

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchung der Funktion und Dynamik
von DNA-Transkriptionsfaktoren mittels
Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

von
Peter Schlüsche
aus
Wittingen bei Knesebeck

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Don C. Lamb, PhD betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 25. Juni 2007

Peter Schlüsche

Dissertation eingereicht am	25. Juni 2007
1. Gutachter:	PD Don C. Lamb, PhD
2. Gutachter:	Prof. Dr. Michael Meisterernst
Mündliche Prüfung am	27. Juli 2007

All denen, die an mich geglaubt haben

Und am Anfang war nichts.
(W. LINDEMANN)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Der DNA-Transkriptionsprozess	5
2.1. Aufbau von Proteinen	5
2.2. Die Proteinbiosynthese	7
2.2.1. DNA-Transkription	8
2.2.2. Entstehung der funktionellen mRNA	10
2.2.3. RNA-Translation	10
2.3. Die Transkriptionsinitiierung	11
2.3.1. Der Promotor - Startpunkt der Genexpression	11
2.3.2. Bildung des Präinitiierungskomplexes	14
2.4. Das TATA-Box-Bindeprotein	17
2.4.1. Der TBP-DNA-Komplex	17
2.4.2. Mechanismus der TBP-DNA-Bindung	20
2.4.3. Bindungsorientierung von TBP an der TATA-Box	22
2.5. Regulierung der Genexpression	23
2.5.1. Regulierungsmöglichkeiten während der Transkription	23
2.5.2. Der Negative Cofaktor 2	24
2.5.3. Mechanismus der NC2-Transkriptionshemmung	26
3. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie	33
3.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	34
3.1.1. Lichtabsorption und -emission von Fluorophoren	34
3.1.2. Fluoreszenz-Anisotropie	37
3.1.3. Fluoreszenz einzelner Chromophore	41
3.2. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	44

3.2.1.	Grundlagen zum Energietransfer	44
3.2.2.	Einzelpaar-FRET	48
3.3.	Interne Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie	50
3.3.1.	Die interne Totalreflexion	50
3.3.2.	Prisma- und Objektiv-TIRFM	53
4.	Experimenteller Aufbau des TIRF-Mikroskops	59
4.1.	Der Aufbau im Überblick	59
4.2.	Prisma-TIRFM	61
4.2.1.	Fluoreszenzanregung	61
4.2.2.	Optimierung des Anregungsstrahlengangs	62
4.2.3.	Probenraum	64
4.2.4.	Fluoreszenzdetektion	65
4.2.5.	Einbau des Filtersatzes und Anwendung der Deckglaskorrektur	66
4.2.6.	Die EMCCD-Kamera	69
4.2.7.	Probenpositionierung und Flusssystem	74
4.3.	Objektiv-TIRFM und Weitfeld-Mikroskopie	77
4.4.	Durchlichtmikroskopie mit differentiellem Interferenzkontrast	80
5.	Die Datenanalyse	85
5.1.	Extraktion der Intensitätsverläufe einzelner Moleküle	86
5.2.	Analyse der Intensitätsverläufe	87
6.	spFRET-Untersuchungen der TBP-NC2-Mobilität entlang der DNA	93
6.1.	Nachweis der TBP-Mobilisierung	93
6.1.1.	Das biologische Probensystem	95
6.1.2.	Anpassung der Flusskammer	97
6.1.3.	Probenvorbereitung	99
6.1.4.	Experimentelle Durchführung und Bestimmung der Korrekturfaktoren	100
6.1.5.	Konstanter Energietransfer beim TBP-DNA-Komplex	103
6.1.6.	Dynamischer FRET-Verlauf nach NC2-Zugabe	105
6.1.7.	Detaillierte Beobachtung der TBP-NC2-Dynamik	108
6.1.8.	Identische Ergebnisse mit verlängerter DNA	111

6.1.9. Gleiche Wirkung von NC2 am modifizierten AdML-Promotor	114
6.1.10. Reichweite der TBP-NC2-Mobilität	118
6.2. Kontrollexperimente	121
6.2.1. Wirkung der TOA-Vorinkubation	121
6.2.2. Untersuchung der TBP-Bindungsspezifität an die TATA-Box .	124
6.2.3. Unterschiedliche DNA-Markierungspositionen und andere Akzeptorfarbstoffe	125
6.2.4. Photophysik des FRET-Farbstoffpaares	127
6.2.5. Orientierung der FRET-Fluorophore	130
6.3. Diskussion der Ergebnisse zur Wirkung von NC2	135
7. Zusammenfassung	139
8. Ausblick	143
Literaturverzeichnis	148
A. Herstellung von Flusskammern mit PEG-modifizierter Prismaoberfläche	165
A.1. Reinigung der TIRFM-Prismen	165
A.2. Herstellung neuer Flusskammern	166
B. Übersicht der verwendeten EMCCD-Kameraeinstellungen	169
C. Alternativer Filtersatz für die Messapparatur	171
D. Markieren von TBP mit Atto532-Maleimid	173
E. DNA-Sequenzen und Akzeptor-Markierungspositionen	175
F. Effekt von κ^2 auf den möglichen Bereich der FRET-Effizienz	177

1. Einleitung

Alle gegenwärtig bekannten Lebewesen basieren auf der gleichen morphologischen Einheit, der Zelle. Jede Zelle stellt für sich ein autonomes System dar, das in der Lage ist, die als zelluläre Bausteine benötigten Biomoleküle selbständig herzustellen oder von außen aufzunehmen. Viele dieser Biomoleküle sind Proteine, die neben strukturelle auch biokatalysatorische Funktionen in der Zelle übernehmen und auf molekularer Ebene sogar komplexe Maschinerien oder aktive Motoren, z. B. zur Lastenbeförderung, darstellen können. Die Forschung zur zellulären Synthese der Proteine sowie zur Regulierung dieser Synthese - und damit auch die Forschung zum Verständnis der molekularen Steuerung der Lebewesen selbst - ist spätestens seit der Entschlüsselung der Struktur des Erbguts 1953 durch Watson und Crick [1] eine der zentralsten Themen der Lebenswissenschaften. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zum besseren Verständnis dieser Regulierung der Proteinbiosynthese auf einer molekular-mechanistischen Ebene dar.

Proteine sind Biopolymere und setzen sich aus Aminosäureketten zusammen. Die lineare Abfolge der Aminosäuren in diesen Ketten legt die dreidimensionale Struktur der entstehenden Biomoleküle fest. Aus der räumlichen Proteinstruktur wiederum ergibt sich die Funktion des Proteins. Die Baupläne für die lineare Abfolge der Aminosäuren sind in jeder Zelle als Basenpaar-Reihenfolge der Desoxyribonukleinsäure-Moleküle (DNA) gespeichert. Das Auslesen (Transkription) und Übersetzen (Translation) der verschlüsselten DNA-Informationsabschnitte (Gene) in die spätere Aminosäuresequenz stellen die zwei Hauptschritte der Proteinbiosynthese dar.

Um möglichst effizient mit den zur Verfügung stehenden Energie- und Materialressourcen zu haushalten, produzieren Zellen nicht willkürlich eine große Menge von unterschiedlichsten Proteinen, um stets jede Art von biomolekularer Funktion

ausführen zu können. Stattdessen synthetisieren sie nur die Proteine, die zum jeweiligen Zeitpunkt tatsächlich benötigt werden. Dies setzt die Möglichkeit zur präzisen Regulierung der Expressionsaktivität für die abzulesenden Gene voraus.

Der initiiierende Schritt der Genexpression in eukaryotischen Zellen ist die Basensequenz-spezifische Bindung des TATA-Box-Bindeproteins (TBP) an den Sequenzanfang des zu transkribierenden DNA-Abschnitts. Zur Steuerung der Genaktivität ist es daher für die Zelle besonders effektiv zum Zeitpunkt der TBP-Bindung bereits in den Ablauf der Proteinsynthese einzugreifen. So kann durch den Einsatz von verschiedenen Cofaktor-Proteinen die DNA-Transkription beeinflusst werden. Der Negative Cofaktor 2 (NC2) [2] z. B. zeigt u. a. einen hemmenden Effekt auf den Transkriptionsprozess, indem er an den initiiierenden TBP-DNA-Komplex bindet [3]. Bei jüngsten biochemischen Untersuchungen zur Wirkung von NC2 wurden von Prof. Dr. Michael Meisterernst und seinen Mitarbeitern dynamische Effekte am TBP-DNA-NC2-Komplex entdeckt, die dem bisher statischen Bild der NC2-Transkriptionshemmung widersprechen. Die Ergebnisse der Untersuchungen wiesen auf eine TBP-Mobilisierung entlang des DNA-Doppelstranges hin, welche durch die NC2-Bindung ausgelöst wird [4].

Zur detaillierten Analyse dieser Proteindynamik wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro*-Experiment entwickelt, das es ermöglicht, die Bewegungen von TBP auf der DNA direkt an individuellen Molekülen zu untersuchen. Die Beobachtung einzelner Moleküle bietet dabei gegenüber den herkömmlichen Ensemble-Untersuchungen entscheidende Vorteile. Durch den Wegfall einer stochastischen Mittelung über die ganze Probe, werden auch seltene Ereignisse auf molekularer Ebene sichtbar, wodurch der Informationsgehalt von Einzelmolekül-Untersuchungen deutlich höher ist als bei Ensemble-Messungen. Eine zeitliche Synchronisierung zur Analyse von dynamischen Abläufen in der Probe ist bei der Beobachtung von einzelnen Molekülen überflüssig. Bei einem heterogenen Probenverhalten ist es mit Einzelmolekül-Untersuchungen außerdem möglich, die Probenmoleküle zu sortieren und die Subpopulationen separat zu analysieren.

Um eine mögliche Bewegung einzelner TBP-Moleküle auf der DNA detektieren zu können, werden die Untersuchungen mit Hilfe eines ultra-sensitiven Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine nicht-invasive Untersuchungsmethode dar, die auch eine Beobachtung von einzelnen Biomolekülen

in lebenden Zellen ermöglicht. Eine besonders hohe Empfindlichkeit bei der Fluoreszenzmikroskopie wird durch die Fluorophoranregung mit interner Totalreflexion erreicht (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*, TIRFM) [5]. Im Gegensatz zur ebenfalls sehr empfindlichen Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie ist TIRFM eine Mikroskopiemethode, bei der das Einzelmolekül-aufgelöste Fluoreszenzsignal von vielen Probenkomplexen simultan detektiert werden kann. Mit einer zusätzlichen Immobilisierung der Probenkomplexe können durch TIRFM-Messungen auch zeitliche Verläufe von dynamischen Ereignissen an individuellen Molekülen untersucht werden.

Zur Detektion von solchen dynamischen Prozessen in biologischen Probesystemen wird häufig die Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) [6] angewandt. Bei dieser Spektroskopiemethode wird in einem Abstand von nur 10 - 100 Å Energie von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen, das die Energie anschließend als Fluoreszenz abgibt. Werden die Fluoreszenzemissionen von Donor und Akzeptor spektral getrennt detektiert, so kann die Effizienz des erfolgten Energietransfers ermittelt werden. Die FRET-Effizienz ist jedoch im hohen Maße abhängig vom Abstand zwischen den beiden Fluorophoren. Diese Abhängigkeit kann zur molekularen Abstandsmessung an einzelnen Molekülen genutzt werden [7]. Zur Untersuchung einer möglichen TBP-Bewegung entlang der DNA aufgrund der NC2-Bindung wird das TBP mit einem Donor-Fluorophor und die DNA mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert. Eine Bewegung von TBP sollte wegen der Abhängigkeit vom Fluorophorabstand durch Änderungen im zeitlichen Verlauf der FRET-Effizienz erkennbar sein.

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Einzelmolekül-FRET-Untersuchungen zur Wirkung von NC2 auf den Transkriptions-initiiierenden Komplex aus TBP und DNA präsentiert. Zunächst werden hierzu im Kapitel 2 die biologischen Grundlagen zu den einzelnen Prozessen der Proteinbiosynthese dargestellt. Das TATA-Box-Bindeprotein sowie der Negative Cofaktor 2 werden im Detail erläutert. Das Kapitel 3 behandelt die Grundlagen zur Fluoreszenzspektroskopie, zum Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer und zur TIRF-Mikroskopie. Der experimentelle Aufbau für die Einzelmolekül-Untersuchungen wird in Kapitel 4 vorgestellt. Kapitel 5 erläutert die Analyse der gesammelten FRET-Daten. Die Ergebnisse der durch-

geführten Untersuchungen werden in Kapitel 6 präsentiert und mit den Ergebnissen der Kontrollexperimente diskutiert. Kapitel 7 fasst diese Arbeit zusammen und das Kapitel 8 gibt abschließend einen Ausblick auf weitere Untersuchungen am TBP-DNA-NC2-System, die für die nahe Zukunft geplant sind.

2. Der DNA-Transkriptionsprozess

Die vorliegende Forschungsarbeit befasst sich mit der Untersuchung von dynamischen Regulationsmechanismen im Initiierungsprozess der eukaryotischen Genexpression. Zu Beginn werden deshalb im Folgenden die einleitenden Grundlagen über die Biochemie von Proteinen und ihrer zellulären Herstellung gegeben. In diesem umfassenden Kontext wird anschließend im Detail der Genexpressionsbeginn sowie die daran beteiligten Interaktionen des TATA-Box-Bindeprotein und des Negativen Cofaktors 2 erläutert und der Stand dieses Forschungsgebietes dargestellt.

2.1. Aufbau von Proteinen

Proteine sind natürliche Makromoleküle, die aus Polypeptidketten aufgebaut sind und hauptsächlich aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff sowie (seltener) aus Schwefel bestehen. Sie bilden die Grundlage zum Bestehen und Funktionieren von Zellen. Sie dienen dabei nicht nur als strukturgebende Bausteine, sondern sind auch die zellmolekularen Maschinen, welche Stoffe transportieren, Ionen pumpen, biochemische Reaktionen katalysieren und Signalstoffe erkennen oder selber darstellen.

Die Grundbausteine der Proteine sind die proteinogenen Aminosäuren, von denen bis jetzt 23 unterschiedliche Verbindungen bekannt sind, wovon 20 im menschlichen Organismus vorkommen. Diese organischen Moleküle, die mindestens eine Carboxyl- und eine Aminogruppe aufweisen, können über eine so genannte Peptidbindung miteinander verbunden werden und so ein langkettiges Biopolymer bilden, dessen unterschiedliche Enden als C-(carboxy-) bzw. N-(amino-)Terminus bezeichnet werden (Abb. 2.1). Aminosäureketten haben daher eine Richtung, die für die Funktion dieser Biopolymere von entscheidender Bedeutung ist [8]. Je nach Länge dieser Aminosäurekette wird zwischen Oligopeptiden (< 20 Aminosäuren), Polypeptiden

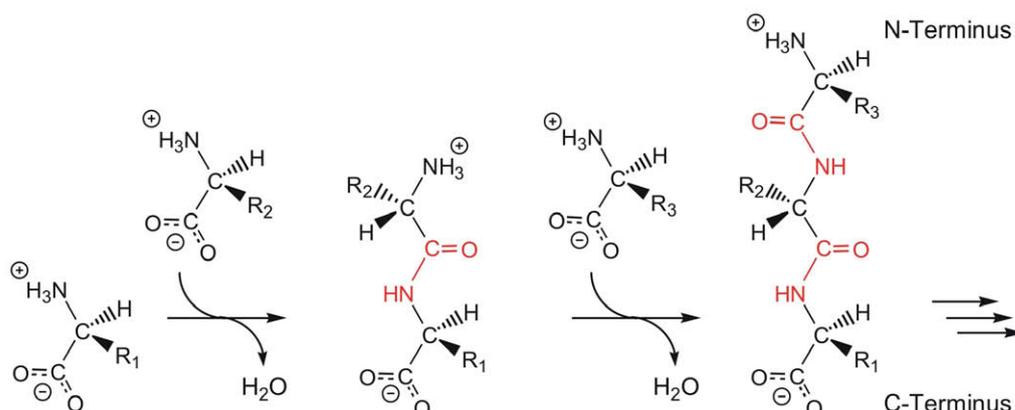


Abbildung 2.1.: Wachstum einer Polypeptidkette. Bei der Bildung einer Peptidbindung (rot gekennzeichnet) aus Carboxyl- und Aminogruppe wird ein Molekül Wasser frei. Die über- oder unterhalb der Ebene des Peptidrückgrats stehenden Aminosäurereste (R_{1-3}) sind entscheidend für die unterschiedliche Form und Funktion der Biopolymere. Die Richtung der Aminosäurekette kann durch Angabe des C- und N-Terminus kenntlich gemacht werden.

($20 < x < 100$ Aminosäuren) und Proteinen (> 100 Aminosäuren) unterschieden. Einzelne Ketten aus Polypeptiden können bis zu 2.000 Aminosäuren enthalten und weisen ein Molekulargewicht von bis zu 220.000 Da¹ auf (mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure: 110 Da).

Die strukturierte räumliche Anordnung des Biopolymers, die zum fertigen Protein führt, wird in vier verschiedenen Ebenen unterteilt. Die lineare Abfolge der unterschiedlichen Aminosäuren stellt die Primärstruktur dar. Neben der einfachen Sequenz zählen auch Disulfidbrücken, die zu Cystin-Bindungen führen, zu dieser Strukturebene. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureresten führen zu α -Helices, β -Faltblättern, β -Kehre oder Haarnadelschleife sowie Ω -Schleife und bilden die Sekundärstruktur der Proteine. Als Tertiärstruktur wird die räumliche Anordnung dieser Sekundärstrukturelemente zueinander bezeichnet. So falten sich z. B. wasserlösliche Proteine in wässrigen Medien zu kompakten Strukturen, bei denen die hydrophoben Aminosäurereste ins Proteininnere und die hydrophilen Seitenketten nach Außen gerichtet sind (Hydrophober Effekt, der durch die zunehmende Entropie der freiwerdenden Wassermoleküle an-

¹Dalton (Da) ist eine nach John Dalton (1766 - 1844) benannte (nicht SI-konforme) Masseneinheit, die hauptsächlich in der Biochemie Anwendung findet. Ein Dalton entspricht einer atomaren Masseneinheit (1 Da = 1 u).

getrieben wird). Besteht ein Protein aus mehreren Untereinheiten, so ergibt sich die Quartärstruktur des Proteins aus der Verbindung und Anordnung der einzelnen Untereinheiten [8, 9]. Zur Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur werden die Methoden der Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) und der Röntgenstrukturanalyse (RSA) angewendet. Bei den NMR-Methoden können die Struktur und die Dynamik von Proteinen mit einer molekularen Masse von bis zu 60 kDa in hochkonzentrierten Lösungen analysiert werden. Bei der höher auflösenden RSA (bis zu 2 Å) müssen die Proteine hingegen in kristalliner Form vorliegen.

2.2. Die Proteinbiosynthese

Die native Struktur eines Proteins ist bereits mit seiner Primärstruktur festgelegt. Die Information zu dieser Aminosäuresequenz ist als Basenpaarabfolge der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) gespeichert. Die DNA setzt sich als Doppelhelix aus vier unterschiedlichen Nukleotiden zusammen, welche wiederum aus den Watson-Crick-Basenpaaren Adenin (A) - Thymin (T) und Cytosin (C) - Guanin (G), sowie einem Phosphat-Zucker-Grundgerüst bestehen [1, 10] (Abb. 2.2). Die Basensequenz, die ein funktionsfähiges Proteinmolekül codiert, wird als Gen bezeichnet.

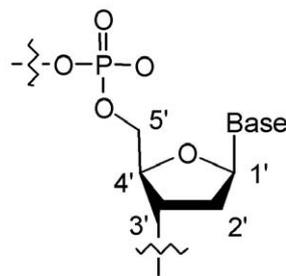


Abbildung 2.2.: Das Schema eines Nukleotids als Baustein der DNA. Das Grundgerüst eines jeden DNA-Nukleotids ist die Phosphat-Desoxyribose-Verbindung. Am Pentosering ist eine der vier Basen (A, T, C oder G) gebunden. Zur Orientierung entlang des DNA-Stranges ist die Nummerierung der Pentose entscheidend. So enthält jeder DNA-Strang ein 5'- und ein 3'-Ende.

