607-613.
167. Wong, I. and T.M. Lohman, *A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. 90(12): p. 5428-5432.

168. Garner, M.M. and A. Revzin, *A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system*. Nucl. Acids Res., 1981. 9(13): p. 3047-3060.
169. Fried, M. and D.M. Crothers, *Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis*. Nucl. Acids Res., 1981. 9(23): p. 6505-6525.
170. LeTilly, V. and C.A. Royer, *Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding*. Biochemistry, 1993. 32(30): p. 7753-7758.
171. Checovich, W.J., R.E. Bolger, and T. Burke, *Fluorescence polarization [mdash] a new tool for cell and molecular biology*. Nature, 1995. 375(6528): p. 254-256.
172. Conley, N.R., J.S. Biteen, and W.E. Moerner, *Cy3-Cy5 Covalent Heterodimers for Single-Molecule Photoswitching*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. 112(38): p. 11878-11880.
173. Medintz, I.L., et al., *A Reagentless Biosensing Assembly Based on Quantum Dot-Donor Förster Resonance Energy Transfer*. Advanced Materials, 2005. 17(20): p. 2450-2455.
174. Unruh, J.R., et al., *Fluorescence Properties of Fluorescein, Tetramethylrhodamine and Texas Red Linked to a DNA Aptamer*. Photochemistry and Photobiology, 2005. 81(3): p. 682-690.
175. *Fluorescence quantum yields (QY) and lifetimes (τ) for Alexa Fluor dyes - Table 1.5*. [cited 22.05.2009]; Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/tables/Fluorescence-quantum-yields-and-lifetimes-for-Alexa-Fluor-dyes.html>.
176. Unruh, J.R., et al., *Oriental Dynamics and Dye-DNA Interactions in a Dye-Labeled DNA Aptamer*. Biophysical Journal, 2005. 88(5): p. 3455-3465.
177. Hillisch, A., M. Lorenz, and S. Diekmann, *Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes*. Current Opinion in Structural Biology, 2001. 11(2): p. 201-207.
178. Edman, L., U. Mets, and R. Rigler, *Conformational transitions monitored for single molecules in solution*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. 93(13): p. 6710-6715.
179. Sofia, S.J., V. Premnath, and E.W. Merrill, *Poly(ethylene oxide) Grafted to Silicon Surfaces: Grafting Density and Protein Adsorption*. Macromolecules, 1998. 31(15): p. 5059-5070.
180. Muschielok, A., et al., *A nano-positioning system for macromolecular structural analysis*. Nat Meth, 2008. 5(11): p. 965-971.
181. Andrecka, J., et al., *Nano positioning system reveals the course of upstream and nontemplate DNA within the RNA polymerase II elongation complex*. Nucl. Acids Res., 2009: p. gkp601.
182. Mukhopadhyay, J., et al., *Translocation of ~ 70 Å with RNA Polymerase during Transcription: Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay for Movement Relative to DNA*. Cell, 2001. 106(4): p. 453-463.
183. Lilley, D.M.J. and T.J. Wilson, *Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids*. Current Opinion in Chemical Biology, 2000. 4(5): p. 507-517.
184. Myong, S., et al., *Spring-Loaded Mechanism of DNA Unwinding by Hepatitis C Virus NS3 Helicase*. Science, 2007. 317(5837): p. 513-516.
185. Kapanidis, A.N., et al., *Initial Transcription by RNA Polymerase Proceeds Through a DNA-Scrunching Mechanism*. Science, 2006. 314(5802): p. 1144-1147.
186. Itaya, K. and M. Ui, *A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate*. Clinica Chimica Acta, 1966. 14(3): p. 361-366.
187. Lentz, B.R., B.M. Moore, and D.A. Barrow, *Light-scattering effects in the measurement of membrane microviscosity with diphenylhexatriene*. Biophysical Journal, 1979. 25(3): p. 489-494.
188. Goody, R.S. and F. Eckstein, *Thiophosphate analogs of nucleoside di- and triphosphates*. Journal of the American Chemical Society, 1971. 93(23): p. 6252-6257.
189. Yount, R.G., et al., *Adenylyl imidodiphosphate, an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage*. Biochemistry, 1971. 10(13): p. 2484-2489.
190. Schliselfeld, L.H., *Binding of Adenylyl Imidodiphosphate, an Analog of Adenosine Triphosphate, to Myosin and Heavy Meromyosin*. J. Biol. Chem., 1974. 249(15): p. 4985-4989.
191. Wittinghofer, A., *Signaling mechanistics: Aluminum fluoride for molecule of the year*. Current Biology, 1997. 7(11): p. R682-R685.