Die Proteinbiosynthese ist der zelluläre Vorgang, der aus der Information eines Gens ein Protein entstehen lässt. Er teilt sich in die zwei Hauptschritte TRANSKRIPTION und TRANSLATION. Beim ersten Schritt wird die Geninformation in

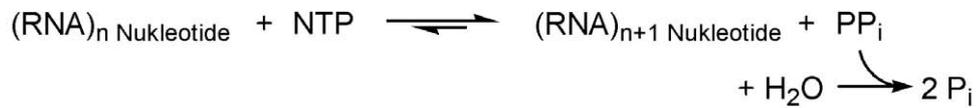
eine transportable Sequenz aus Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) umgeschrieben, welche dann im zweiten Schritt in die Aminosäurekette übersetzt wird, die das Protein ergibt. Die Abbildung 2.3 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte in eukaryotischen Zellen (Zellen mit membranumhülltem Zellkern).

2.2.1. DNA-Transkription

In eukaryotischen Zellen wird zu Beginn der Proteinbiosynthese im Kernplasma die Doppelhelix der DNA mit Hilfe von Helikasen über eine Länge von 17 Basenpaaren (bp) entwunden. Die RNA-Polymerase II² ist ein großes Makromolekül mit einer Masse von mehr als 500 kDa, das aus 12 Untereinheiten besteht [11]. Es bildet zusammen mit einer Reihe anderer Proteine am Sequenzbeginn (Promotor) des Gens auf der DNA einen enzymalen Komplex, der die Synthese der so genannten Botschafter-Ribonukleinsäure (*messenger-RNA*, mRNA) initiiert (vgl. hierzu Abschnitt 2.3). Wie die DNA bestehen auch RNA-Moleküle aus Nukleotiden wie sie in Abbildung 2.2 gezeigt sind. Bei der RNA sind die Riboseeinheiten jedoch nicht desoxygeniert, sondern tragen am 2'-C-Atom eine zusätzliche OH-Gruppe. Außerdem beinhaltet die RNA statt Thymin (T) die Base Uracil (U), die entsprechend mit der Base Adenin paaren kann.

Während des Transkriptionsprozesses wird der Matrizenstrang der DNA von der Polymerase in 3'-5'-Richtung abgelesen und Nukleotide mit entsprechend passenden Basenpaarungen zum Matrizenstrang werden im enzymaktiven Inneren der RNA-Polymerase II zu einem Polynukleotidstrang in 5'-3'-Richtung kovalent verbunden. Neu anzuknüpfende Nukleotide stellen Triphosphatedukte (NTPs) dar. Die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung bei der Bindung eines NTP an die Polynukleotidkette begünstigt die Reaktion thermodynamisch und der Abbau des freiwerdenden Pyrophosphats (PP_i) in Orthophosphat (P_i) verschiebt das Gleichgewicht in Richtung RNA-Synthese:

²Während bei Prokaryoten (kernlose Zellen) eine RNA-Polymerase-Art alle verschiedenen RNA-Moleküle synthetisieren kann, gibt es in Eukaryoten die RNA-Polymerase I für ribosomale RNA, die RNA-Polymerase II für *messenger* RNA sowie kleinere RNA und die RNA-Polymerase III für Transfer-RNA, ribosomale RNA und ebenfalls kleinere RNA [9]. Für eine detaillierte Beschreibung der RNA-Polymerase(II)struktur und der daraus resultierenden Funktion im Transkriptionsprozess siehe [11] und [12].



Bis auf den Unterschied, dass bei der RNA-Synthese die Uracil- statt Thymin-Nukleotide eingebaut werden, ist der resultierende RNA-Strang eine exakte Kopie des codierenden DNA-Stranges. Der Elongationsprozess der RNA-Nukleotidkettenbildung ist prozessiv, d. h. dass die komplette Transkription eines Gens von der selben RNA-Polymerase ohne zwischenzeitige Dissoziation durchgeführt wird. Die Elongation findet in einer Geschwindigkeit von 20-50 Nukleotiden pro Sekunde statt und weist eine Fehlerquote von einem Fehler pro 10^4 - 10^5 Nukleotiden auf. Die Termination der RNA-Synthese in eukaryotischen Zellen ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gilt allerdings als sicher, dass - genau wie bei der besser untersuchten prokaryotischen RNA-Synthese - die Terminationsstelle durch palindrome Sequenzen definiert ist, wodurch es zur Ausbildung von Haarnadelstruk-

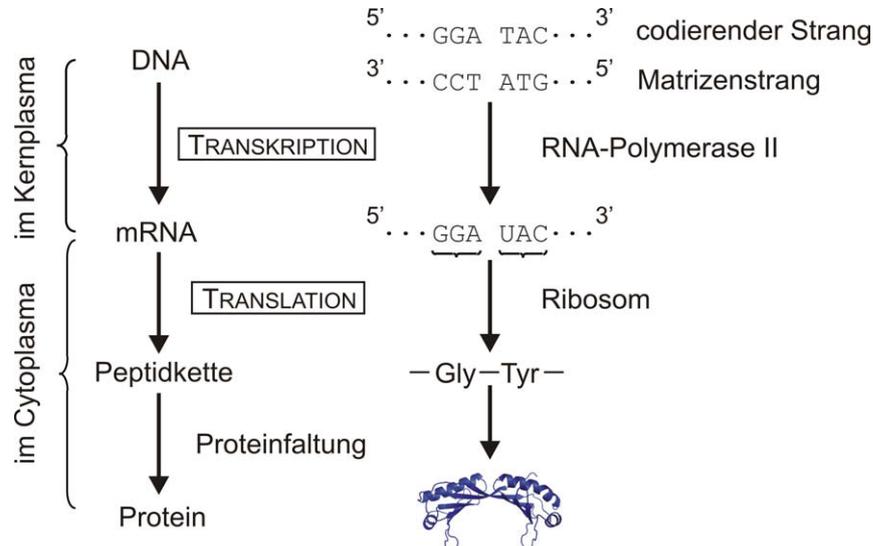


Abbildung 2.3.: Die Proteinbiosynthese von eukaryotischen Zellen. Im Kernplasma wird durch die RNA-Polymerase II die Gensequenz der DNA in hnRNA umgewandelt, welche eine Kopie des codierenden DNA-Stranges darstellt. Aus dem Primärtranskript wird anschließend durch Spleißvorgänge die reife mRNA gebildet. Die Information des mRNA-Stranges wird im Cytoplasma von Ribosomen in Aminosäureketten translatiert, die sich abschließend zum entsprechenden Protein falten (als Beispiel ist hier das TATA-Box-Bindeprotein aus der PDB-Datei 1RM1 gezeigt).

turen (auch Stamm-Schleifen genannt) im synthetisierten RNA-Strang kommt, der zum Abbruch der RNA-Synthese führt. [8, 13].

2.2.2. Entstehung der funktionellen mRNA

Bei eukaryotischen Zellen wird der fertig transkribierte RNA-Strang als heterogene Kern-RNA (*heterogeneous nuclear RNA*, hnRNA) bezeichnet und ist nur eine mRNA-Vorläuferversion (Prä-mRNA), die im Kernplasma weiterverarbeitet wird. An das 5'-Ende der Prä-mRNA wird ein 7-Methyl-Guanosintriphosphat gebunden, was als 5'-Cap bezeichnet wird. Diese „Kappe“ macht die mRNA resistent gegen einen möglichen Abbau durch Exonukleasen und dient außerdem als Erkennung des Transkripts für die weiteren Schritte der Genexpression [14]. Die Funktion eines Poly(A)-Schwanzes, der bei vielen Prä-mRNA-Strängen an das 3'-Ende gebunden wird, ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Es wurde allerdings bereits nachgewiesen, dass diese post-transkriptionale Veränderung ebenfalls als Schutz gegen den Abbau dient [13]. Abschließend müssen noch die nicht für das Protein codierenden Sequenzen (*intervening sequences*, Introns) aus dem Primärtranskript entfernt werden. Dieser als Spleißen bezeichnete Vorgang wird mit Hilfe der kleinen Kern-RNAs (small nucleic RNAs, snRNAs) durchgeführt und lässt nur die tatsächlich zur Proteinsynthese benötigten Sequenzen (*expressed sequences*, Exons) im Transkript zurück. Das Spleißmuster eines Primärtranskriptes kann je nach Entwicklungsstadium, Zelltyp oder anderen biochemischen Signalen unterschiedlich sein (alternatives Spleißen), sodass das selbe Gen für verschiedene Proteine codieren kann, was zur Vielfalt der eukaryotischen Formen und Funktionen beiträgt [15].

2.2.3. RNA-Translation

Die reife mRNA wandert anschließend durch die Kernporen aus dem Plasma des Zellkerns in das Cytoplasma der Zelle, wo ihre Basensequenzinformation von den Ribosomen, ein Komplex aus großen ribosomalen RNA-Molekülen (rRNAs) und mehr als 50 Proteinen, in Aminosäureketten umgewandelt wird. Bei diesem Translationsprozess wird der Code der mRNA mittels Transfer-RNAs (tRNAs) in die richtige Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren übersetzt. Dabei codiert die Tripletfolge von jeweils drei Nukleotiden (Codon) für eine bestimmte Aminosäure (Abb. 2.3), was

zu einer Degenerierung des genetischen Codes führt³. Für jede Aminosäure gibt es mindestens ein tRNA-Molekül mit einer spezifischen Anticodonsequenz. Verbunden mit der entsprechenden tRNA wird so das passende mRNA-Codon für diese Aminosäure erkannt. Durch die Ausbildung einer Peptidbindung im aktiven Zentrum des Ribosoms kommt es dann zur Anknüpfung der Aminosäure über ihr Carboxylende an das Aminoende der vorangegangenen Aminosäure. Die tRNA wird freigesetzt und kann der nächsten Aminosäure erneut als Erkennungsschlüssel dienen [14, 16]. Das Ribosom wandert auf diese Weise in 5'-3'-Richtung auf der mRNA entlang bis es zu einem von drei Codons kommt, die für einen Translationsstopp codieren. Die entstandene Peptidkette faltet sich abschließend zum fertigen Protein.

2.3. Die Transkriptionsinitiierung

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung von unterschiedlichen Vorgängen der Proteindynamik, die während des ersten Schrittes der eukaryotischen Proteinbiosynthese, der Transkriptionsinitiierung, stattfindet. Eine Übersicht zu diesem Thema bietet der Übersichtsartikel von D. B. Nikolov und S. K. Burley [17].

2.3.1. Der Promotor - Startpunkt der Genexpression

Die DNA-Transkription kann *de novo* beginnen, d. h. sie benötigt im Gegensatz zur DNA-Synthese keinen Primer (kurzer doppelstängiger DNA-Abschnitt, an dem die DNA-Synthese beginnt). Um trotzdem sicherzustellen, dass die Transkription nicht ab der Mitte des Gens, sondern vom Sequenzbeginn startet, findet die Initiierung der Transkription in einem bestimmten DNA-Sequenzbereich, dem Promotor des abzulesenden Gens, statt. Der Promotor in eukaryotischen Zellen umfasst in der Nähe des Gens mehrere Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Dies sind Proteine, die zusammen mit der RNA-Polymerase den basalen Transkriptionsapparat bilden. Diese Bindungsstellen liegen sowohl „stromaufwärts“ des Gens (*upstream*), also in 5'-Richtung (bezüglich des codierenden Stranges), als auch „stromabwärts“ des Gens (*downstream*, in 3'-Richtung). Da sich die Promotor-

³Es entstehen $4^3 = 64$ mögliche Codons, die aber nur für 23 Aminosäuren und drei Stoppsignale codieren müssen. Der genetische Code ist also übererfüllt, was die Möglichkeit zur Entstehung von schädlichen Mutationen minimiert.

motive auf dem selben DNA-Molekül wie das entsprechende Gen befinden, werden diese Sequenzen auch als cis-aktive Elemente bezeichnet. Die bindenden Transkriptionsfaktoren sind die dazugehörigen trans-aktiven Elemente [8]. Das menschliche Genom weist mehr als 10.000 aktive Promotoren auf [18,19]. Eine umfangreiche und gut gegliederte Übersicht zu eukaryotischen Promotoren bietet der Übersichtsartikel von S. T. Smale und J. T. Kadonaga [20].

Als Kernpromotoren (oder basale Promotoren) werden die Promotorsequenzen bezeichnet, die sich in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes befinden (bis zu ± 50 bp stromauf- bzw. -abwärts). Abbildung 2.4 zeigt den schematischen Aufbau einer solchen Kernpromotorsequenz für die eukaryotische Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II. Es sind die typischerweise vorkommenden Consensus-(Durchschnitts-)sequenzen eingezeichnet, die von den Generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) erkannt werden. Ohne eine Bindung der richtigen GTF-Proteine im Promotorbereich, kann sich der basale Transkriptionsapparat nicht bilden und das Gen kann nicht abgelesen werden (siehe hierzu Abschnitt 2.3.2). Die Consensussequenzen wurden biochemisch durch Footprinting-Experimente (vgl. Abb. 2.11) bestimmt. Sie sind die DNA-Sequenzen des codierenden Stranges, die sich beim Vergleich von vielen unterschiedlichen Genen stets wiederholen. Einige Positionen

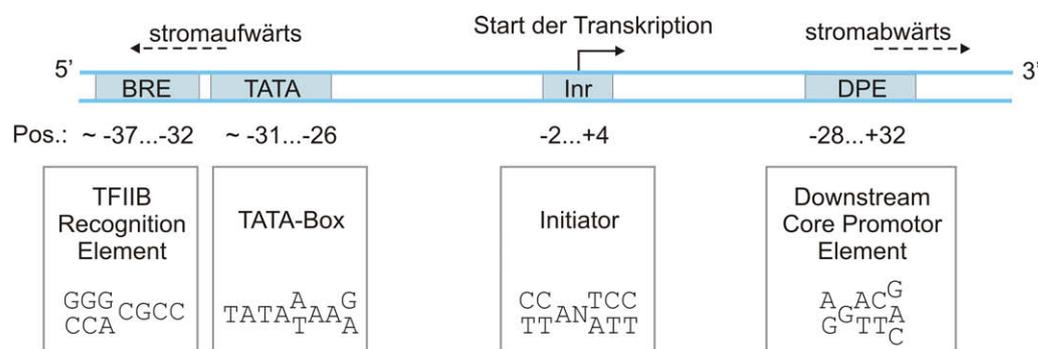


Abbildung 2.4.: Die Consensussequenzen von eukaryotischen Kernpromotoren. Gezeigt sind vier DNA-Sequenzmotive, die im Bereich des Transkriptionsstartpunktes liegen und zur Initiierung der Transkription beitragen. Diese Motive sind selten alle zusammen in einem Promotor vertreten. Vielmehr bestehen Promotoren meist nur aus zwei oder drei der vier Motive. In den erklärenden Boxen der einzelnen Motive sind die Consensussequenzen angegeben. Bei Positionen, für die alternative Sequenzen existieren, wurden die entsprechenden Basen übereinander angeordnet, wobei N für jede der vier Basen steht. Über den Box sind die Positionen der Sequenzen im Promotor angegeben. (Erstellt nach [20] und [9].)

in diesen Motiven können auch mit alternativen Besetzungen der Basen vorkommen, die ebenfalls in Abbildung 2.4 aufgezeigt sind.

Ca. 37 - 32 bp vor dem Startpunkt der Transkription befindet sich die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor (TF) TFIIB, wobei der Name beinhaltet, dass es sich um einen GTF der Klasse II, d. h. für die RNA-Polymerase II, handelt. Dieser Promotorbereich wird als TFIIB-Erkennungselement (*TFIIB recognition element*, BRE) bezeichnet [21]. Er grenzt an die dominanteste Consensussequenz in eukaryotischen Promotoren, die TATA-Box (benannt nach ihrem Consensusbeginn T-A-T-A; nach ihren Entdeckern auch als Goldberg-Hogness-Box bezeichnet). Sie liegt ca. 31 - 26 bp stromaufwärts vom Transkriptionsbeginn und ist eine über 8 bp lange, AT-reiche Bindungsstelle für das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) - eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID. Die TATA-Box gilt aufgrund seiner häufigen Präsenz in Promotoren als das wichtigste cis-aktive Element für die meisten RNA-Polymerase II-transkribierten Gene. Während die erste Hälfte der TATA-Box, die T-A-T-A-Sequenz, in den Promotoren stets ohne Abweichungen auftritt, lassen die flexibleren TBP-TATA-Wechselwirkungen in der zweiten Hälfte des Motives auch alternative Basenbesetzungen zu [22].

Das Initiatormotiv (Inr) des Promotors liegt direkt am Startpunkt der Transkription und dient zur Erkennung durch eine weitere Untereinheit des TFIID. Es wurde aber auch die Bindung von TFII I und der RNA-Polymerase II selbst an Inr berichtet [20]. Die vierte Consensussequenz im Promotorbereich, das stromabwärtsliegende Promotorelement (*downstream core promoter element*, DPE), stellt ebenfalls eine TFIID-Bindungsstelle dar. Es liegt auf der Gensequenz zwischen 28 - 32 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart und tritt typischerweise in Promotoren auf, die keine TATA-Box besitzen [23]. Um einen aktiven Promotor zu bilden, kann das DPE-Motiv jedoch nicht ohne Inr-Sequenz wirken.

Die Abbildung 2.4 ist also eine Zusammenfassung der gefundenen Consensussequenzen von aktiven Promotoren. Bei den meisten Transkriptionsstartpunkte der RNA-Polymerase II sind nur zwei oder drei der vier Motive präsent; fast immer jedoch enthält der Promotor die TATA-Box, die auch alleine eine funktionierende Promotorsequenz darstellen kann [20].

Neben dem vorgestellten Kernpromotor gibt es noch den *upstream*-Promotor, der die Promotorsequenz für eine Prä-mRNA komplettiert. Zum *upstream*-Promotor

zählen die Consensussequenzen der CAAT-Box (GGNCAATCT) und der GC-Box (GGGCGG), die beide stromaufwärts vom Gen liegen. Dabei können die Boxenpositionen auf der DNA stark variieren und in einer Entfernung von 200 bis 10.000 bp zum Transkriptionsstart liegen. Ein weiterer Unterschied zu den Kernpromotormotiven besteht darin, dass sich die Consensussequenzen des *upstream*-Promotors nicht zwingend auf dem codierenden DNA-Strang befinden müssen. Diese cis-aktiven Elemente wirken auch wenn sie auf dem Matrizenstrang vorkommen [8].

2.3.2. Bildung des Präinitiiierungskomplexes

Während in prokaryotischen Zellen die RNA-Polymerase alleine die Transkription starten kann, ist in eukaryotischen Zellen der Aufbau des Präinitiiierungskomplexes (*pre-initiation complex*, PIC), bestehend aus der RNA-Polymerase und den entsprechenden GTFs, für den Start des Transkriptionsprozesses notwendig. Eine Übersicht des zeitlichen Ablaufes der PIC-Formierung ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Die Abbildung gibt die Forschungsergebnisse zur PIC-Bildung aus *in vitro*-Experimenten wieder. Aus der Vielzahl von Übersichtsartikeln zu den Generellen Transkriptionsfaktoren und ihre Funktionen beim Aufbau der basalen Transkriptionsapparatur [17, 24–29] sei hier besonders auf die umfangreichen und gut strukturierten Ausführungen von R. G. Roeder [27] sowie von D. B. Nikolov und S. K. Burley [17] hingewiesen.

Der erste und entscheidende Schritt zur Bildung des Präinitiiierungskomplexes ist die Bindung des TBP an die TATA-Box der DNA. Das TATA-Box-Bindeprotein [31] ist eine 30 kDa kleine Untereinheit des Multiproteinkomplexes TFIID (\approx 700 kDa) und beugt durch seine DNA-Bindung den Doppelstrang in komplexer Weise zu einem resultierenden Winkel von 80° (Abschnitt 2.4.1 behandelt TBP und seine DNA-Bindungseigenschaften im Detail). Es wird vermutet, dass die starke DNA-Beugung als Erkennung der Promotoraktivierung dient. Nach der Beugung durch die TBP-Bindung können die anderen GTFs den aktiven Promotor identifizieren und ebenfalls binden [32]. Mit der Untereinheit TBP sind acht bis zwölf Cofaktoren verbunden, die TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) [29], welche positive und negative Regulationsfunktionen auf die Transkriptionsinitiierung haben können [33–35] und die Promotorselektivität des (zusammen mit TBP) gebildeten Gesamtkomplexes TFIID steuern [36]. So stellen TAFs auch Promotor-Erkennungsproteine für

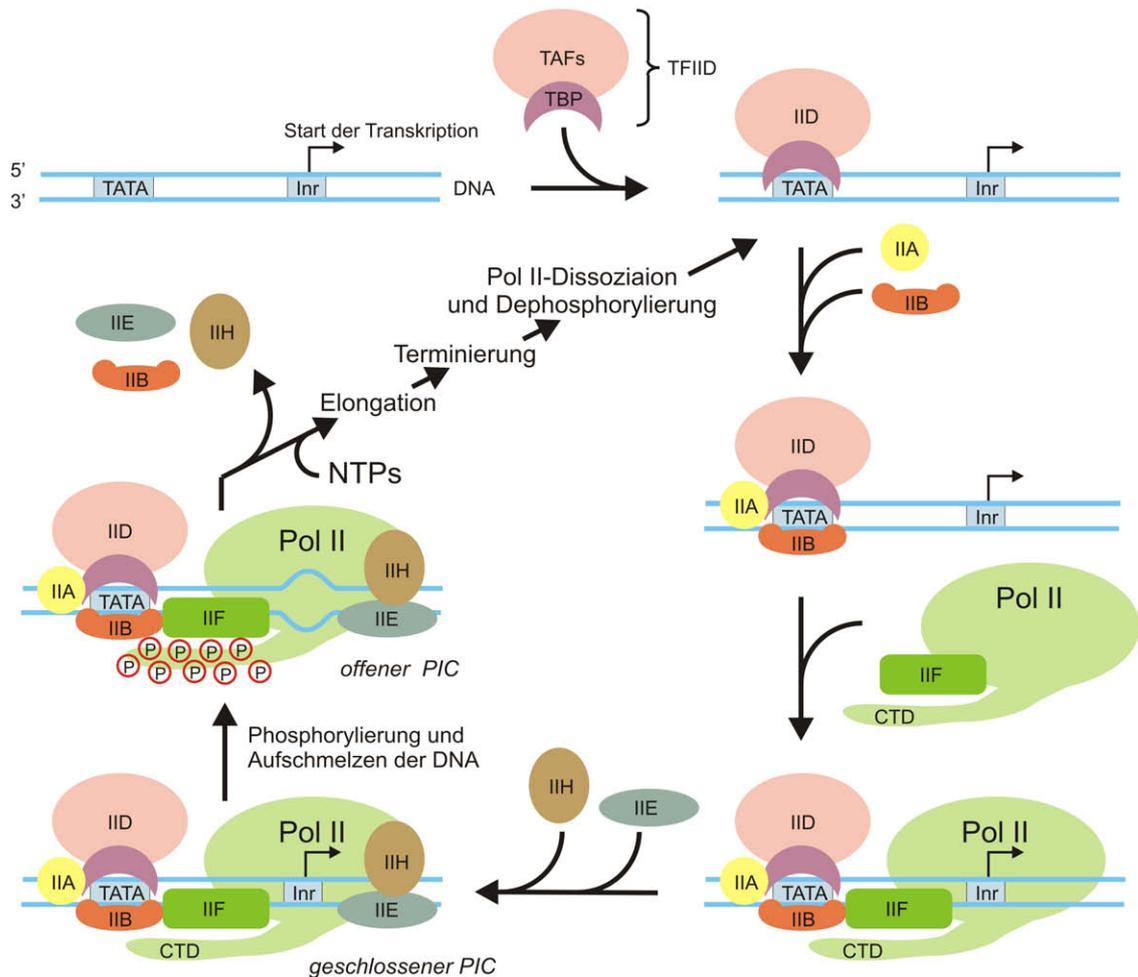


Abbildung 2.5.: PIC-Formierung durch Binden der einzelnen GTFs im Kernpromotorbereich nach Ergebnissen aus *in vitro*-Untersuchungen. (In der Abbildung sind alle Transkriptionsfaktoren der Klasse II mit „II“ abgekürzt. Außerdem wurde die Beugung der DNA aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.) Die PIC-Formierung beginnt mit dem Binden der TFIID-Untereinheit TBP an die TATA-Box, gefolgt von den sukzessiven Bindungsvorgängen von TFIIB, TFIIF, Pol II, TFIIE und TFIIH. Nach der Komplettierung des PIC wird das Inr-Motiv aufgeschmolzen und die CTD der Polymerase phosphoryliert, was zur Dissoziation von TFIIB, TFIIE und TFIIF führt. Mit der Anwesenheit von NTPs kann anschließend die RNA-Synthese beginnen. Nach ihrer Terminierung wird Pol II wieder freigesetzt und dephosphoryliert, sodass die Polymerase einen weiteren Zyklus der Transkription beginnen kann, wenn TFIID noch an der TATA-Box gebunden ist. (Reihenfolge und Position der GTFs nach [9], [27] und [30].)

TATA-lose aber DPE-beinhaltende Promotoren dar [33]. (Andererseits konnte jedoch gezeigt werden, dass die TAFs für den Start der Transkription *in vivo* nicht immer erforderlich sind [37].)

Nachdem die TATA-Box durch TFIID erkannt wurde, kann TFIIA stromaufwärts von TATA an den TBP-DNA-Komplex binden, wodurch die TBP-Bindung zusätzlich stabilisiert wird. Außerdem gilt TFIIA als Anti-Repressionsfaktor und übt somit einen sehr aktivierenden Effekt auf die Transkription aus [38]. TFIIB bindet anschließend ebenfalls an den TBP-DNA-Komplex, wobei es außer mit TBP auch stromauf- und -abwärts von TATA Kontakte mit der DNA ausbildet [39]. Durch diesen Generellen Transkriptionsfaktor kann nachfolgend die RNA-Polymerase II (Pol II) an die Promotorregion binden und ihre korrekte Position finden. Zusammen mit Pol II wird gleichzeitig auch TFIIF in den PIC mit eingebunden, da sich bereits im Vorfeld ein stabiler Pol II-TFIIF-Komplex bildet. TFIIF dient der Polymerase zur Erkennung des Promotors und nach Transkriptionsbeginn auch als Elongationsfaktor bei der RNA-Synthese [40]. Anschließend geht TFIIE eine Bindung mit dem Pol II-TFIIF-Komplex ein. Durch TFIIE werden die Helikase-, ATPase- und Kinaseaktivitäten am PIC beeinflusst [27].

Die Bindung von TFIIH stellt den Abschluss der PIC-Formierung dar. Dieser Transkriptionsfaktor besitzt gleich zwei wesentliche Aufgaben bei der Transkriptionsinitiierung. Indem TFIIH mit seiner ATP-abhängigen Helikaseaktivität die anfänglich erforderliche Aufschmelzung des DNA-Doppelstranges durchführt, geht der PIC vom „geschlossenen“ in den „offenen“ Zustand über. Mittels der Kinase(Phospho-Transferase)-aktivität von TFIIH wiederum wird die C-terminale Domäne (CTD) von Pol II phosphoryliert [41]. Durch diese Phosphorylierung kommt es bei der Polymerase zu einer Konformationsänderung, die zur Dissoziation von TFIIB, TFIIE und TFIIH führt. Der PIC löst sich auf und die RNA-Synthese durch die Verknüpfung von NTPs kann beginnen. Die Elongation wird bis zum Terminierungssignal fortgesetzt. Anschließend verlässt der Pol II-TFIIF-Komplex den DNA-Strang und die Pol II-CTD wird durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert. Nach diesem Recyclingsschritt kann es zu einer Reinitiierung der Transkription kommen, wenn TFIID noch an der TATA-Box gebunden ist [17,27]. Durch das mehrfache Ablesen eines Gens kann die Zelle die Synthese eines bestimmten Proteins entsprechend steigern. Die Häufigkeit des Ablesens ist von der Promotorstärke und zusätzlichen

cis- und trans-aktiven Regulationselementen abhängig (vgl. Abschnitt 2.5).

Die erläuterte Reihenfolge zur PIC-Formierung konnte *in vivo* noch nicht in Gänze bestätigt werden. Es wird sogar vermutet, dass in lebenden Zellen alle Transkriptionsfaktoren bis auf TFIID und TFIIA bereits vor dem Eintritt zum PIC mit der RNA-Polymerase II einen Holoenzym-Komplex bilden, welcher dann als große Einheit an den Promotor bindet [9, 27].

2.4. Das TATA-Box-Bindeprotein

Die TATA-Box-bindende Untereinheit von TFIID, das TBP, ist für die Transkriptionsinitiierung von allen eukaryotischen Polymeraseklassen notwendig. Aufgrund der universellen Bedeutung von TBP für den Start der Proteinbiosynthese ist dieses Protein bereits sehr eingehend untersucht worden (Übersichtsartikel: [42–44]).

TBP besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette. Seine 180 Aminosäuren lange C-terminale DNA-Bindungsdomäne (CTD) weist eine pseudosymmetrische Sattelform auf, die aus zwei sehr ähnlichen Unterdomänen zusammengesetzt ist, welche als Wiederholungen mit C- bzw. N-terminaler Richtung voneinander unterschieden werden können (Abb. 2.6A) [45]. Die CTD von TBP stellt eine evolutionär hoch konservierte Struktur dar. So ist der C-terminus von humanem TBP (hTBP) zu 82 % identisch mit dem TBP der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*yeast* TBP, γ TBP). Die mit der DNA in Kontakt kommende konkave TBP-Oberfläche unterscheidet sich bei diesen beiden Spezies nur in einer Position: statt Arg-204 beim hTBP weist γ TBP Lys-110 auf. [22]. Die N-terminale TBP-Domäne hingegen kann in ihrer Länge für unterschiedliche Organismen sehr stark voneinander abweichen (vgl. [45–47]). Es wird vermutet, dass die N-terminale TBP-Domäne dazu dient, die Bindung der anderen Transkriptionsfaktoren an TBP zur Bildung des PIC so lange abzublocken bis sich TBP korrekt an der TATA-Box positionieren konnte [48].

2.4.1. Der TBP-DNA-Komplex

Die Abbildung 2.6 zeigt aus unterschiedlichen Blickwinkeln die Kristallstruktur der C-terminalen TBP-Domäne gebunden an der TATA-Box des *Adenovirus Major Late*

Promoters (AdMLP). Dieser spezielle Promotor der Adenoviren⁴ ist im späten Infektionsprozess besonders aktiv (*major late*) und weist dann eine hohe Transkriptionsrate auf. Für die TATA-Box des AdMLP mit der Basensequenz TATAAAA und den flankierenden Poly-GC-Basenpaaren [49, 50] zeigt TBP eine hohe Bindungsspezifität und eine sehr stabile Komplexbildung (zur Beschreibung der DNA-Sequenz vergleiche auch Abschnitt 6.1.1). TBP bindet mit seiner konkaven Oberfläche mittels Interaktionen bestimmter Aminosäurereste in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix an der TATA-Box-Sequenz. Diese Bindung hat größere Konformationsänderungen der DNA zur Folge: Die Doppelhelix wird um 117° entwunden und die kleine Furche wird verbreitert, was durch die Einführung von einem Drittel rechtshändiger Superhelix kompensiert wird [51]. Durch die Verbreiterung der kleinen Furche kommt es zu einem ausgedehnten Kontakt mit den antiparallelen β -Faltblattstrukturen des TBP. An dieser Grenzfläche zwischen TBP und DNA gibt es unterschiedliche hydrophobe Wechselwirkungen, u. a. interkalieren vier Phenylalindereste des TBP zwischen den Basenpaaren der TATA-Box, was zu intensiven van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen TBP und der DNA führt [22, 52]. Die generelle Flexibilität von AT-reichen Sequenzen führt durch diese Wechselwirkungen zu einer starken Verformung des DNA-Doppelstranges [22, 53] (Abb. 2.6).

Die DNA wird direkt vor und nach der TATA-Box durch zwei Knicke von ca. 90° in entgegengesetzter Richtung gebeugt, die zu einer lateralen Verschiebung von 18 Å führen (Abb. 2.6B oben). In sehr kurzem Abstand stomauf- und -abwärts zur TATA-Box nimmt der Doppelstrang seine übliche Form der B-DNA wieder ein [55]. Die Ansicht im rechten Winkel dazu (Abb. 2.6A und 2.6B unten) zeigt die folgeschwerste Verformung des Doppelstranges. Die DNA weist durch die TBP-Bindung einen effektiven Beugungswinkel von ca. 80° auf [32, 51, 54, 56].

Wegen der hohen Bindungsstärke wurden die TBP-Interaktionen zur TATA-Box des AdML-Promotors besonders intensiv untersucht. Aus diesem Grund dient dieser Promotor mittlerweile als Referenzstandard für die Untersuchung des TBP-Bindungsverhaltens. Die Bindung von TBP an eine TATA-Box im Allgemeinen und der AdMLP-TATA-Box im Speziellen ist sehr stark und hoch spezifisch. Mit-

⁴Adenoviren sind nicht-behüllte Viren, deren Kapside eine ikosaedrische Form mit antennenartigen Fiberproteinen besitzen. Bei Menschen verursacht diese Virenart überwiegend Erkrankungen der Atemwege.

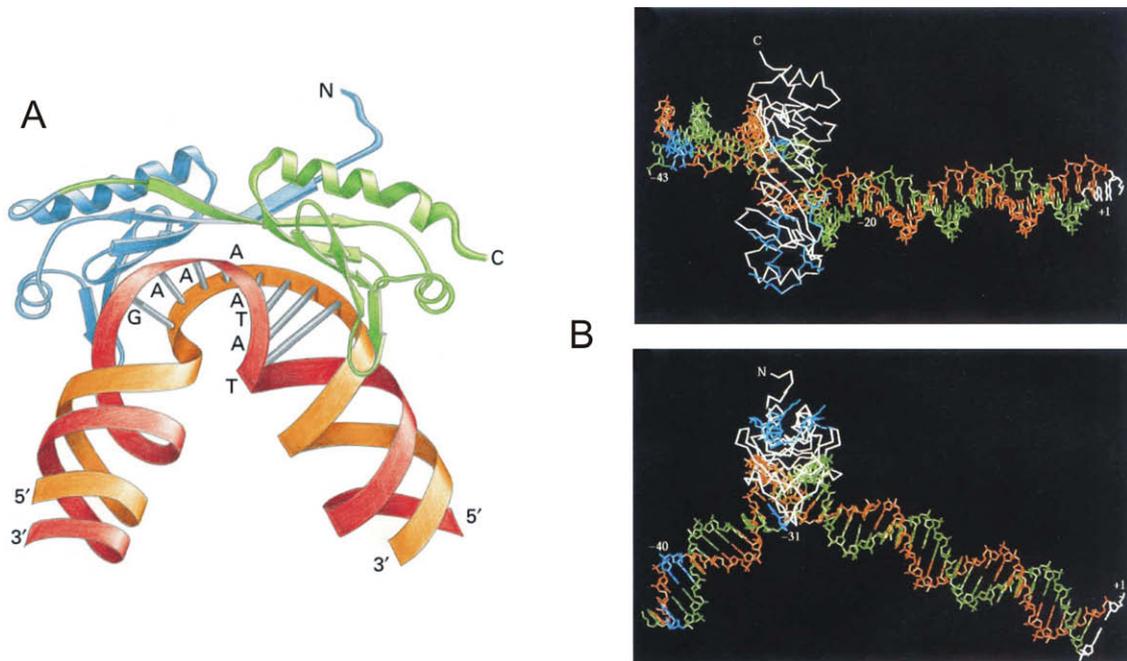


Abbildung 2.6.: Dreidimensionale Strukturen von DNA-gebundenem TBP: die C-terminale TBP-Domäne am *Adenovirus Major Late Promoter* (AdMLP). (A) Adaptierte Kristallstruktur, die zeigt, wie TBP in der kleinen Furche der TATA-Box bindet (der codierende DNA-Strang (rot) ist hier in 3'-5'-Richtung aufgetragen). Die zwei ähnlichen Strukturwiederholungen, welche die hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne von TBP bilden, sind in blau (N-terminale Richtung) und grün (C-terminale Richtung) dargestellt (aus [9], Originalstruktur von Kim et al. [54]). (B) Kristallstrukturen vom TBP-AdMLP-Komplex, die die komplexen DNA-Konformationsänderungen aufgrund der TBP-Bindung zeigen [54] (TBP: weiße Bänder; codierender Strang: grün; Matrizenstrang: rot; Startpunkt der Transkription: weißes Basenpaar; Kontaktstellen zu TFIIA: blau). (oben) Knicke von jeweils knapp 90° stromauf- und -abwärts verursachen eine laterale Verschiebung des DNA-Doppelstranges von 18 Å. (unten) Der TBP-DNA-Komplex in einer um 90° gedrehten Ansicht. Die umfangreichen Verformungen der DNA an der TATA-Box führen zu einer Gesamtbeugung von ca. 80°, die zur Erkennung des aktivierten Promotors dienen könnte [32].

tels Fluoreszenz-Anisotropiemessungen im Stoppflussverfahren wurde die Bindungsstärke von γ TBP an die TATA-Box vom AdML-Promotor mit einer Dissoziationskonstante von nur 4,3 nM und einer Halbwertszeit von 23 min bestimmt [57]. Zeitabhängige *footprinting*-Experimente (vgl. Abschnitt 2.5.3) von Prof. Dr. Michael Meisterernst und seinen Mitarbeitern führten zu einer Halbwertszeit des TBP-DNA-Komplexes von 10 - 20 min [4]. Zu nicht-TATA-Sequenzen ist die DNA-Affinität deutlich schwächer als zum AdML-Promotor (vgl. Abschnitt 6.2.2). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Bindungsstärke zwischen TBP und bestimmten

TATA-Boxen abhängig von den flankierenden DNA-Sequenzen im Promotorbereich ist [58–61]. Das bedeutet, dass die Sequenzbereiche um die Consensusmotive des Kernpromotors die Aktivität des Promotors und damit die Transkription des abzulesenden Gens stark beeinflussen können [61]. Das TBP-Bindungsverhalten zur speziellen AdMLP-TATA-Sequenz ist hingegen unabhängig von den Promotorflanken [58, 59, 61]. Entgegen ersten Vermutungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen der TBP-DNA-Bindungsstärke und dem resultierenden Grad der DNA-Beugung existiert [59].

Die beschriebene Bindung von TBP an die TATA-Box ist bei eukaryotischen Promotoren von den verschiedenen Organismen konzeptionell gleich [62]. Unterschiede in der TBP-DNA-Bindung beim Vergleich verschiedener Spezies wurden nur im Detail gefunden. So wurde durch *in vitro*-Experimente mit Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) in Lösung gezeigt, dass hTBP im Vergleich zu γ TBP eine noch festere und schnellere Bindung zur TATA-Box eingeht und die resultierende DNA-Beugung etwas größer ist [63]. Die Art der TBP-DNA-Komplexierung, ihre generelle Struktur und ihre Wirkung und Funktion im Transkriptionsprozess ist aber bei allen eukaryotischen Zellen die gleiche. Der hohe Konservierungsgrad macht die biochemisch große Bedeutung dieses ersten Schrittes der Transkriptioninitiierung deutlich.