192. Lindquist, R.N., J.L. Lynn, and G.E. Lienhard, *Possible transition-state analogs for ribonuclease. Complexes of uridine with oxovanadium(IV) ion and vanadium(V) ion.* Journal of the American Chemical Society, 1973. 95(26): p. 8762-8768.
193. Goodno, C.C., *Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. 76(6): p. 2620-2624.
194. Schlichting, I. and J. Reinstein, *pH influences fluoride coordination number of the AlFx phosphoryl transfer transition state analog.* Nat Struct Mol Biol, 1999. 6(8): p. 721-723.
195. Davies, D.R. and W.G.J. Hol, *The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes.* FEBS Letters, 2004. 577(3): p. 315-321.
196. Frey, P.A. and R.D. Sammons, *Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates.* Science, 1985. 228(4699): p. 541-545.
197. Du, H., et al., *PhotochemCAD;: A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry.* Photochemistry and Photobiology, 1998. 68(2): p. 141-142.
198. Dixon, J.M., M. Taniguchi, and J.S. Lindsey, *PhotochemCAD 2: A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations.* Photochemistry and Photobiology, 2005. 81(1): p. 212-213.
199. Mujumdar, R.B., et al., *Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters.* Bioconjugate Chemistry, 1993. 4(2): p. 105-111.
200. Sanborn, M.E., et al., *Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA.* The Journal of Physical Chemistry B, 2007. 111(37): p. 11064-11074.
201. Iqbal, A., et al., *Orientation dependence in fluorescent energy transfer between Cy3 and Cy5 terminally attached to double-stranded nucleic acids.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(32): p. 11176-11181.
202. Gruber, H.J., et al., *Preparation of Thiol-Reactive Cy5 Derivatives from Commercial Cy5 Succinimidyl Ester.* Bioconjugate Chemistry, 2000. 11(2): p. 161-166.
203. Thoma, N.H., et al., *Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54.* Nat Struct Mol Biol, 2005. 12(4): p. 350-356.
204. Hopfner, K.-P. and J. Michaelis, *Mechanisms of nucleic acid translocases: lessons from structural biology and single-molecule biophysics.* Current Opinion in Structural Biology, 2007. 17(1): p. 87-95.
205. Prasad, T.K., et al., *A DNA-translocating Snf2 Molecular Motor: Saccharomyces cerevisiae Rdh54 Displays Processive Translocation and Extrudes DNA Loops.* Journal of Molecular Biology, 2007. 369(4): p. 940-953.
206. Fitzgerald, D.J., et al., *Reaction cycle of the yeast Isw2 chromatin remodeling complex.* EMBO J., 2004. 23(19): p. 3836-3843.
207. Buttner, K., S. Nehring, and K.-P. Hopfner, *Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase.* Nat Struct Mol Biol, 2007. 14(7): p. 647-652.
208. Sengoku, T., et al., *Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein Drosophila Vasa.* Cell, 2006. 125(2): p. 287-300.
209. Bono, F., et al., *The Crystal Structure of the Exon Junction Complex Reveals How It Maintains a Stable Grip on mRNA.* Cell, 2006. 126(4): p. 713-725.
210. Andersen, C.B.F., et al., *Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase Bound to RNA.* Science, 2006. 313(5795): p. 1968-1972.
211. Hopfner, K.-P. and J.A. Tainer, *DNA Mismatch Repair: The Hands of a Genome Guardian.* Structure, 2000. 8(12): p. R237-R241.
212. Sharma, S., et al., *Monitoring Protein Conformation along the Pathway of Chaperonin-Assisted Folding.* Cell, 2008. 133(1): p. 142-153.
213. Westover, K.D., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, *Structural Basis of Transcription: Separation of RNA from DNA by RNA Polymerase II.* Science, 2004. 303(5660): p. 1014-1016.
214. Kettenberger, H., K.-J. Armache, and P. Cramer, *Complete RNA Polymerase II Elongation Complex Structure and Its Interactions with NTP and TFIIIS.* Cell, 2004. 16(6): p. 955-965.
215. Weber, G., *Ligand binding and internal equilibiums in proteins.* Biochemistry, 1972. 11(5): p. 864-878.

216. Bergquist, N.R. and P. Nilsson, *The conjugation of immunoglobulins with tetramethylrhodamine isothiocyanate by utilization of dimethylsulfoxide (DMSO) as a solvent*. Journal of Immunological Methods, 1974. 5(2): p. 189-198.
217. Meadows, D.L., J.S. Shafer, and J.S. Schultz, *Determining the extent of labeling for tetramethylrhodamine protein conjugates*. Journal of Immunological Methods, 1991. 143(2): p. 263-272.
218. Ravdin, P. and D. Axelrod, *Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of [alpha]-bungarotoxin: Preparation, separation, and characterization*. Analytical Biochemistry, 1977. 80(2): p. 585-592.
219. Buschmann, V., K.D. Weston, and M. Sauer, *Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes*. Bioconjugate Chemistry, 2003. 14(1): p. 195-204.
220. Atto 532. [cited 22.05.2009]; Available from: https://www.attotec.com/attotecshop/product_info.php?info=p102_ATT0-532.html&XTCSid=0k6l18kujjde5e4rr49vq9v935.
221. SantaLucia, J., *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor-thermodynamics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. 95(4): p. 1460-1465.
222. Kammermeier, H., P. Schmidt, and E. Jüngling, *Free energy change of ATP-hydrolysis: a causal factor of early hypoxic failure of the myocardium?* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1982. 14(5): p. 267-277.
223. Li, S., et al., *Modulation of Rad26- and Rpb9-mediated DNA Repair by Different Promoter Elements*. J. Biol. Chem., 2006. 281(48): p. 36643-36651.
224. Li, S., et al., *Evidence that the Transcription Elongation Function of Rpb9 Is Involved in Transcription-Coupled DNA Repair in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 2006. 26(24): p. 9430-9441.
225. Edwards, A.M., et al., *Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro*. J. Biol. Chem., 1991. 266(1): p. 71-75.
226. Miyao, T., J.D. Barnett, and N.A. Woychik, *Deletion of the RNA Polymerase Subunit RPB4 Acts as a Global, Not Stress-specific, Shut-off Switch for RNA Polymerase II Transcription at High Temperatures*. J. Biol. Chem., 2001. 276(49): p. 46408-46413.
227. Woychik, N.A. and R.A. Young, *RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth*. Mol. Cell. Biol., 1989. 9(7): p. 2854-2859.
228. Panchuk-Voloshina, N., et al., *Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates*. J. Histochem. Cytochem., 1999. 47(9): p. 1179-1188.
229. Berlier, J.E., et al., *Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates*. J. Histochem. Cytochem., 2003. 51(12): p. 1699-1712.
230. Ernst, L.A., et al., *Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups*. Cytometry, 1989. 10(1): p. 3-10.
231. Tang, G.-Q., et al., *Transcription Initiation in a Single-Subunit RNA Polymerase Proceeds through DNA Scrunching and Rotation of the N-Terminal Subdomains*. Molecular Cell, 2008. 30(5): p. 567-577.
232. Vámosi, G., C. Gohlke, and R.M. Clegg, *Fluorescence characteristics of 5-carboxytetramethylrhodamine linked covalently to the 5' end of oligonucleotides: multiple conformers of single-stranded and double-stranded dye-DNA complexes*. Biophysical Journal, 1996. 71(2): p. 972-994.
233. Kireeva, M.L., et al., *The 8-Nucleotide-long RNA:DNA Hybrid Is a Primary Stability Determinant of the RNA Polymerase II Elongation Complex*. J. Biol. Chem., 2000. 275(9): p. 6530-6536.
234. Radonjic, M., et al., *Genome-Wide Analyses Reveal RNA Polymerase II Located Upstream of Genes Poised for Rapid Response upon S. cerevisiae Stationary Phase Exit*. Molecular Cell, 2005. 18(2): p. 171-183.
235. Muse, G.W., et al., *RNA polymerase is poised for activation across the genome*. Nat Genet, 2007. 39(12): p. 1507-1511.
236. Frey, P.A. and A. Arabshahi, *Standard Free Energy Change for the Hydrolysis of the .alpha.,.beta.-Phosphoanhydride Bridge in ATP*. Biochemistry, 1995. 34(36): p. 11307-11310.
237. Jung, C., et al., *A New Photostable Terrylene Diimide Dye for Applications in Single Molecule Studies and Membrane Labeling*. Journal of the American Chemical Society, 2006. 128(15): p. 5283-5291.