2.4.2. Mechanismus der TBP-DNA-Bindung

Der Mechanismus der TBP-DNA-Bindung wurde v. a. von Parkhurst und seinen Mitarbeitern eingehend untersucht. Durch umfangreiche Stoppfluss-Fluorimetrie-Untersuchungen und FRET-Experimente wurde der mechanistische Ablauf und die Kinetik des TBP-Bindens und des DNA-Beugens in Lösung untersucht [64–68]. Die globale Analyse der gesammelten kinetischen und thermodynamischen Daten aus den FRET-Experimenten ergab für den AdML-Promotor ein Modell, das den TBP-DNA-Bindungsmechanismus als linearen, dreischrittigen Prozess beschreibt, in dem zwei metastabile Zwischenstufen (I_1 und I_2) integriert sind [65, 67]:



Dieser vorgeschlagene Mechanismus konnte durch Einzelmolekül-Untersuchungen

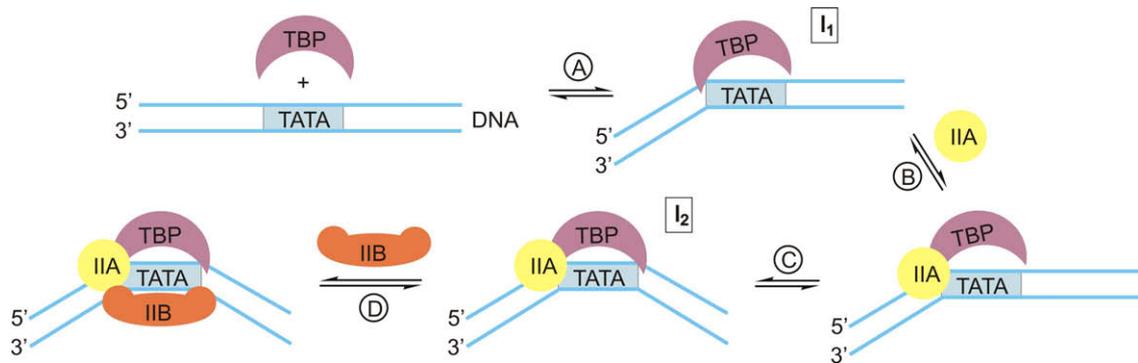


Abbildung 2.7.: Modell zur Bindungsabfolge von TBP, TFIIA und TFIIB an der Kernpromotorregion der DNA in vier Schritten (nach Tolić-Nørrelykke et al. [69]). (A) TBP bindet mit seinem ersten Phenylalaninpaar an die TATA-Box und verursacht durch die Interkalierung einen Knick in der DNA am 5'-Ende der TATA-Box (intermediärer Zustand I₁). (B) TFIIA, das in der PIC-Bildung gleich nach dem TBP bindet und von dem bekannt ist, dass es nur stromaufwärts von TATA mit TBP-DNA interagiert [38], kann sich nun an die bereits modifizierte DNA-Struktur setzen. (C) Es kommt zu einem weiteren Knick am 3'-Ende der TATA-Box durch die Interkalierung des zweiten TBP-Phenylalaninpaars (intermediärer Zustand I₂). (D) TFIIB, das stromauf- und -abwärts von TATA liegende Kontakte zur Bindung benötigt [39], kann erst an den Komplex binden, nachdem TBP den zweiten Teil des DNA-Beugungsprozesses durchgeführt hat. Auf diese Weise erklärt das Modell die native Reihenfolge der TFIIA- und TFIIB-Bindung an TBP-DNA mit der zeitlichen Abfolge der DNA-Beugungsschritte durch TBP.

bestätigt und erweitert werden. Tolić-Nørrelykke et al. konnten in Experimenten mit *Optical Tweezer*-Technik sprunghafte DNA-Konformationsänderungen bei individuellen γ TBP-AdMLP-Bindungsprozessen beobachten [69]. Ihre Ergebnisse zeigen, dass die DNA von TBP in zwei Schritten gebeugt wird (Abb. 2.7). Beim ersten Bindungskontakt mit TBP kommt es zur Interkalierung von zwei Phenylalaninresten des TBP [54, 55], was zum Intermediat I₁ führt. (Entscheidend für diese Interpretation sind auch die dazu passenden Ergebnisse von Parkhurst und seinen Mitarbeitern, die zeigen, dass die DNA-Beugung *simultan* mit der TBP-DNA-Bindung stattfindet [63, 65]. Ein Modell, bei dem die DNA-Beugung zeitlich verzögert zur TBP-Bindung erfolgt [70], konnte von Masters et al. widerlegt werden [63].) Die sehr kurzlebige Zwischenstufe I₂ wird durch die Einzelmolekül-Untersuchungen als das Ergebnis des Interkalierungsereignisses vom zweiten TBP-Phenylalaninpaar [54, 55] interpretiert. Der dritte Schritt hat nach dem Modell von Tolić-Nørrelykke et al. nur noch minimale Konformationsänderungen mit zuneh-

menden van-der-Waals-Kontakten zwischen TBP und DNA zur Folge. Die Schlussfolgerungen aus diesem Modell könnten bedeuten, dass die bekannte native Reihenfolge der ersten GTFs, die nach dem TBP an den Kernpromotor binden (zuerst TFIIA und anschließend TFIIB, vgl. Abschnitt 2.3.2), durch den TBP-DNA-Bindungsmechanismus bereits intrinsisch festgelegt ist (Abb. 2.7).

2.4.3. Bindungsorientierung von TBP an der TATA-Box

Aufgrund der pseudosymmetrischen Form der C-terminalen DNA-Bindungsdomäne des TBP (Abb. 2.6A), liegt die Vermutung nahe, dass TBP in zwei unterschiedlichen Richtungen an die TATA-Box binden kann. Die richtige Bindungsorientierung von TBP ist sehr wichtig für einen korrekten Transkriptionsvorgang, da nachgewiesen werden konnte, dass die TBP-Orientierung die Ableserichtung für die RNA-Polymerase vorgibt [71]. In den kristallographischen Untersuchungen des TBP-DNA-Komplexes konnten aber keine Abweichungen von der nativ korrekten Bindungsorientierung festgestellt werden (unter Annahme, dass die Kristallstruktur tatsächlich die native Form des TBP-DNA-Komplexes wiedergibt). Vielmehr wurde mit diesen Strukturanalysen erklärt, dass die Bindungsorientierung durch Unterschiede zwischen der C- und N-terminal gerichteten Wiederholung von der TBP-Bindungsdomäne bezüglich Aminosäuren und Elektrostatik festgelegt ist [22, 54, 56].

Durch *in vitro*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe von A. Schepartz an TBP-DNA-Bindungsprozessen *in Lösung* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass in nicht-kristalliner Form TBP durchaus in beiden Orientierungen an die TATA-Box bindet (Abb. 2.8) und dass die Orientierung nicht durch das TBP, sondern

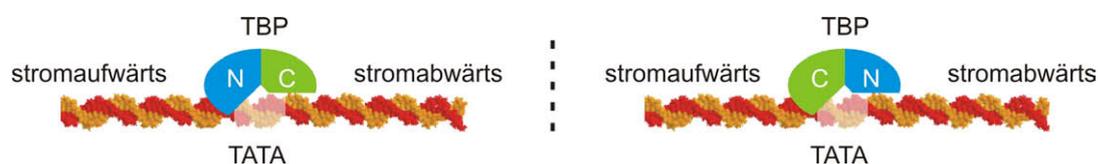


Abbildung 2.8.: Schema zur Bindungsorientierung von TBP an die TATA-Box. Die zwei ähnlichen C- bzw. N-terminalen Wiederholungen der CTD vom TBP sind in Analogie zur Abb. 2.6A in grün bzw. blau dargestellt und mit C bzw. N gekennzeichnet (nach [72]). Die TATA-Box ist verblasst kenntlich gemacht. Die Beugung der DNA ist zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet. In dieser Darstellung gibt die rechts gezeigte TBP-Orientierung die TBP-DNA-Bindung wieder, die auch in Kristallstrukturen beobachtet wird (vgl. Abb. 2.6).

hauptsächlich durch die GTFs TFIIA und TFIIB festgelegt wird [72–74]. So wurde mittels Schneidmusteranalysen und FRET-Untersuchungen gezeigt, dass γ TBP alleine nur zu 67 % in der Orientierung an die TATA-Box von AdMLP bindet, die auch in der Kristallstruktur beobachtet wird; 33 % binden mit entgegengesetzter Orientierung [72]. Die Inkubation von TBP-DNA zusammen mit TFIIA bzw. TFIIB führt allerdings zur deutlichen Erhöhung der Orientierungsspezifität (84 % : 16 % bzw. 80 % : 20 %). Die gemeinsame Wirkung von TFIIA und TFIIB lässt schließlich nur noch eine einzige Bindungsorientierung zu (95 % : 5 %) [72]. Dieser Effekt der GTFs auf die TBP-Orientierung wird auch anhand einer thermodynamischen Beschreibung deutlich. So beträgt der Unterschied in der Freien Enthalpie ($\Delta\Delta G$) zwischen beiden Orientierungen 0,2 - 0,3 kcal/mol, wenn TBP alleine an die TATA-Box bindet. In der Präsenz von TFIIA und TFIIB hingegen wurde ein Unterschied von 1,8 kcal/mol bestimmt [72].

2.5. Regulierung der Genexpression

2.5.1. Regulierungsmöglichkeiten während der Transkription

Im Vorangegangenen wurde erklärt, wie Zellen Proteine synthetisieren können und welche biochemischen Vorgänge bei der Initiierung der Biosynthese stattfinden. Wie kann jedoch die Zelle die Proteinproduktion je nach Bedarf anpassen und steuern? Die dazu nötige Genregulierung kann auf allen Ebenen der Proteinbiosynthese erfolgen. Besonders effektiv ist es jedoch, die Produktion gleich zu Beginn des Syntheseprozesses zu beeinflussen, da so Energie und Ressourcen gespart werden können. Aus diesem Grund geschieht die Regulierung der Expression hauptsächlich auf der Stufe des Transkriptionsprozesses [75].

Neben einem einfachen Ein- und Ausschalten der Transkription haben Zellen unterschiedlichste Möglichkeiten den Transkriptionsprozess positiv oder negativ zu beeinflussen. Der in Abschnitt 2.3.2 beschriebene basale Transkriptionskomplex initiiert nur mit einer geringen Häufigkeit. Eine höhere RNA-Syntheserate kann in der eukaryotischen Zelle z. B. durch den zusätzlichen Einsatz positiver Cofaktoren geschehen.

Je nach Wirkung werden Cofaktoren auch als Aktivator- oder Repressor-Proteine

bezeichnet. Vor allem die einzelnen GTFs oder ihre Wege zur PIC-Bildung bzw. der Prozess der PIC-Formierung selbst sind dabei ein häufiger Angriffspunkt der Cofaktoren, um die Transkription effizient zu beeinflussen [30,76]. Neben diesen transaktiven Elementen zur Genregulierung gibt es auch cis-aktive Elemente, welche die Aktivität eines Promotors stärken (Enhancer-Sequenzen) oder schwächen (Silencer-Sequenzen) [77].

Enhancer oder Silencer befinden sich teilweise bis über 1000 bp von dem zugehörigen Kernpromotor entfernt. Sie stellen Bindungsstellen für Transkriptionsregulierende Cofaktoren dar [78]. Aufgrund des großen Abstandes zwischen Regulationssequenz und Kernpromotor kann ein solch gebundener Cofaktor über eine DNA-Schleifenbildung in direkten Kontakt mit dem PIC kommen und die Transkriptionsinitiierung positiv oder negativ beeinflussen [79]. Häufig dient zu dieser Kontaktaufnahme auch ein Multiproteinkomplex, bestehend aus 20 Untereinheiten, der als Mediator bezeichnet wird [80]. Dieser Mediator bindet an die CTD der RNA-Polymerase II und nimmt die Rolle des Signalübermittlers von Mediator-bindenden Cofaktoren ein [81]. Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass Cofaktoren die RNA-Synthese nicht nur über direkte Interaktionen mit dem Transkriptionskomplex beeinflussen können. Veränderungen an der Chromatinstruktur um den Promotor herum stellen eine zusätzliche Strategie der Transkriptionsregulierung durch die Cofaktoren dar, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll [8,9,14].

2.5.2. Der Negative Cofaktor 2

Die Gesamtheit der Transkriptions-Cofaktoren wird unterteilt in positive (Transkriptions-aktivierende) Cofaktoren (PCs), negative (Transkriptionshemmende) Cofaktoren (NCs) und die bereits behandelten TAFs, die generell als Untereinheiten von TFIID an der Transkriptionsregulierung beteiligt sind (vgl. Abschnitt 2.3.2) [29]. Im Gegensatz zu Prokaryoten ist die Transkription bei Eukaryoten sehr stark durch PCs kontrolliert (Übersichtsartikel: [29,30]). Trotzdem gibt es auch in eukaryotischen Zellen negativ regulierende Cofaktoren, wie z. B. Mot1 sowie NC1 und NC2 [82]. Von diesen negativen Cofaktoren ist NC2 bis heute am besten untersucht.

NC2 ist ein negativer Cofaktor, bei dem Transkriptionshemmenden Eigenschaften durch *in vitro*-Experimente nachgewiesen wurden [83]. Er wurde zuerst von

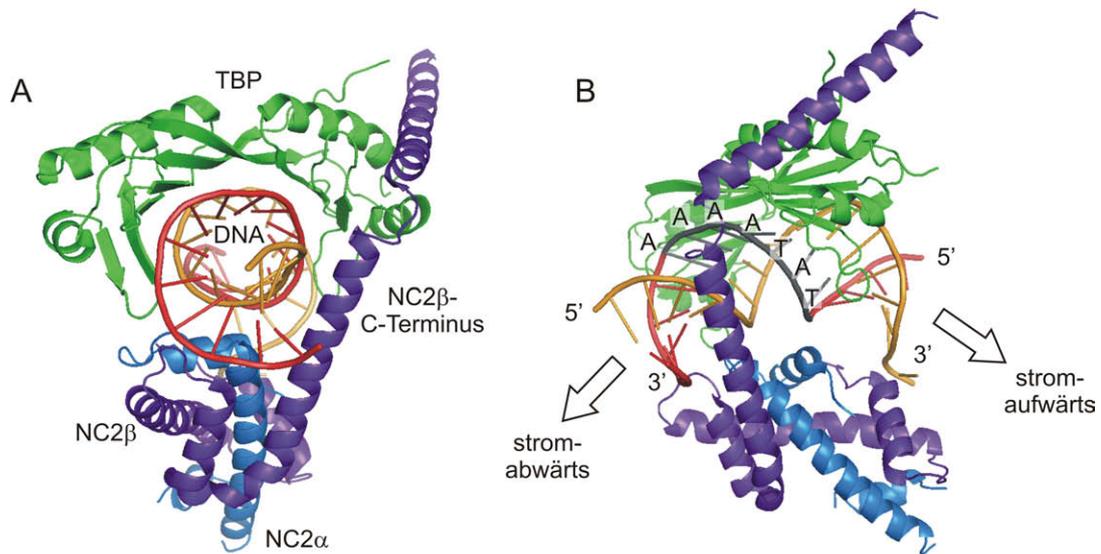


Abbildung 2.9.: Kristallstruktur des TBP-DNA-NC2-Komplexes. (A) Rückansicht bzgl. des DNA-Doppelstrangverlaufs. Die Untereinheiten NC2 α (blau) und NC2 β (violett) dimerisieren in einem Histon-ähnlichen Motiv, das gegenüber von TBP (grün) in die Innenseite der Beugung der DNA (rot und orange) bindet. Aufgrund der direkten Interaktionen von NC2 mit TBP über die C-terminalen α -Helices von NC2 β und das Histon-ähnliche NC2-Motiv entsteht ein ringförmiger TBP-NC2-Komplex um die DNA herum. (B) Seitenansicht bzgl. des DNA-Doppelstrangverlaufs. Zur Orientierung im Komplex wurde die AdMLP-TATA-Box (TATAAAA) am codierenden Strang grau eingezeichnet. Die resultierende Beugung der DNA aus der TBP-Bindung ist auch nach der NC2-Bindung erhalten geblieben. (PDB-Code 1JFI aus [3].)

Michael Meisterernst im Labor von Robert G. Roeder entdeckt [2]. Dieser Cofaktor unterdrückt die DNA-Transkription durch die direkte Bindung an den TBP-DNA-Komplex und hemmt dadurch die Genexpression bereits im initiierten Schritt. Abbildung 2.9 zeigt die Kristallstruktur eines Komplexes aus humanem NC2, hTBP und der TATA-Box des AdML-Promotors [3]. NC2 ist als Heterodimer aufgebaut und besteht aus der α - (22 kDa) und der β -Untereinheit (20 kDa), deren N-Termini sich zu einem Motiv vereinen, das strukturell sehr stark der Histonverbindung H2A-H2B ähnelt [83].⁵ Mit diesem Motiv bindet das NC2 in die Beugung der DNA gegenüber vom TBP. NC2 α wurde für die Kristallstruktur nur stark verkürzt exprimiert, wodurch seine C-terminale Domäne nicht in der Struktur enthalten ist. Bei

⁵Die parallele Arbeit von D. Reinberg und seinen Mitarbeitern führte zur äquivalenten Bezeichnung Dr1 (TFIID repressor 1) für NC2 α und DRAP1 (Dr1 associated protein) für NC2 β [82, 84, 85].

dem vollexprimierten NC2 β hingegen ist deutlich zu erkennen, wie die α -Helices des C-Terminus in direkten Kontakt mit dem TBP treten, indem sie sich von oben auf das TBP legen. Zusätzlich kommt das TBP auf der gegenüberliegenden Seite mit dem Histon-ähnlichen Motiv des NC2-Dimers in Kontakt, so dass TBP und NC2 zusammen einen ringförmigen Komplex um die gebeugte DNA bilden.

NC2 unterdrückt die Transkription durch seine Bindung an TBP, welches für die Funktionalität von allen drei eukaryotischen RNA-Polymerase-Arten bei der Transkriptionsinitiierung essentiell ist. Interessanterweise hemmt NC2 jedoch nur die DNA-Transkription durch die RNA-Polymerase II und III. NC2 ist dabei in seiner Struktur besonders in den Histon-ähnlichen Motiven hoch konserviert. So sind die homologen Formen der Hefe (*yeast* NC2, yNC2) und des Menschen (humanes NC2, hNC2) funktionell absolut gleichwertig und teilweise sogar austauschbar, was mit *in vivo*-Experimente bewiesen werden konnte [86]. NC2 erhöht die Bindungsgeschwindigkeit und Bindungsstärke von TBP an die DNA. Die Dissoziationskonstante des entstehenden NC2-TBP-Komplexes am AdML-Promotor beträgt 2 nM. NC2 erkennt dabei Promotor-gebundenes TBP mit hoher Affinität. Die Sequenzspezifität von TBP wird durch NC2 jedoch erniedrigt, was zu häufigerer TBP-Positionierung außerhalb der TATA-Box führen kann [87].

2.5.3. Mechanismus der NC2-Transkriptionshemmung

Der Mechanismus, mit dem NC2 die DNA-Transkription unterdrückt, wird bisher ausschließlich als sterische Hinderung beschrieben. Die Abbildung 2.10 zeigt die Superposition der Kristallstrukturen von den TBP-DNA-Komplexen mit NC2, TFIIA und TFIIB. Das Ergebnis weist eine deutliche räumliche Überlagerung der C-terminalen NC2 β -Domäne mit TFIIB auf und würde die Beobachtung erklären, dass TBP-DNA-gebundenes NC2 die Bindung von TFIIB hemmt [3]. Ebenfalls sterisch - wenn auch nicht so deutlich erkennbar - schließen sich TFIIA und das Histon-ähnliche NC2-Motiv aus. Eine zusätzliche, sterische Hinderung der TFIIA-Bindung durch NC2 kann von einem vollexprimierten NC2 α -C-Terminus erwartet werden, der in Abbildung 2.9 und 2.10 nicht gezeigt ist. Für diese fehlende Domäne wird angenommen, dass sie einen vergleichbaren Raumanpruch wie der C-Terminus der NC2 β -Komponente aufweist. Die sterische Hinderung der TFIIA-Bindung wird somit bei vollexprimiertem NC2 noch verstärkt. Die Hinderung erklärt, warum die

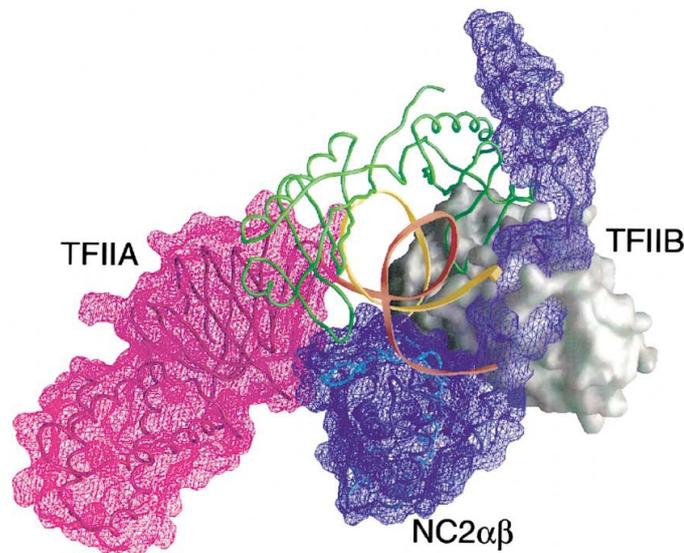


Abbildung 2.10.: Sterische Hinderung als möglicher Grund der Transkriptionshemmung durch NC2. Die Superposition der Kristallstrukturen der unterschiedlichen Komplexe von TBP (grün)-DNA (gelb und orange)-NC2 (blau), TBP-DNA-TFIIA (rot) [38] und TBP-DNA-TFIIB (grau) [88] zeigt, dass NC2 die Bindung der Transkriptionsfaktoren IIA und IIB sterisch verhindert. Der C-Terminus der NC2 α -Domäne ist in dieser NC2-Struktur nicht enthalten. (Abb. aus [3].)