-
238. Dubois, A., et al., *Photostability of dyemolecules trapped in solid matrices*. Appl. Opt., 1996. 35(18): p. 3193-3199.
239. Atto-Tec. *Recommended Procedures for Labelling*. 2009 [cited 14.06.2009]; Available from: https://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/Procedures.pdf.
240. Peneva, K., et al., *Water-Soluble Monofunctional Perylene and Terrylene Dyes: Powerful Labels for Single-Enzyme Tracking*¹³. Angewandte Chemie International Edition, 2008. 47(18): p. 3372-3375.
241. Jung, C., et al., *Photophysics of New Water-Soluble Terrylenediimide Derivatives and Applications in Biology*. ChemPhysChem, 2009. 10(1): p. 180-190.
242. Shu, D., et al., *Counting of six pRNAs of phi29 DNA-packaging motor with customized single-molecule dual-view system*. EMBO J, 2007. 27(2): p. 527-537.
243. Ulbrich, M.H. and E.Y. Isacoff, *Subunit counting in membrane-bound proteins*. Nat Meth, 2007. 4(4): p. 319-321.
244. Selvin, P.R., *The renaissance of fluorescence resonance energy transfer*. Nat Struct Mol Biol, 2000. 7(9): p. 730-734.
245. Berg, B.v.d., et al., *X-ray structure of a protein-conducting channel*. Nature, 2004. 427(6969): p. 36-44.
246. Zimmermann, R., L. Müller, and B. Wullich, *Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies*. Trends in Molecular Medicine, 2006. 12(12): p. 567-573.
247. Sambrook, J., D.W. Russell, and C.S.H. Laboratory., *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell*. 3rd. ed. ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. :. 3 v. :.

Publikationsliste

Andrecka, J., Lewis, R., Brückner, F., Lehmann, E., Cramer, P., Michaelis, J., *Single-molecule tracking of mRNA exiting from RNA polymerase II*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(1): p. 135-140.

Lewis, R., Dürr, H., Hopfner, K.-P., Michaelis, J., *Conformational changes of a Swi2/Snf2 ATPase during its mechano-chemical cycle*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(6): p. 1881-1890.

Jung, C., Ruthardt, N., Lewis, R., Michaelis, J., Sodeik, B., Nolde, F., Peneva, K., Müllen, K., Bräuchle, C., *Photophysics of New Water-Soluble Terrylenediimide Derivatives and Applications in Biology*. ChemPhysChem, 2009. **10**(1): p. 180-190.

Andrecka, J., Treutlein, B., Izquierdo Arcusa, M.A., Muschielok, A., Lewis, R., Cheung, A. C. M., Cramer, P., Michaelis, J., *Nano Positioning System reveals the course of upstream and non-template DNA within the RNA polymerase II elongation complex*, Nucleic Acids Research, advanced online publication, doi:10.1093/nar/gkp601.

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich Prof. Bräuchle aussprechen, für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die großartige Ausstattung der Labore und für die beinahe alljährlichen Grillfeste am Starnberger See.

Prof. Michaelis, möchte ich hiermit beglückwünschen, während meiner Doktorarbeit zum Professor berufen worden zu sein. Ich danke ihm für die Betreuung und für die Anleitung dieser Arbeit während der letzten 5 Jahre. Danke auch, in dieser Zeit keine Rufe von außerhalb angenommen zu haben.