Bindung von TFIIA in Konkurrenz zur Komplexierung mit NC2 steht und warum die TFIIA-Bindung der Transkriptionshemmung entgegenwirkt [86].

Diese Schlussfolgerungen aus den strukturellen Betrachtungen scheinen weitere Überlegungen zum Mechanismus der Transkriptionshemmung durch NC2 überflüssig werden zu lassen. Jüngste Ergebnisse biochemischer *in vitro*-Experimente von Prof. Dr. Michael Meisterernst und seinen Mitarbeitern geben aber eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Hemmungseffekt von NC2. In so genannten DNA-*footprinting*-Experimenten zusammen mit *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA)-Experimenten wurde herausgefunden, dass NC2 TBP von der TATA-Box delokalisieren kann ohne jedoch vom DNA-Strang dissoziieren [4].

Die Durchführung von DNA-*footprinting*-Experimenten mit TBP ist schematisch in Abbildung 2.11A gezeigt. ^{32}P -radioaktiv markierte DNA-Doppelstränge, die eine AdML-Promotorsequenz beinhalten, werden mit TBP inkubiert. Anschließend werden die Doppelstränge durch das Restriktionsenzym DNase I zerschnitten. Dabei wird die DNase-Konzentration so niedrig und ihre Inkubationszeit so kurz gewählt, dass statistisch jedes DNA-Molekül nur einmal geschnitten werden kann. Die Basen-

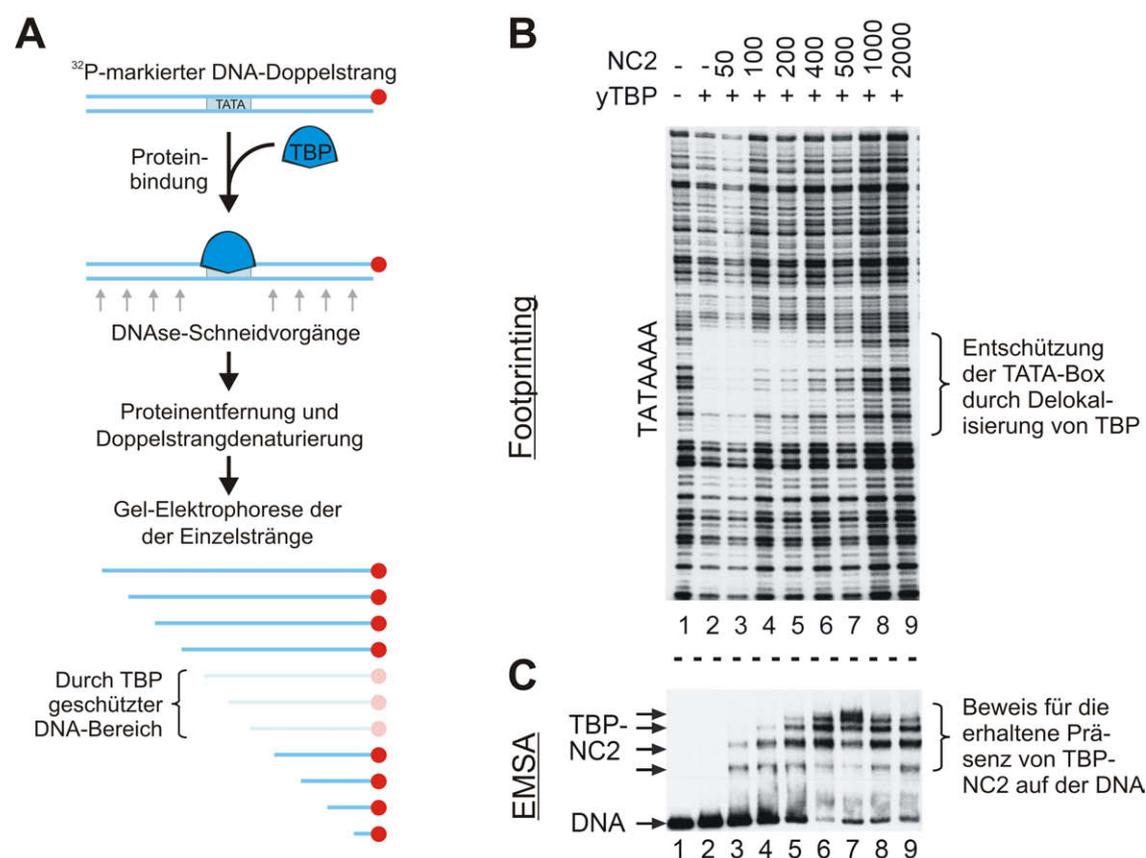


Abbildung 2.11.: DNA-footprinting und *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) mit TBP-DNA-NC2-Komplexen (aus [4]). (A) Erläuterndes Schema zur Durchführung des *footprinting*-Experimentes (vgl. Haupttext). (B) Gel des *footprinting*-Experimentes, das die Wirkung von NC2 auf den yTBP-AdMLP-Komplex zeigt: Die TATA-Box wird mit zunehmender NC2-Konzentration entschützt, was bedeutet, dass TBP delokalisiert wird. (C) Gel des parallel zum *footprinting* durchgeführten EMSA-Experimentes. Trotz der in (B) gezeigten TBP-Delokalisierung befindet sich das TBP (als Komplex mit NC2) noch auf der DNA.

paarungen der TATA-Box bleiben dabei von der DNase-Reaktion verschont, da sie durch das gebundene TBP geschützt sind. Das TBP wird danach von der DNA gelöst und die Doppelstränge werden denaturiert. Durch eine abschließende basen-genaue Gel-Elektrophorese mit autoradiographischer Visualisierung der markierten Einzelstränge können die Basen bestimmt werden, die vorher von TBP geschützt wurden. In Abbildung 2.11B ist das Ergebnis des *footprinting*-Experimentes in Form des resultierenden Gels dargestellt. Im Vergleich zur Referenz ohne TBP (Spur 1) ist der TBP-geschützte TATA-Bereich der DNA durch die fehlenden Banden in Spur 2 zu erkennen.

Wird dieses *footprinting*-Experiment nicht nur an einem Komplex aus TBP und DNA, sondern zusätzlich zusammen mit dem dritten Bindungspartner, NC2, durchgeführt, so zeigen die sich ergebenden Spuren 3 bis 9, dass mit steigender NC2-Konzentration (50 bis 2000 fmol in 20 μ L Reaktionsvolumen) der Schutz der TATA-Sequenz durch TBP verloren geht. NC2 führt also zu einer Entfernung des TBP von TATA. Die Vermutung, dass eine hohe NC2-Konzentration zur Dissoziation des TBP von der DNA führt, würde dieses Ergebnis erklären. Aber parallel zu diesem *footprinting*-Experiment wurden mit den selben Probelösungen vor der DNase-Zugabe ein EMSA-Experiment durchgeführt, bei dem die vorinkubierten TBP-DNA- bzw. TBP-DNA-NC2-Komplexe auf einem nicht-denaturierendem Gel elektrophoretisch analysiert wurden (Abb. 2.11C).

Auf dem resultierenden Gel wurde wieder die radioaktiv markierte DNA detektiert. Protein-DNA-Komplexe laufen nicht so schnell durch das Gel wie freie DNA-Moleküle. So zeigen die oberen Banden in den Spuren 3 bis 9 des EMSA-Gels DNA-Stränge, an denen zusätzlich Proteine an der DNA gebunden sind. Da NC2 ohne TBP nicht stabil an die DNA bindet [2], kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um TBP-freie NC2-DNA-Komplexe handelt. NC2-freie TBP-DNA-Komplexe können diese Banden jedoch auch nicht erklären, weil TBP ohne die bindungsverstärkende Komplexierung mit NC2 für die Elektrophorese ebenfalls nicht fest genug auf der DNA sitzt. Dies ist gut an der Spur 2 zu erkennen, die keine Protein-DNA-Bande zeigt, da der TBP-DNA-Komplex auf dem Gel zerfällt. Somit können die Protein-DNA-Banden nur als vollständige TBP-DNA-NC2-Komplexe interpretiert werden, was beweist, dass nach der NC2-Zugabe das TBP auf der DNA verbleibt. Die Beobachtung von mehr als eine TBP-DNA-NC2-Bande im EMSA-Experiment ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass TBP und NC2 im Überschuss zur DNA gegeben wurden, was zur mehrfachen Besetzung von TBP-NC2 auf einem DNA-Strang führt.

Die kombinierten Ergebnisse aus den *footprinting*- und EMSA-Experimenten - Entschützung der TATA-Box und bleibende Präsenz von TBP-NC2 auf der DNA - können nur erklärt werden, wenn es durch die NC2-Bindung zu einer Delokalisierung von TBP kommt, welche die TATA-Box für den DNase-Schneidvorgang freilegt, aber TBP trotzdem am DNA-Strang verbleiben lässt. Die NC2-Bindung muss also nach diesen Erkenntnissen zur Mobilisierung des TBP entlang der DNA führen, ohne dass

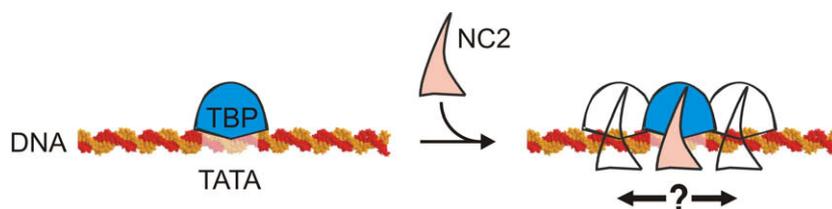


Abbildung 2.12.: Hypothese zur TBP-Mobilisierung durch NC2-Bindung. Die Ergebnisse von Meisterernst und seinen Mitarbeitern (Abbildung 2.11) können erklärt werden, wenn angenommen wird, dass TATA-gebundenes TBP nach der Komplexbildung mit NC2 mobil geworden ist und die TATA-Box ohne Dissoziation von der DNA verlassen kann. (Die DNA-Beugung wurde zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet.)

dabei das TBP dissoziiert (Abb. 2.12). Ein Modell, nachdem ein solches Wandern des TBP-NC2-Komplexes entlang des DNA-Doppelstranges möglich ist, wird durch die Beobachtung gestützt, dass TBP und NC2 eine stabile Ringstruktur um die DNA bilden und der TBP-NC2-Komplex eine hohe unspezifische DNA-Affinität aufweist [87]. Diese Hypothese zur TBP-Mobilisierung würde - äquivalente zur These der sterischen Hinderung - den Transkriptions-hemmenden Effekt von NC2 erklären bzw. zur Verstärkung des Effektes beitragen, da ohne eine Bindung von TBP an die korrekte Stelle der TATA-Box eines Promotors die Transkriptionsinitiierung nicht erfolgen kann.

Obwohl die Kristallstruktur des TBP-DNA-NC2-Komplexes (Abb. 2.9) ein statisches Bild der TBP-DNA-NC2-Verbindung zeichnet (Abb. 2.9), spricht diese Röntgenstrukturanalyse nicht zwingend gegen eine mögliche TBP-NC2-Bewegung entlang der DNA, da für den Kristall nur ein 19 bp langes Oligomer verwendet wurde. Somit könnte eine TBP-NC2-Dynamik durch die zu kurze DNA und/oder durch die auftretenden Gitterkräfte im Kristall unterdrückt worden sein.

Die Wirkung des Negativen Cofaktors 2 *in vivo* ist bis heute nicht vollständig geklärt. Neben der beschriebenen Transkriptionshemmung wurden bei der Wirkungsweise von NC2 auch stimulierende Effekte auf die DNA-Transkription beobachtet. So werden zwar TATA-Box-basierende Promotoren durch die Interaktion von NC2 unterdrückt, aber dafür DPE-basierende Startsequenzen aktiviert [89]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NC2 mit der aktivierten (phosphorylierten) RNA-Polymerase II interagiert [90] und dass NC2 an bestimmten Genen ebenfalls sehr stark mit hoch aktiven Promotoren assoziiert ist. Die vorgestellte Hypo-

these der TBP-Mobilisierung könnte auch diese positiven Effekte von NC2 auf den Transkriptionsprozess erklären, da eine TBP-Mobilität auch zum (Wieder-) Auffinden einer Promotorsequenz dienen könnte. Zusammen mit der hohen TBP-NC2-Stabilität auf der DNA würde dies bedeuten, dass NC2 zu einer schnellen Reinitiation des Transkriptionsprozesses (vgl. Abschnitt 2.3) beiträgt, indem es dafür sorgt, dass TBP nach dem Transkriptionsbeginn den DNA-Strang nicht verlassen kann, sondern nur kurzzeitig von der TATA-Box delokalisiert wird. Die Reinitiation könnte dann mit einer erhöhten TFIIA-Konzentration eingeleitet werden. Die TFIIA-Bindungskonkurrenz zu NC2 [86] führt dann zum Austausch von gebundenem NC2 durch TFIIA, sodass eine erneute PIC-Formierung beginnen kann.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Mobilitäts-Hypothese ein völlig neues Bild nicht nur für den NC2-Effekt zur Transkriptionshemmung zeichnet. Vielmehr bedeutet sie für den umfassenden Mechanismus der Promotorfindung im Allgemeinen, dass Faktoren und Cofaktoren nicht - wie bisher angenommen - immer direkt an die Promotorsequenzen binden müssen. Mit Hilfe der erlangten Mobilität durch Cofaktoren wie NC2 könnten Transkriptionsfaktoren auch ihren Platz am Promotor praktisch finden, indem sie entlang der DNA wandern. Mit der Idee einer solchen Dynamik sind zusätzlich auch mannigfaltige Regulierungsmöglichkeiten von Transkriptionsfaktoren vorstellbar, die bisher nicht erkannt oder erklärt werden konnten.

Um diese Art von Dynamik beim Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren tatsächlich nachzuweisen und im Detail zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit ein *in vitro*-Experiment entwickelt, das es mittels ultrasensitiver Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht, die Bewegungen von individuellen TBP-NC2-Komplexen entlang einzelner DNA-Stränge direkt zu beobachten.

Die Dynamik der Komplexe soll bei diesen Untersuchungen durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) von einem Donor-Fluorophor am TBP zu einem Akzeptor-Fluorophor auf der DNA beobachtet werden. Die Abstandsänderungen zwischen beiden Fluorophoren aufgrund einer TBP-Mobilität würden dann zu Änderungen der FRET-Effizienz führen, die zeitlich aufgelöst ermittelt werden könnten.

Durchgeführt werden die Einzelmolekül-Untersuchungen mit Hilfe eines

Zweifarbigen-Fluoreszenzmikroskops mit interner Totalreflexionsanregung. Der direkte Nachweis, dass NC2 für eine TBP-Mobilität verantwortlich ist, soll durch Messungen mit einem speziell entwickelten Mikro-Flusssystem erfolgen. Mit diesem Flusssystem ist es möglich, die NC2-Zugabe während einer Messung durchzuführen und so die Wirkung der NC2-Bindung an einzelnen TBP-DNA-Komplexen direkt zu beobachten.

3. Die Einzelmolekül- Fluoreszenzmikroskopie

Die Vorteile von Einzelmolekül-Untersuchungen gegenüber herkömmlichen Ensemblemessungen sind evident. Bei der Untersuchung eines ganzen Ensembles gehen interessante Ereignisse, die nicht sehr häufig vorkommen (und besonders dadurch einen hohen Informationsgehalt haben können), in der Mittelung über alle Moleküle verloren. Bei der Beobachtung einzelner Moleküle tritt dieser Nachteil nicht auf. So können mit Einzelmolekül-Experimenten die unterschiedlichen Subpopulationen einer sich heterogen verhaltenden Probe erfasst werden. Bei dynamisch stattfindenden Prozessen kann die Untersuchung individueller Biomoleküle unter Umständen zusätzlich einzelne Zustände oder Zwischenschritte im dynamischen Gesamtverlauf aufzeigen, ohne dass hierfür eine zeitliche Synchronisierung des Ensembles notwendig ist.

Um dynamische Prozesse von individuellen Proteinen direkt beobachten zu können, ist eine nicht-invasive, Einzelmolekül-sensitive Untersuchungsmethode notwendig, die es erlaubt, die Biomoleküle mit einer sehr hohen zeitlichen Auflösung in ihrer natürlichen zellulären Umgebung (*in vivo*) oder in bloßer Pufferlösung (*in vitro*) zu untersuchen. Die hoch empfindlichen Detektionsmethoden von Fluoreszenzmikroskopen machen diese Instrumente zu den Untersuchungswerkzeugen der Wahl, um die Anforderungen von Einzelprotein-Experimenten zu erfüllen (für umfangreiche Übersichtsartikel siehe [91–94]). In dieser Promotionsarbeit wurde deshalb ein ultra-sensitives Laser-Fluoreszenzmikroskop mit interner Totalreflexions-Anregung und Weitfeld-CCD-Detektion aufgebaut. Mit dieser Apparatur konnte die Dynamik einzelner TBP-DNA-NC2-Komplexe erfolgreich untersucht und zu analysiert werden.

In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen der Fluoreszenz und

die Eigenschaften von individuellen Fluorophoren behandelt. Anschließend wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer im Allgemeinen und für einzelne Moleküle im Speziellen erklärt. Die Grundlagen zur Internen Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM) schließen dieses Kapitel ab.

3.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

3.1.1. Lichtabsorption und -emission von Fluorophoren

Als Fluorophore werden chromophore Moleküle bezeichnet, die Photonen absorbieren können und die aufgenommene Energie anschließend wieder als Lichtenergie (Fluoreszenz) abgeben. Die Abbildung 3.1 zeigt in einem vereinfachten Jablonski-Diagramm, die Vorgänge dieser Lichtabsorption und -emission [95]. Durch Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge ($h\nu_A$) können chromophore Moleküle aus ihrem Grundzustand, der üblicherweise der Singulett-Konfiguration S_0 entspricht, in einem höheren Singulett-Zustand, S_1 oder S_2 , überführt werden (blaue Pfeile). Die Übergangsrate k_A für diesen Absorptionsprozess liegt bei ca. 10^{15} bis 10^{16} s^{-1} . Bei der Absorption werden für gewöhnlich die energetisch höheren Vibrationsniveaus ($v > 0$) der angeregten Zustände populiert. Durch Schwingungsrelaxationen (SR, auch thermische Äquilibration genannt, schwarzgestrichelte Pfeile) wird strahlungslose Energie mit einer Übergangsrate von $k_{SR} \approx 10^{12} \text{ s}^{-1}$ abgegeben, bis der Schwingungsgrundzustand v_0 von S_1 erreicht ist. Der Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen gleicher Spinmultiplizität (z. B. $S_2 \rightarrow S_1$) wird dabei als Innere Umwandlung (*internal conversion*, IC) bezeichnet.

Vom S_1 -Zustand gibt es mehrere Möglichkeiten für das angeregte Chromophor die absorbierte Energie wieder freizusetzen. Die Fluoreszenz (grüner Pfeil) stellt einen möglichen Übergang in den S_0 -Zustand dar, bei dem Photonen als spontane Emission ($h\nu_F$) mit einer Übergangsrate von $k_F = 10^6 \dots 10^9 \text{ s}^{-1}$ wieder abgegeben werden. Das Franck-Condon-Prinzip besagt, dass die Atomkerne des chromophoren Systems zu träge sind, um während des schnellen Elektronenübergangs ihre Positionen dem angeregten Molekülzustand anzupassen. Bei einer Elektronenanregung aus dem Schwingungszustand v_0 von S_0 ist deshalb ein Übergang am wahrschein-

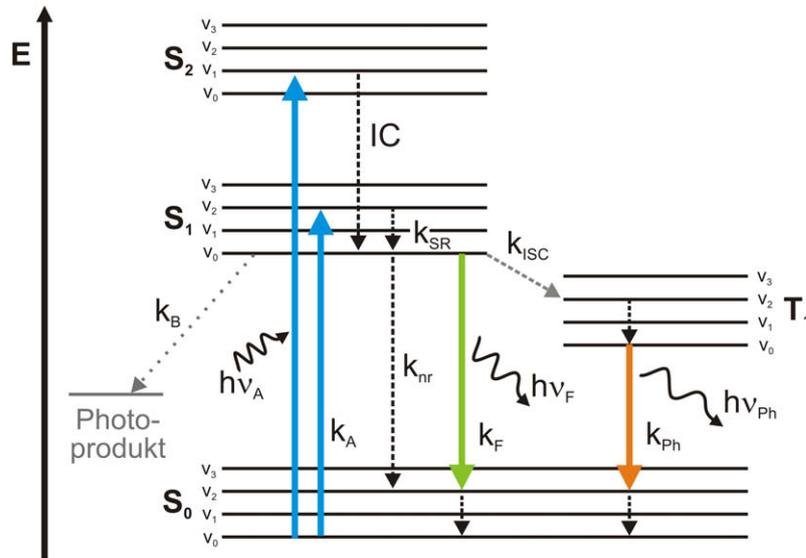


Abbildung 3.1.: Vereinfachtes Jablonski-Termschema (nach [95]). Eingezeichnet sind verschiedene Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen bzw. deren Schwingungszuständen mit den jeweiligen Übergangsraten.

lichsten, der im angeregten Zustand S_1 oder S_2 nicht den Schwingungsgrundzustand, sondern einen höheren Schwingungszustand besetzt. Analog hierzu wird bei der Deaktivierung durch Fluoreszenzemission am wahrscheinlichsten ein Schwingungszustand mit $v > 0$ im S_0 -Zustand populiert. Die Vorgänge der strahlungslosen Relaxation, die aufgrund des Franck-Condon-Prinzips nach dem Absorptions- bzw. Emissionsprozess im S_1 - bzw. S_0 -Zustand stattfinden, führen zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsspektrums (*Stokes-Shift*). Durch die Tatsache, dass der Fluoreszenzübergang stets vom Schwingungsgrundzustand des S_1 -Niveaus geschieht, weil die SR- und IC-Prozesse viel schneller stattfinden als die Fluoreszenzemission ($k_F \ll 10^{12} \text{ s}^{-1}$), ist das resultierende Fluoreszenzspektrum unabhängig von der absorbierten Anregungswellenlänge (Kasha-Regel).

Eine weitere Möglichkeit den S_1 -Zustand zu depopulieren, besteht in der Spinumkehr, die eine strahlungslose Interkombination (*intersystem crossing*, ISC, grau gestrichelter Pfeil) in den ersten Triplett-Zustand T_1 darstellt und durch Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht wird. Vom T_1 -Energieniveau kann das Molekül ebenfalls durch Lichtemission ($h\nu_{Ph}$) in den S_0 -Zustand zurückkehren. Dieser als Phosphoreszenz bezeichnete Übergang (oranger Pfeil) ist nach der Spinauswahlregel ($\Delta S = 0$) jedoch verboten und findet mit entsprechend geringer Wahrscheinlichkeit statt. Aus diesem

Grund ist der T_1 -Zustand sehr langlebig und die Übergangsraten sind mit $k_F = 10^2 \dots 10^4 \text{ s}^{-1}$ sehr klein.

Neben den beschriebenen Übergängen, die den Prozess der Lichtemission beinhalten, gibt es auch eine Vielzahl von strahlungslosen Wegen zur Deaktivierung des angeregten Chromophors. Hierzu gehören z. B. die Energieabgabe durch Stoßprozesse mit Lösungsmittelmolekülen (Fluoreszenzlöschung, *quenching*), Prozesse des resonanten Energietransfers (vgl. Abschnitt 3.2) oder die bereits beschriebene Inere Umwandlung bzw. Schwingungsrelaxation. Des Weiteren kann es durch photochemische Reaktionen des angeregten Fluorophors (häufig mit Singulett-Sauerstoff-Photooxidation durch $^1\Delta_g\text{O}_2$ - oder mit Hydroxylradikalen) zum irreversiblen Bleichen des Chromophors kommen. Das Bleichen eines Fluorophors limitiert somit dessen Anzahl seiner möglichen Absorption-Emission-Zyklen. Die Bleichrate k_B eines Fluorophors (grau gepunkteter Pfeil in Abb. 3.1) wird von der Stabilität des π -Elektronensystems im angeregten Zustand bestimmt, welche u. a. von den Messparametern wie Temperatur, pH-Wert oder Sauerstoffgehalt des Mediums abhängig ist (vgl. hierzu auch Abschnitt 3.1.3).

Die strahlungslosen Deaktivierungsprozesse konkurrieren mit dem Fluoreszenzübergang, was einer hohen Quantenausbeute aus dem Fluoreszenzprozess entgegenwirkt und die Anzahl der emittierten Photonen verringert. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F eines Chromophors ist definiert als

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_F}{k_A} = \frac{k_F}{k_F + \Sigma k_{nr}}, \quad (3.1)$$

wobei Σk_{nr} die zusammenfassende Übergangsrate für alle strahlungslosen Deaktivierungsprozesse des S_1 -Zustandes (inkl. k_{ISC} und k_B) darstellt. Die Fluoreszenzrate k_F wiederum kann über das Absorptionsspektrum (gegeben durch $\varepsilon(\nu)$) und das Fluoreszenzspektrum (gegeben durch $f(\nu)$) des Chromophors bestimmt werden [96]:

$$k_F = \frac{8\pi \cdot \ln 10 \cdot 10^3}{c^2 \cdot N_A} n^2 \frac{\int f(\nu) d\nu}{\int f(\nu) d\nu / \nu^3} \int \frac{\varepsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (3.2)$$

mit der Lichtgeschwindigkeit c , der Avogadro-Konstante N_A , dem Brechungsindex n des Mediums und der Frequenz ν .

Optimale Eigenschaften von Fluorophoren für die Fluoreszenzmikroskopie sind im Allgemeinen eine hohe Quantenausbeute, ein hoher Extinktionskoeffizient und

eine hohe Anzahl der möglichen Photozyklen. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Fluoreszenzphotonen zu erhalten, müssen nach Gleichung 3.1 die strahlungslosen Übergänge minimiert werden. Die Helligkeit eines angeregten Fluorophors (Photonenausbeute pro Zeit) ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeit für den Emissionsübergang, die nach Gleichung 3.2 umso höher ist, je größer der stoffspezifische Extinktionskoeffizient ($\varepsilon(\nu)$) des Chromophors ist.

Die mittlere Zeit eines Fluorophors im angeregten Zustand S_1 wird als Fluoreszenzlebensdauer τ eines Farbstoffmoleküls bezeichnet und kann $10^{-10} \dots 10^{-7}$ s betragen. τ ergibt sich aus den Übergangsraten zu

$$\tau = \frac{1}{k_F + \Sigma k_{nr}} . \quad (3.3)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer stellt eine wichtige Größe zur Charakterisierung des zeitlichen Verfalls der Fluoreszenzeigenschaft von Chromophoren dar. Dieser Verfall kann im einfachsten Fall als monoexponentieller Verlauf beschrieben werden:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} , \quad (3.4)$$

wobei $I(t)$ die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit und I_0 die Intensität zu Beginn der Photozyklen ist.

3.1.2. Fluoreszenz-Anisotropie

Fluorophore verhalten sich bei der Lichtemission wie strahlende Dipole [97]. Die abgegebene Fluoreszenz ist entlang des Emissions-Übergangsdipolmomentes polarisiert. Dieses Übergangsdipolmoment ergibt sich aus der molekularen Struktur des π -Elektronensystems. Analog hierzu wird ein Fluorophor mehr Photonen absorbieren, wenn der elektronische Vektor der aufgenommenen Lichtteilchen parallel zum Absorptions-Übergangsdipolmoment des Farbstoffmoleküls orientiert ist. Wird ein Fluorophor-Ensemble, in dem die einzelnen Farbstoffmoleküle zufällig im Raum verteilt sind, mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, werden Fluorophore somit stärker angeregt, wenn ihr Absorptions-Übergangsdipolmoment in der räumlichen Ausrichtung eine hohe Parallelkomponente zur Anregungspolarisation aufweist (Photo-selektion).

Wird - wie in Abbildung 3.2 gezeigt - die aus einer vertikal polarisierten Anregung entstehende Fluoreszenz polarisationsabhängig detektiert, so kann das Ausmaß der

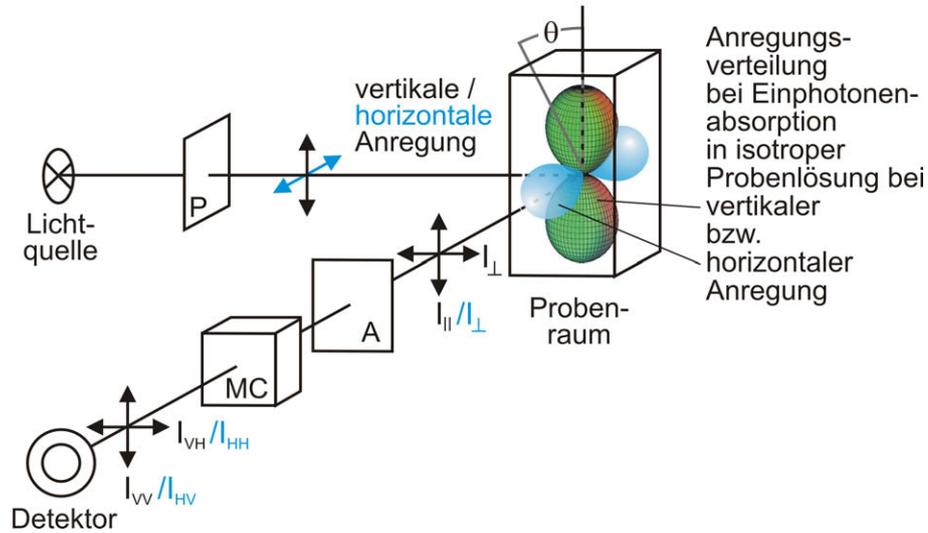


Abbildung 3.2.: Schematischer Fluorimeteraufbau zur Messung der Fluoreszenz-Anisotropie. Das Anregungslicht wird mittels Polarisator P linear polarisiert. Der vertikale bzw. horizontale Intensitätsanteil der Fluoreszenzemission (I_{\parallel} bzw. I_{\perp}) werden durch den Polarisationsanalysator A voneinander getrennt und nach Passieren des Monochromators MC als I_{VV} und I_{VH} detektiert. Die veränderten Intensitätsbezeichnungen bei horizontaler Anregung zur Bestimmung des G-Faktors sind blau eingezeichnet.

Emissionspolarisation in Form der Fluoreszenz-Anisotropie r beschrieben werden [98]:

$$r = \frac{\text{(vertikal) polarisierte Fluoreszenzintensität}}{\text{gesamte Fluoreszenzintensität}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (3.5)$$

dabei ist I_{\parallel} bzw. I_{\perp} die detektierte Fluoreszenzintensität bei vertikal (\parallel) bzw. horizontal (\perp) eingestelltem Detektionspolarisator (Analysator). Nach dieser Definition der Anisotropie kann r Werte zwischen 1 ($I_{\perp} = 0$) und $-0,5$ ($I_{\parallel} = 0$) annehmen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor polarisiertes Licht absorbiert, ist proportional zu $\cos^2 \theta$, wobei θ der Winkel zwischen dem Absorptions-Übergangsdipolmoment des Farbstoffmoleküls und der Polarisationsachse des Anregungslichts ist. Die photoselektive Verteilung der Moleküle, die mit polarisiertem Licht angeregt werden können, ist unter der Annahme, dass eine Einphotonen-Absorption in isotroper Probenlösung stattfindet, somit gegeben als

$$f(\theta)d\theta = \cos^2 \theta \sin \theta d\theta. \quad (3.6)$$

Die Anregungsverteilung für eine vertikale Anregungspolarisation sowie der Win-

kel θ sind in der Abbildung 3.2 schematisch im Probenraum eingezeichnet. Diese Anregungsverteilung ergibt einen photoselektiven Effekt, der die Anisotropie einer fluoreszierenden Ensemble-Probe auf $r = 0,4$ begrenzt [95].

Sind keine dynamischen Depolarisierungsprozesse, wie z. B. Molekülrotation, beteiligt, wird die nach Gleichung 3.5 erhaltene Anisotropie als fundamentale Anisotropie r_0 bezeichnet. Neben der Photoselektion wird r_0 durch einen depolarisierenden Effekt limitiert, der auf der räumlich unterschiedlichen Lage von Absorptions- und Emissions-Übergangsmoment eines Fluorophors basiert:

$$r_0(\beta) = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (3.7)$$

mit dem konstanten Faktor von $\frac{2}{5}$, der die Photoselektion beschreibt. Der zweite Term dieser Gleichung berücksichtigt den Winkel β zwischen dem Absorptions- und Emissions-Übergangsmoment. Der resultierende Wertebereich der Anisotropie eines Fluorophors (ohne Molekülrotationsprozesse) erstreckt sich somit von $r_0 = -0,2$ (für $\beta = 90^\circ$) bis $r_0 = 0,4$ (für $\beta = 0^\circ$).

Die Polarisation der Emission kann durch den Prozess der Molekülrotation stark verringert werden. Wenn die Rotation innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes zu einer Drehung der Dipolachsen führt, wird die Fluoreszenz depolarisiert. Die Berücksichtigung dieser Rotations-Depolarisierung führt zur so genannten Perrin-Gleichung:

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\xi)}, \quad (3.8)$$

wobei τ die Fluoreszenzlebensdauer und ξ die Rotationskorrelationszeit ist. Letztere ist für sphärische Moleküle gegeben als

$$\xi = \frac{\eta V}{RT} \quad (3.9)$$

mit der Abhängigkeit von der Viskosität η , dem Volumen des rotierenden Moleküls V , der allgemeinen Gaskonstanten R und der Temperatur T .

Aus Gleichung 3.8 wird deutlich, dass bei einer Probe von frei rotierenden Fluorophoren, für die $\xi \ll \tau$ gilt, die Anisotropie dieser Probe gegen Null geht. Bei der Untersuchung von fluoreszierenden (oder mit einem Fluorophor markierten) Proteinen trifft dies nur dann zu, wenn das Protein eine geringe Masse aufweist, die

3. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

Viskosität des Mediums niedrig genug und/oder die Temperatur hoch genug ist. Für globuläre Proteine in wässriger Lösung kann ξ näherungsweise beschrieben als

$$\xi = \frac{\eta M}{RT}(\bar{v} + h) , \quad (3.10)$$

wobei M die molekulare Masse, \bar{v} das spezifischen Proteinvolumen und h den Beitrag der Hydrathülle des Proteins darstellt [95].

Bei extern markierten Proteinen ist die Rotationsbewegung des Fluorophors, das üblicherweise über eine kurze Kohlenwasserstoffkette ($(\text{CH}_2)_{6-9}$) am Protein gebunden ist, gesondert zu betrachten. Diese Teilbewegungen (*segmental motions*) sind bei nicht vorhandenen Fluorophor-Protein-Wechselwirkungen unabhängig von der Gesamtrotation des markierten Proteins. Und da das Fluorophor in der Regel viel kleiner ist als das Protein, sind die Teilbewegungen der Fluoreszenz-Sonde viel schneller als die des Gesamtkomplexes. Nach Gleichung 3.10 ist die Rotationskorrelationszeit für schwere Proteine sehr lang, was nach Gleichung 3.8 bedeutet, dass die Rotation solcher Proteine keinen depolarisierenden Effekt auf die Emission haben. Unter dieser Annahme ergibt sich zusammen mit der fundamentalen Anisotropie des Fluorophors an einem schweren Protein die resultierende Anisotropie der fluoreszierenden Sonde zu

$$r(\alpha) = r_0 \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right) , \quad (3.11)$$

wobei α der Winkel ist, um den sich das Fluorophor im angeregten Zustand gedreht hat.

Die unterschiedlichen Depolarisierungsbeiträge d_i aus den Gleichungen 3.7, 3.8 und 3.11 können nach der Soleillet-Regel als gemeinsames Produkt zusammengefasst werden, woraus sich die resultierende Anisotropie des Protein-Fluorophor-Komplexes ergibt:

$$r = \prod_i d_i = \frac{2}{5} \cdot \frac{3 \cos \beta - 1}{2} \cdot \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\xi}\right)} . \quad (3.12)$$

Experimentell bestimmt werden, kann die Fluoreszenz-Anisotropie in Abhängigkeit der Zeit oder als Durchschnittswert über den gesamten Messungszeitraum. Für beide Methode kann eine Fluorimeteranordnung genutzt

werden, wie sie schematisch in Abbildung 3.2 gezeigt ist. Zur Messung der Anisotropie muss allerdings zusätzlich die polarisationsabhängige Transmissionseffizienz des Monochromators und der anderen optischen Elemente im Detektionspfad des Fluorimeters berücksichtigt werden. Detektiert werden die Intensitäten I_{VV} und I_{VH} , wobei der erste Index auf die vertikale Anregungspolarisation, der zweite Index auf die vertikale bzw. horizontale Detektionspolarisation hinweist. Diese Intensitäten beinhalten neben den gesuchten Werte I_{\parallel} und I_{\perp} auch die unterschiedlichen polarisationsabhängigen Sensitivitäten S_V und S_H der vertikalen bzw. horizontalen Detektion:

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad (3.13)$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp} , \quad (3.14)$$

wobei k ein zusätzlicher Proportionalitätsfaktor ist, der zur Korrektur für weitere Instrumentalfaktoren sowie der Quantenausbeute der Fluorophore dient, sodass die ermittelte Anisotropie unabhängig von der Apparatur und der Helligkeit der eingesetzten Farbstoffe ist. Dividieren der Gleichungen 3.13 und 3.14 ergibt

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} . \quad (3.15)$$

Der G -Faktor fasst die Polarisations sensitivitäten der Detektion zusammen und kann aus Messungen mit horizontal polarisiertem Anregungslicht bestimmt werden, welche zu den detektierten Intensitäten I_{HV} und I_{HH} führen (vgl. Abb. 3.2):

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = \frac{S_V}{S_H} = G \quad (3.16)$$

Die Anisotropie ergibt sich dann aus den polarisationsabhängigen Fluoreszenzintensitäten der Probenmessung zu

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} . \quad (3.17)$$

3.1.3. Fluoreszenz einzelner Chromophore

Damit die Fluoreszenzdetektion als geeignete Einzelmolekül-Untersuchungsmethode bei individuellen Biomolekülen eingesetzt werden kann, müssen die Biomoleküle mit einem geeignetem Farbstoffmolekül markiert werden.

Es wurde bereits erwähnt, dass Fluorophore für die Fluoreszenzmikroskopie besonders hell (hohe Quantenausbeute und hoher Extinktionskoeffizient) und sehr photostabil sein sollten. Zur Anwendung für die Einzelmolekül-Mikroskopie sind diese Eigenschaften besonders wichtig. Bei *in vivo*-Untersuchungen müssen die Proteine häufig direkt verbunden mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) und dessen Varianten (YFP, RFP, etc.) exprimiert werden [99]. Aufgrund ihrer relativ niedrigen Extinktionskoeffizienten und ihrer geringeren Anzahl an möglichen Photozyklen im Vergleich zu synthetisch hergestellten Fluorophoren, wie z. B. Atto-, Alexa- oder Cyanin-Farbstoffen, werden die synthetischen Farbstoffe für *in vitro*-Experimente bevorzugt [100]. Für diese Experimente können die zu untersuchenden Biomoleküle extrazellulär mit dem Fluorophor verbunden werden.