Prof. Hopfner danke ich für die Unterstützung und seine Zusammenarbeit im Rahmen des SFB 646 sowie besonders für sein Mitwirken als Zweitgutachter. Prof. Cramer sei ebenfalls gedankt für seine Kollaboration in diesem Zusammenhang. Prof. Don Lamb möchte ich nicht vergessen für so manche Diskussionen und Anregungen zu meiner Arbeit.

Aus den Arbeitskreisen im Genzentrum möchte ich besonders Harald Dürr erwähnen, ohne den die Arbeiten zum SSO1653 gar nicht erst zustande gekommen wären. Axel Kirchofer und Sheng Cui sei gedankt für die Hilfestellung bei der Expression des Rad26. Ohne die Erwartung einer Gegenleistung stellten sie Unmengen an Protein bereit.

In der physikalischen Chemie möchte ich mich insbesondere bei Moritz Ehrl bedanken, der für wenig Schokolade immer ansprechbar war, sei es zur Erklärung theoretischer und praktischer Grundlagen der Physik und Chemie, sei es wegen bürokratischer Hürden, die es zu meistern galt. Durch seine stete Durchsicht der Laufzeiten meiner Verträge sicherte er auch den Erhalt meines Einkommens.

Die Werkstätten um Ralf Hiermaier, Peter Straube und Robert Leeb sowie Axel Gersdorf und Herbert Bachmeier müssen genannt werden, ohne die praktisch nichts stünde.

Meine F-Praktikanten, Diplom-Studenten etc. müssen ebenfalls unbedingt erwähnt werden, denen ich viel der hier gezeigten Resultate zu verdanken habe. Namentlich sind dies Beate Dirks, Katrin Gutsmedl, Markus Horn, Andreas Korinek, Juan Torreno Pina, Bettina Quade, Alwin Reiter, Simone Seger, Tanvi Shah und Avelino, dessen Nachname ich bis heute nicht kenne.

Von meinen Kollegen möchte ich Adam Muschielok und Peter Schwaderer hervorheben, die mir jederzeit bei noch so simplen Problemen in MATLAB Hilfestellung gegeben haben. Die Zusammenarbeit mit Gregor Heiss möchte ich erwähnen als Beweis, daß High-Tech-Forschung auch auf Bayerisch möglich ist.

Stephan Wörmke zeigte mir, wie nett „Saupreißn“ sein können. Bärbel Treutlein, Wolfgang Kügel, Stefan Paternoster und Ania Jasiak waren einfach nette Büronachbarn. Christophe Jung sei gedankt für die Zusammenarbeit bei der Publikation. Matthias Höller möchte ich danken für die Messungen mit der Burst-Analyse und für die Bilanzierung der Kaffeekasse. An Timo Lebold geht mein Dank für die Übernahme der Bestellungen für das Biolabor. Für viele Espressi bzw. Milchkaffees zum Aufwachen und zur Ablenkung danke ich Julia Blechinger. Peter Schlüsche danke ich als wunderbaren Vordenker in Sachen Setup-Verbesserung und Auswertungsmethoden. Vor allem, weil er dann auch als erster mit den vielen Fehlern zu kämpfen hatte.

Last but not least, 12 points go to Joanna „Asia“ Andrecka for a great time in the office, at the setup and for introducing me to Marta. Dziękuję bardzo.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, daß sie mir diesen Werdegang ermöglicht haben und dabei immer an mich geglaubt haben.

Den Schluß überlasse ich Marta Blamowska, my lovely biotechnologist specialised in „dinosaur modification“. Vielen Dank für Deine Arschritte, Dein Vertrauen und Deine Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Robert Alexander Lewis

Geburtsdatum: 27. Mai 1980

Geburtsort: Rosenheim

Schulische Ausbildung:

September 1990 - Juni 1999: Gymnasium Miesbach; Allg. Hochschulreife

Studium:

November 1999 - Juli 2004: Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Fachrichtung Chemie mit Abschluß Diplom

Januar 2004 - Juli 2004: Diplomarbeit
Visualisierung einzelner HepA-Moleküle auf DNA -
Entwicklung einer Methode zur Aufklärung des
transkriptionsgekoppelten Reparaturmechanismus

seit August 2004: Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl von
Prof. Dr. C. Bräuchle und Prof. Dr. J. Michaelis,
Institut für Physikalische Chemie
Bearbeitung des vorliegenden Themas