Der Beweis, dass während einer Einzelmolekül-Untersuchung tatsächlich individuelle Fluorophore detektiert werden, kann durch die Betrachtung der zeitlichen Intensitätsverläufe (Zeitspuren) der einzelnen Fluoreszenzmoleküle erbracht werden. Das Bleichen aufgrund des Zusammenbruchs des π -Elektronensystems geschieht bei individuellen Fluorophoren in einem digitalen Schritt (Abb. 3.3A). Sind an einem einzelnen Fluoreszenzsignal mehrere Farbstoffmoleküle beteiligt, weil die Probenkonzentration für die räumliche Auflösung der Untersuchungsmethode zu hoch ist oder weil an einem Biomolekül mehrere Fluorophore gebunden sind, so kann die Anzahl der fluoreszierenden Einzelmoleküle anhand der detektierten Bleichschritte festgestellt werden (Abb. 3.3B). Zweistufige Intensitäts-Zeitspuren, wie z. B. in Abbildung 3.3B dargestellt, wurden jedoch bei den durchgeführten Einzelmolekül-Untersuchungen für diese Arbeit manchmal auch an einzelnen Fluorophoren (Atto532) beobachtet. Ein solches Bleichverhalten individueller Farbstoffmoleküle kann u. a. durch partielle Fluoreszenz-Löschung am Chromophor erklärt werden (vgl. Abb. 6.21).

Eine weitere typische Eigenschaft von einzelnen Fluorophoren stellt die An-Aus-Dynamik ihrer Intensitätsverläufe dar. Dieses als Blinken detektierbare Verhalten beruht auf dem ISC-Übergang, der das angeregte Molekül vom kurzlebigen Singulettzustand in einen langlebigen Triplettzustand oder andere Dunkelzustände überführt (Abschnitt 3.1.1). Da während der relative langen Zeit im Dunkelzustand, die je nach Farbstoff und Messbedingungen bis zu mehrere Sekunden betragen kann, kein Licht emittiert wird, ist diese Phase als digitales An-Aus-An-Signal zu beob-

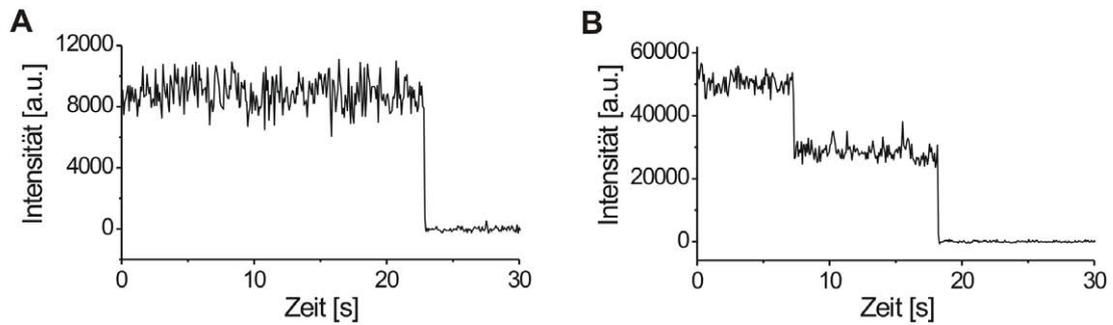


Abbildung 3.3.: Digitale Bleichschritte individueller Fluoreszenzmoleküle. (A) Der zeitliche Intensitätsverlauf des Fluoreszenzsignals eines einzelnen Atto532-Moleküls. (B) Die Zeitspur von zwei Atto647-Molekülen, die am selben DNA-Strang gebunden sind, zeigt entsprechend zwei identifizierbare Bleichschritte.

achten (Abb. 3.4).

Allerdings ist bei der Untersuchung von einzelnen Proteinen das Blinken des fluoreszierenden Markers unerwünscht, da es eine Interpretation der Fluoreszenz-Zeitspur - besonders bei biomolekular-dynamischen Prozessen - unmöglich macht. Gelöster Sauerstoff im Probenmedium löscht den Triplett-Zustand und unterbindet damit das Blinken bei einigen Fluorophorsystemen. Der Sauerstoff erhöht aber wiederum die Bleichrate (vgl. Abschnitt 3.1.1). Eine verringerte Bleichrate kann deshalb durch die Anwendung von O_2 -freien Lösungen mit Hilfe von enzymatischen Sauerstoff-Abfangreaktionen (*oxygen scavenger systems*) erreicht werden [101]. Angewendet wird dazu eine Mischung von Glukose-Oxidase und Katalase. Diese Lösung

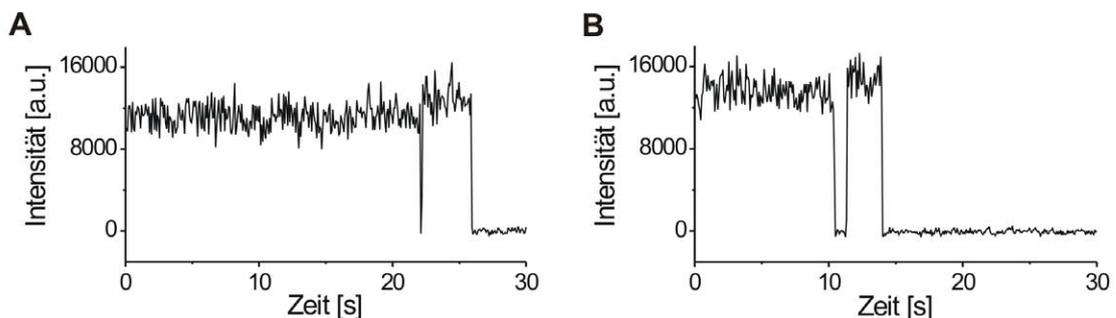


Abbildung 3.4.: Vereinzelt Blink-Ereignisse individueller Atto647-Farbstoffmoleküle. Durch den Übergang in einen Triplettzustand kann das Emissionssignal des Fluorophors für einen Zeitraum von wenigen Millisekunden (A) bis zu mehreren Sekunden (B) aussetzen.

setzt in zwei Schritten den gelösten Sauerstoff mit zugegebener Glukose in Glukonsäure und Wasser um [102].

Während das Bleichen bei einigen Fluorophoren somit durch die Anwendung des *oxygen scavenger system* reduziert werden kann, wird zusätzlich zur Vermeidung der Blinkvorgänge der Triplett-*quencher* Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) als Sauerstoffersatz eingesetzt [103]. Das alternativ zum Trolox gebräuchliche β -Mercaptoethanol (BME) zur Verhinderung der Blinkvorgänge des Cyanin-Farbstoffes Cy5 hingegen unterdrückt nur schnelles Fluorophor-Blinken auf der Millisekunden-Skala [104].

3.2. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

3.2.1. Grundlagen zum Energietransfer

In Abschnitt 3.1.1 wurden bereits verschiedene Prozesse beschrieben, die zur Deaktivierung eines angeregten Fluorophors beitragen. Ein strahlungsloser Übergang zur Depopulierung des S_1 -Niveaus ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET, nach dem quantenmechanischen Begründer dieses Prozesses auch als *Förster-Resonanz-Energietransfer* bezeichnet). Wie in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt, wird dabei die aufgenommene Energie eines Donor-Fluorophors ($h\nu_A^D$) aus dessen S_1 -Zustand strahlungslos über eine kurze Distanz (1 - 10 nm) an ein Akzeptor-Chromophor übertragen (grau gestrichelter Pfeil) [105]. Ist der Akzeptor ebenfalls ein Fluorophor, so kann die vom Donor übertragene Energie als Akzeptor-Fluoreszenz (roter Pfeil, $h\nu_F^A$) abgegeben werden [106].

Der FRET-Prozess wird durch intermolekulare Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit hoher Reichweite hervorgerufen und geschieht ohne die Beteiligung von Photonen aufgrund von induktiver Resonanz. FRET muss daher vom Prozess der Reabsorption unterschieden werden, bei dem die Photonen der Donoremission durch Akzeptormoleküle aufgenommen werden.

Die FRET-Übergangsrate k_T zwischen zwei Fluorophoren hängt entscheidend von ihrem Abstand zueinander ab:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6, \quad (3.18)$$

wobei τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und

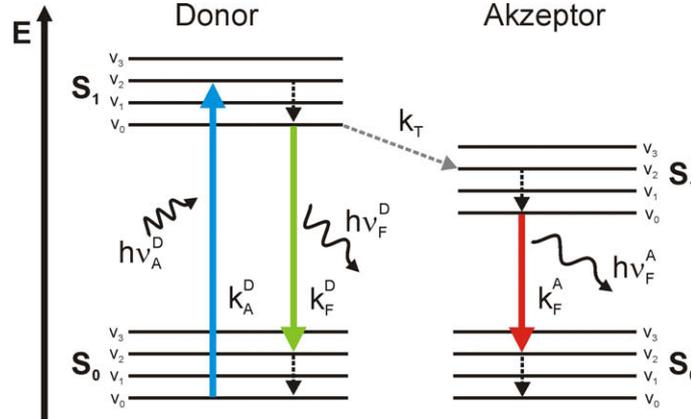


Abbildung 3.5.: Termschema zum Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer. Die vom Donor-Fluorophor absorbierte Lichtenergie $h\nu_A$ kann im angeregten Zustand durch Resonanz-Energietransfer an ein Akzeptor-Fluorophor abgegeben werden. Die resultierende Akzeptor-Emission $h\nu_F^A$ ist im Vergleich zur Donor-Fluoreszenz $h\nu_F^D$ bathochrom verschoben (vgl. Abb. 3.7).

R der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren ist. R_0 wird als Förster-Radius bezeichnet und gibt den Abstand an, bei dem 50% aller Absorptionsereignisse des Donors (D) an den Akzeptor (A) transferiert werden. Die Abbildung 3.6 zeigt den exemplarischen Verlauf der Energieübertragungseffizienz E in Abhängigkeit von R , wobei E definiert ist als

$$E = \frac{\text{Anzahl der [D} \rightarrow \text{A]-Transferereignisse}}{\text{Anzahl aller D-Absorptionsereignisse}} = \frac{k_T}{k_T + \tau_D^{-1}}. \quad (3.19)$$

Die Kombination mit Gleichung 3.18 ergibt die direkte Beziehung der Effizienz zum Abstand R [6]:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (3.20)$$

Diese Abhängigkeit vom D-A-Abstand im sensitiven Bereich von 10 bis 100 Å macht FRET zu einem häufig angewandten Werkzeug in der Biophysikalischen Spektroskopie, um den intra- oder intermolekularen Abstand in biomolekularen Proben-systemen zu bestimmen [7, 107].

Der Förster-Radius R_0 ist wiederum abhängig von den spektralen Eigenschaften und der räumlichen Orientierung der beteiligten Fluorophore zueinander [95]:

$$R_0 = \left(\frac{9000(\ln 10)\Phi_D}{128\pi^5 N_A n^4} \kappa^2 J(\lambda) \right)^{\frac{1}{6}}, \quad (3.21)$$

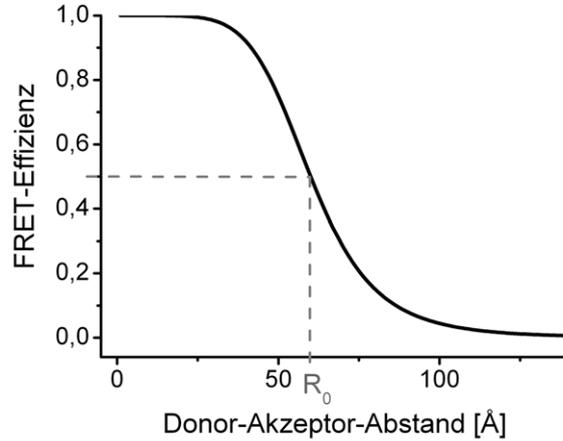


Abbildung 3.6.: Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand des FRET-Paares Atto532 und Atto647 ($R_0 = 60 \text{ \AA}$).

wobei Φ_D die Quantenausbeute des Donors (in Abwesenheit des Akzeptors), N_A die Avogadro-Konstante, n der Brechungsindex des Mediums, κ^2 der Orientierungsfaktor und $J(\lambda)$ das Überlappungsintegral ist. Letzteres gibt das Ausmaß der spektralen Überlappung zwischen normierter Donoremission $I_D(\lambda)$ und normierter Akzeptorabsorption $\varepsilon_A(\lambda)$ wieder (schematisch als schattierte Fläche in Abb. 3.7 gezeigt):

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.22)$$

Die relative Lage der entsprechenden Donoremissions- bzw. Akzeptorabsorptions-Übergangsdipolvektoren ($\vec{\mu}_F^D$ bzw. $\vec{\mu}_A^A$) zueinander kann durch den Orientierungsfaktor κ^2 beschrieben werden [108]. Dieser ergibt sich aus der räumlichen Betrachtung (vgl. Abb. 3.8) zu

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 . \quad (3.23)$$

θ_T ist der Winkel zwischen beiden Vektoren. θ_D bzw. θ_A sind die Winkel zwischen den Übergangsdipolen und dem Abstandsvektor \vec{R} , der die beiden Dipole verbindet. Stehen die Übergangsdipole senkrecht zueinander, folgt $\kappa^2 = 0$ und es kann kein Energietransfer stattfinden. Liegen die Vektoren hingegen in gleicher Richtung collinear zueinander, so wird mit $\kappa^2 = 4$ der Maximalwert des Orientierungsfaktors

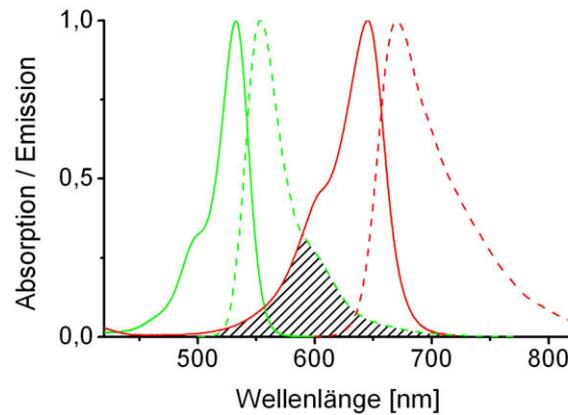


Abbildung 3.7.: Spektrale Überlappung als Voraussetzung des FRET-Prozesses. Aufgetragen sind die normierten Absorptions- (durchgehend) und Emissionsspektren (gestrichelt) des Donors Atto532 (grün) und des Akzeptors Atto647 (rot). Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ zwischen der Donoremission und der Akzeptorabsorption ist schematisch als schattierte Fläche wiedergegeben.

erreicht. Die Energietransfer-Effizienz ist dann ebenfalls, für einen gegebenen Abstand R , maximal. Können beide Fluorophore während des FRET-Prozesses frei und schnell rotieren, so ergibt sich ein Mittelwert für die Dipolorientierung von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ [109]. Vom Hersteller synthetischer FRET-Paare werden deshalb die R_0 -Werte nur für den Fall $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ angegeben.

Ohne eine schnelle Reorientierung der Übergangsdipolmomente und die dadurch erlaubte zeitliche Mittelung von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ kann eine Änderung der Übergangsdipolorientierung theoretisch zu deutlichen Änderungen in der FRET-Effizienz führen. Ein dynamischer Verlauf der FRET-Effizienz während einer Messung kann deshalb nur dann sicher als eine Änderung des D-A-Abstandes interpre-

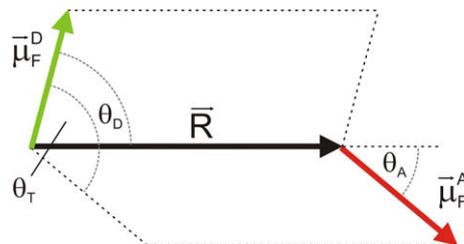


Abbildung 3.8.: Schema zur Abhängigkeit des Orientierungsfaktors κ^2 von den Richtungen des Donor- bzw. Akzeptor-Übergangsdipolmomentes (grüner bzw. roter Vektor).

tiert werden, wenn z. B. durch Anisotropiemessungen die freie Rotierbarkeit der Fluorophore nachgewiesen wurde.

3.2.2. Einzelpaar-FRET

Es gibt mehrere Möglichkeiten die FRET-Effizienz E aus Ensemble-Fluoreszenzmessungen zu bestimmen. So kann E z. B. durch die Intensitätszunahme der Akzeptoremission oder die Intensitätsabnahme der Donoremission ermittelt werden. Beiden Methoden ist jedoch gemein, dass zur korrekten Auswertung der Fluoreszenzmessungen von markierten Biomolekülen die Effizienz der Farbstoffmarkierung berücksichtigt werden muss [106, 110]. Dieses Problem tritt bei der Detektion von einzelnen FRET-Paaren (*single pair* FRET, spFRET [111]) nicht auf. Bei der spFRET-Spektroskopie können einzelne Probenkomplexe, die mit Donor und Akzeptor markiert sind, von unvollständig markierten (nur Donor oder nur Akzeptor) direkt unterschieden werden.¹

Die spFRET-Effizienz kann dann als Verhältnis der Akzeptorintensität zur Gesamtintensität bestimmt werden [112, 113]:

$$E = \frac{\text{Akzeptorintensität}}{\text{Gesamtintensität}} = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D}, \quad (3.24)$$

wobei I_D bzw. I_A die Donor- bzw. Akzeptorintensität repräsentiert. γ ist ein Korrekturfaktor, der die unterschiedlichen Fluoreszenz-Quantenausbeuten (Φ_F^D bzw. Φ_F^A) und die instrumentellen Detektionseffizienzen (η^D bzw. η^A) für den Donor bzw. Akzeptor berücksichtigt [114]:

$$\gamma = \frac{\eta^A \Phi_F^A}{\eta^D \Phi_F^D}. \quad (3.25)$$

Der γ -Faktor kann in Abhängigkeit der Messbedingungen (pH-Wert, Temperatur, optische Justage, Eigenschaften der angewandten Filtersätze,...) stark variieren, weshalb er für jede Messung - besser noch für jedes individuelle Molekül - neu bestimmt werden sollte. Die Abbildung 3.9 zeigt einen exemplarischen Verlauf der Intensitäten und der ermittelten FRET-Werte eines einzelnen FRET-Paares.

¹Auch bei der Bestimmung von Ensemble-FRET-Werten mittels Fluoreszenzlebensdauer-messungen ist die Markierungseffizienz irrelevant. Ein solches Verfahren zur FRET-Bestimmung eignet sich jedoch nicht für Untersuchungen von Prozessen mit schneller Dynamik.

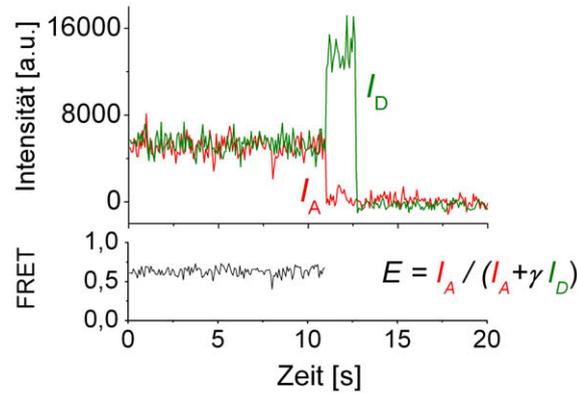


Abbildung 3.9.: Exemplarischer spFRET-Verlauf. Der Hintergrund-korrigierte Verlauf der Donor(Atto532)- bzw. Akzeptor(Atto647)intensität (grün bzw. rot) zeigt eine typische Einzelpaar-FRET-Zeitspur, bei der die detektierte Donorintensität in einem antikorrelierten Schritt zum Zeitpunkt des Akzeptor-Bleichereignisses ansteigt, da kein Energietransfer zum Akzeptor mehr möglich ist. Die resultierende Zeitspur der FRET-Effizienz (schwarz, mit $\gamma = 0,55$) endet deshalb zusammen mit dem Akzeptor-Bleichen.

Weitere Korrekturen für eine unverfälschte Bestimmung von E werden erforderlich, wenn es bei der Donoremission zum spektralen Übersprechen (*spectral crosstalk*) in die simultan stattfindende Detektion der Akzeptor-Fluoreszenz kommt. Dies würde zu einem erhöhten Wert für I_A und einem erniedrigten Wert für I_D führen. Die ermittelte FRET-Effizienz nach Gleichung 3.24 wäre somit zu hoch bestimmt worden. Die direkte Anregung des Akzeptors durch die Überlappung seines Absorptionsspektrums mit der Donor-Anregungswellenlänge ergibt ebenfalls einen erhöhten I_A -Wert, der eine entsprechende Korrektur für die E -Bestimmung erfordert [115]. Wird der Anteil des spektralen Übersprechens (β) und der Anteil der Akzeptor-Direktanregung (α) berücksichtigt, so folgt für die Gleichung 3.24:

$$E = \frac{I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{\text{dir}}}{I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{\text{dir}} + \gamma I_D}, \quad (3.26)$$

wobei I_A^{dir} die Akzeptoremission bei direkter Anregung mit der Akzeptor-spezifischen Anregungswellenlänge ist und hier als Referenzsignal dient. In dieser Gleichung beinhaltet der γ -Faktor bereits die Verringerung des Donorsignals durch das spektrale Übersprechen. Zur Ermittlung von γ müssen deshalb korrigierte Akzeptorintensitäten ($I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{\text{dir}}$) verwendet werden. Die experimentelle Bestimmung der verschiedenen Korrekturfaktoren aus Intensitätszeitspuren einzelner FRET-Paare

wird in Abschnitt 5.2 erläutert. Die Direktanregung und das spektrale Übersprechen können jedoch häufig vernachlässigt werden, weil beide Effekte zu gering sind ($< 5\%$), um den experimentellen Mehraufwand zu rechtfertigen, oder weil nicht der Absolutwert von E , sondern nur die Änderung der FRET-Effizienz bestimmt werden soll.

3.3. Interne Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie

Um einzelne Fluorophore mikroskopisch untersuchen zu können, muss eine Mikroskopiemethode angewandt werden, die bei der Messung ein hohes Signal/Hintergrund-Verhältnis liefert. Durch die Wahl eines Fluoreszenzfarbstoffs mit hohem Extinktionskoeffizienten und hoher Fluoreszenz-Quantenausbeute kann das zu detektierende Signal maximiert werden. Eine Erniedrigung des Hintergrundsignals ist hingegen von der mikroskopischen Apparatur abhängig. Ein besonders geringer Fluoreszenzhintergrund wird mit der internen Totalreflexions-Anregung (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM) erreicht. Mit dieser Mikroskopiemethode konnten 1995 zum ersten Mal einzelne, fluoreszent markierte Biomoleküle bei Raumtemperatur in wässriger Lösung detektiert werden [116]. Die TIRF-Mikroskopie wurde seitdem für eine Vielzahl verschiedenster Einzelmolekül-Untersuchungen bei *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten eingesetzt (zur Übersicht: [117]).

3.3.1. Die interne Totalreflexion

TIRFM basiert auf der Entstehung eines evaneszenten Feldes bei der internen Totalreflexion des Anregungslichts. Tritt ein Lichtstrahl in einem kleinen Einfallswinkel θ_i zum Lot aus einem Medium mit höherem Brechungsindex n_i in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex n_t ein, so wird ein Teil des Strahls im Winkel θ_t vom Einfallslot weggebrochen (Abb. 3.10A). Der andere Teilstrahl wird im Winkel θ_r reflektiert, wobei aus den Stetigkeitsbedingungen für Wellen an Grenzflächen $\theta_i = \theta_r$ gelten muss [118].

Die Beugung des transmittierten Teilstrahls kann mit dem Snelliusschen Gesetz

beschrieben werden:

$$\sin \theta_i \cdot n_i = \sin \theta_t \cdot n_t \quad (3.27)$$

Wird θ_i so groß, dass das transmittierte Licht im rechten Winkel zum Einfallslot gebeugt wird, folgt aus dem Snelliusschen Gesetz

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_t}{n_i} , \quad (3.28)$$

wobei θ_c als kritischer Winkel bezeichnet wird. In diesem Fall breitet sich das Licht entlang der Phasengrenze n_i/n_t aus (Abb. 3.10B). θ_c ist dabei umso kleiner, umso größer der Unterschied der Brechungsindices beider Medien ist. Für einen Übergang von sichtbarem Licht an einer Quarz/Wasser-Grenzfläche ($n_i = 1,46$ und $n_t = 1,33$) ergibt sich θ_c zu $65,6^\circ$.

Ist der Einfallswinkel größer als θ_c so wird der Lichtstrahl im Medium mit dem höheren Brechungsindex intern total reflektiert (Abb. 3.10C). Ein sehr kleiner Anteil der Lichtenergie bewegt sich jedoch entlang der Grenzfläche als abklingende Welle (*evanescent wave*) in der Einfallsebene. Diese Welle ist ein evaneszentes, elektromagnetisches Feld, das die gleiche Frequenz wie das total reflektierte Licht aufweist. Das Feld wird durch Beugungseffekte hervorgerufen, die aufgrund des endlichen Strahlquerschnitts vom einfallenden Licht und der damit verbundenen Abweichung von einer perfekt ebenen Welle entstehen [118].

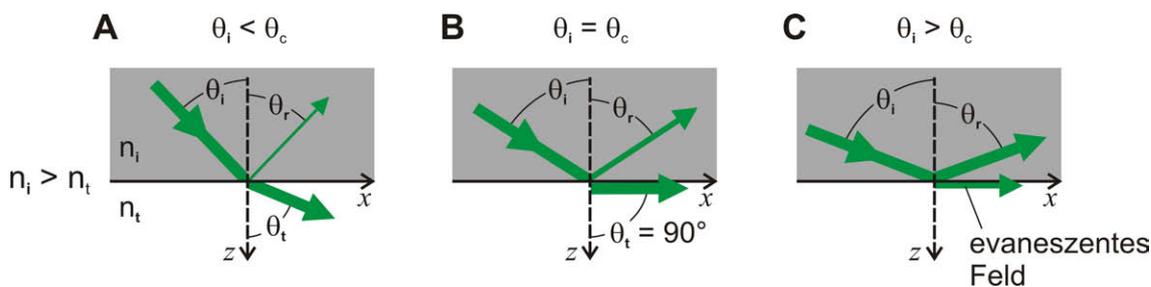


Abbildung 3.10.: Die Abhängigkeit des Reflexionsverhaltens vom Einfallswinkel nach dem Snelliusschen Gesetz.

Durch Lösen der Maxwell'schen Gleichungen kann gezeigt werden, dass die Intensität der evaneszenten Welle exponentiell mit der Eindringungstiefe in z-Richtung abfällt [119]:

$$I(z) = I_0 e^{-z/d_p} , \quad (3.29)$$

3. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

wobei d_p die Penetrationstiefe darstellt, bei der die Anfangsintensität I_0 auf $1/e$ gefallen ist (Abb. 3.11):

$$d_p = \frac{\lambda_i}{4\pi} (n_i^2 \sin^2 \theta_i - n_t^2)^{-\frac{1}{2}} \quad (3.30)$$

Die Penetrationstiefe des evaneszenten Feldes ist demnach abhängig von der Wellenlänge und dem Winkel des einfallenden Lichtes sowie den Brechungsindices der unterschiedlichen Medien.

Mit sichtbarem Licht an einer Quarz/Wasser-Grenzfläche kann d_p , je nach Einfallswinkel, 100 bis 200 nm betragen. Das bedeutet, dass bei einer mikroskopischen Methode, die das evaneszente Feld einer internen Totalreflexion zur Fluoreszenzanregung nutzt, nur die Fluorophore angeregt werden können, die sich direkt an der Grenzfläche oder in unmittelbare Nähe dazu befinden. Die axiale Auflösung der TIRF-Mikroskopie ist damit höher als bei der konfokalen Mikroskopie [120], die bei Einphotonenanregung eine typische z -Ausdehnung des Anregungsvolumen von ca. 800 nm aufweist. Aufgrund des geringen Anregungsvolumens bei TIRFM ist das Hintergrundsignal von Fluorophoren, die außerhalb der Detektionsebene angeregt werden, minimal. Das sich daraus ergebende hohe Signal/Hintergrund-Verhältnis für TIRFM erlaubt ultra-sensitive Einzelmolekül-Messungen, mit denen z. B. auch geringe Änderungen im spFRET-Signal bei einer zeitlichen Auflösung von wenigen Millisekunden detektierbar sind [121].

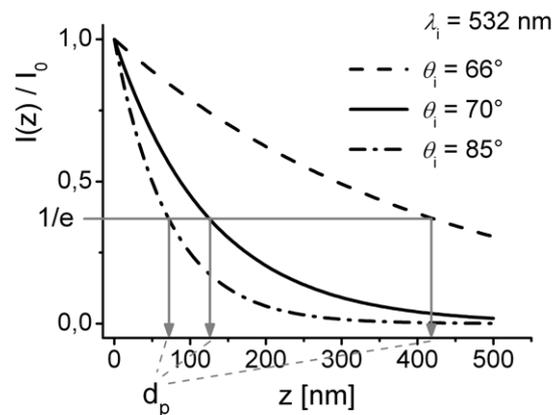


Abbildung 3.11.: Die Eindringtiefe d_p des evaneszenten Feldes in Abhängigkeit des Einfallswinkels θ_i vom total reflektierten Licht mit einer Wellenlänge von 532 nm an einer Quarz- ($n = 1,46$)/Wasser($n = 1,33$)-Grenzfläche nach Gleichung 3.29.

Die Abhängigkeit der Penetrationstiefe vom Einfallswinkel (Abb. 3.11) kann bei TIRFM zur Untersuchung der z-Dimension genutzt werden, indem der Einfallswinkel θ_i während einer Messung apparativ variiert wird (*variable incident angle* TIRFM, VIA-TIRFM) [122]. Bei einer anderen Methode wird mit Hilfe der Gleichung 3.29 die z-Position eines TIRF-angeregten Fluorophors über die kalibrierte Fluoreszenzintensität bestimmt [123].

Die Abhängigkeit der Penetrationstiefe von den Brechungsindices der verschiedenen Medien kann wiederum ausgenutzt werden, um d_p zu verkleinern und so eine noch höhere z-Auflösung ($d_p \approx 30$ nm) zu erhalten. Hierzu können statt Quarz Medien aus LiNbO_3 oder Al_2O_3 verwendet werden, die für eine bessere Kompatibilität zur biochemischen Probe jedoch häufig mit einer Nanometer-dünnen Schicht aus SiO_2 versehen sein müssen [124].

Die Intensität der evaneszenten Welle ist außerdem polarisationsabhängig. Das senkrecht zur Einfallsebene polarisierte Licht (s-Polarisation) weist eine geringere Intensität des abklingenden Feldes auf als das parallel polarisierte Licht (p-Polarisation). Die Stärke der verschiedenen polarisierten Intensitäten ergeben sich wiederum aus den Brechungsindices n_i und n_t sowie dem Einfallswinkel θ_i [119]. Die Tatsache, dass die Polarisation des Anregungslichts auch ein polarisiertes evaneszente Feld erzeugt, kann für Polarisations-TIRFM-Untersuchungen genutzt werden [125, 126]. Bei Einzelmolekül-Untersuchungen sind Polarisationsmessungen allerdings nur durchführbar, wenn die Fluorophore eine hohe Anisotropie aufweisen, d. h. wenn sie nicht frei rotieren können (vgl. Abschnitt 3.1.2). Eine schnelle Molekülrotation im angeregten Zustand führt zur Depolarisierung der Emission. Zusätzlich würde der photoselektive Effekt einer polarisierten Anregung im evaneszenten Feld durch die Mittelung während der (im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer viel längeren) Detektionszeit bei Einzelmolekül-Experimenten verloren gehen.

3.3.2. Prisma- und Objektiv-TIRFM

Die theoretische Beschreibung sowie die Entwicklung und Anwendung von TIRFM wurde in den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts v. a. durch die Arbeit von Daniel Axelrod und seinen Kollegen begründet (Übersichtsartikel: [5, 127, 128]). Bei der apparativen Umsetzung der TIRF-Mikroskopie für biologische Probensysteme wurden mit Prisma-TIRFM und Objektiv-TIRFM zwei Methoden entwickelt, die

sich im Ort der Fluoreszenzanregung unterscheiden und dadurch unterschiedliche Vorteile bieten [129].

Prisma-TIRFM basiert auf der internen Totalreflexion an der Grenzfläche eines Quarzprismas zur wässrigen Probenlösung (Abb. 3.12 links). Das Anregungslicht wird bei dieser Methode in einem Winkel θ_i auf die Unterseite des Prismas fokussiert werden, der deutlich größer ist als der kritische Winkel θ_c . Die Totalreflexion ist damit relativ einfach zu realisieren und die Eindringtiefe des entstehenden evaneszenten Feldes kann durch die Änderung von θ_i variiert werden (VIA-TIRFM). Um das evaneszente Feld an der Prismaunterseite zur Anregung in der Fluoreszenzmikroskopie nutzen zu können, muss das Prisma in unmittelbarer Nähe zum Objektiv platziert werden, mit dem die Fluoreszenz eingefangen wird. Prisma-TIRFM wird deshalb in der Sandwich-Konfiguration Prisma-Probe-Deckglas durchgeführt. Die fluoreszierende Probe befindet sich dabei direkt auf oder weniger als 100 nm entfernt von der Quarz/Probenlösung-Grenzfläche.

Häufig wird diese Sandwich-Anordnung als Flusskammer umgesetzt, bei der die Probe erst nach erfolgter Kammerpräparation eingebracht werden muss. Hierzu ist das Sandwich meistens aus zwei Deckgläsern aufgebaut. Abstandhalter zwischen den Deckgläsern sollten dabei eine Kammerinnenhöhe von ca. 100 μm nicht überschreiten, um Wasserimmersions-Objektive für die Detektion nutzen zu können. Das Prisma wird mit Glycerin auf die Flusskammer gesetzt, sodass die interne Totalreflexion erst an der Phasengrenze Deckglasunterseite/Probenlösung geschieht [130, 131]. Um eine Erhöhung des Hintergrundsignals durch fluoreszierende Verunreinigungen im Glycerin oder dem angrenzenden Deckglas zu vermeiden, ist es jedoch vorteilhafter, auf diese Komponenten zu verzichten und mit einer TIRFM-Flusszelle zu arbeiten, bei der das Prisma selber ein direkter Teil der Probenkammer ist (vgl. Abschnitt 4.2.7). Damit Fluorophore oder entsprechend markierte Biomoleküle für einen längeren Zeitraum (abhängig von der Bleichrate des Farbstoffs) in Lösung beobachtet werden können, ist es notwendig, die Probenmoleküle an der Prismaunterseite biochemisch zu fixieren.

Aufgrund des hohen Einfallswinkels, der durch den Einsatz des Prismas möglich wird, kann bei Prisma-TIRFM eine hohe axiale Auflösung durch eine sehr geringe Eindringtiefe des evaneszenten Feldes erreicht werden. Diese TIRFM-Methode weist damit eines der höchsten Signal/Hintergrund-Verhältnisse auf, die von der Einzel-

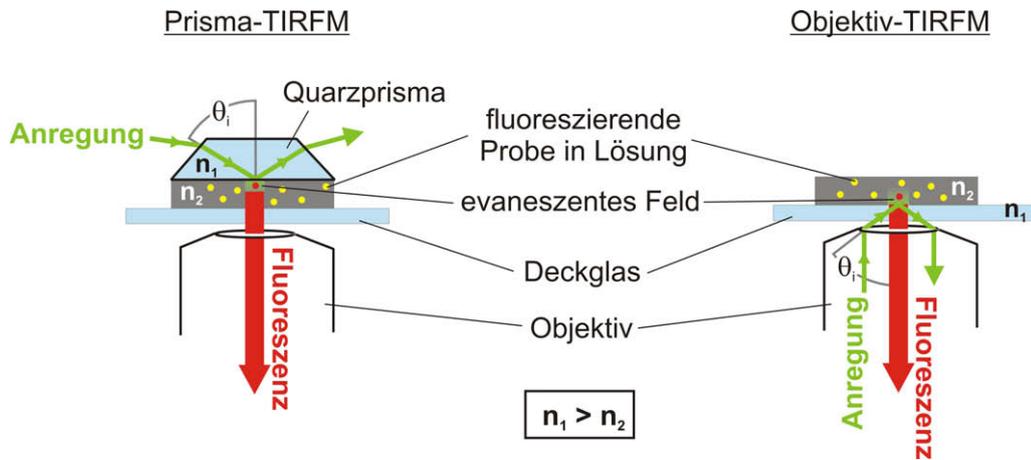


Abbildung 3.12.: Schema zur experimentellen Umsetzung von Prisma- und Objektiv-TIRFM.

molekül-Fluoreszenzmikroskopie bei Raumtemperatur erreicht werden kann. Allerdings kann dieser Vorteil nur genutzt werden, wenn die zu detektierenden Fluorophore hell genug leuchten (hoher Extinktionskoeffizient und hohe Quantenausbeute der Fluorophore). Im Gegensatz zu Objektiv-TIRFM kann bei Prisma-TIRFM für die Untersuchung von Proben in wässriger Lösung kein Ölimmersions-Objektiv mit besonders hoher numerischer Apertur (NA) eingesetzt werden. Der Umstand, dass die Probenanregung bezüglich der Objektivposition an der gegenüberliegenden Flusskammeroberfläche geschieht, setzt zur optimalen Detektion von Proben in wässriger Lösung den Einsatz eines Wasserimmersions-Objektivs voraus. Die numerische Apertur von Wasserimmersions-Objektiven ist jedoch auf 1,2 begrenzt. Durch den kleineren Öffnungswinkel des Wasserimmersions-Objektivs können deshalb mit Prisma-TIRFM nicht so viele Photonen wie mit Objektiv-TIRFM detektiert werden [129].

Bei der Objektiv-TIRFM-Methode wird das evaneszente Anregungsfeld an der Grenzfläche erzeugt, die direkt über dem Objektiv liegt. Hierzu wird der Fokus des Anregungsstrahls in der rückwärtigen Brennebene des Objektivs einer herkömmlichen Epi-Fluoreszenz-Apparatur soweit parallel zur optischen Achse des Mikroskops verschoben bis θ_i groß genug ist, um eine interne Totalreflektion an der Oberseite des benachbarten Deckglases zu erzeugen (Abb. 3.12 rechts). Das reflektierte Licht wird dann vom Objektiv wieder eingefangen und durch das Mikroskop zurückgeführt (zur Justage vgl. Abschnitt 4.3). Um die Voraussetzung $\theta_i > \theta_c$

zu erfüllen, werden allerdings Objektive mit einer hohen numerischen Apertur ($NA = 1,4$ oder höher) und großer Rückapertur benötigt.

Der offensichtlichste Vorteil von Objektiv-TIRFM ist die Tatsache, dass ohne die Notwendigkeit eines Prismas die obere Seite der Probenkammer offen bleiben kann. Die Probe ist damit, wie bei der herkömmlichen Epi-Fluoreszenzmikroskopie, zugänglich für unterschiedlichste Arten der Manipulation während der mikroskopischen Untersuchung. In Verbindung mit den seit wenigen Jahren verfügbaren Ölimmersions-Objektiven, die eine NA von bis zu 1,65 haben (vom Hersteller häufig als „TIRF-Objektive“ bezeichnet), kommt Objektiv-TIRFM vor allem in der Einzelmolekül-Mikroskopie an lebenden Zellen zum Einsatz [128, 132, 133]. Hierbei können Prozesse in der Zellmembran oder in deren unmittelbaren Nähe untersucht werden: z. B. zelluläre Signalprozesse, aktiver Transport auf Actin-Filamenten oder Vorgänge bei der Endo- oder Exozytose [134, 135]. Zur Verdeutlichung der besseren Auflösung mittels TIRF-Anregung bei *in vivo*-Experimenten wird in Kapitel 4 ein direkter Vergleich mit der üblichen Epi-Fluoreszenz-Weitfeldanregung an lebenden Zellen gezeigt.

Die Fluoreszenzemission wird bei Objektiv-TIRFM nicht durch die Probenlösung hindurch, sondern direkt von der benachbarten Deckglas/Lösung-Grenzfläche detektiert. Die eingesetzten Objektive mit extrem hoher NA führen im Vergleich zu Prisma-TIRFM zu deutlich höheren Detektionsausbeuten der emittierten Photonen [129]. Bei Objektiv-TIRFM können jedoch selbst durch den Einsatz von Objektiven mit höchster NA keine Einfallswinkel θ_i erreicht werden, die zu einer so hohen z-Auflösung wie bei Prisma-TIRFM führen würden. Außerdem wurde bei den TIRF-Objektiven eine relativ starke Streustrahlung beim Wiedereintritt des reflektierten Anregungsstrahls ins Objektiv festgestellt (eigene Beobachtung). Somit kann mit Objektiv-TIRFM aufgrund der hohen NA zwar mehr Fluoreszenz detektiert werden, aber das Signal/Hintergrund-Verhältnis ist im Vergleich zu Prisma-TIRFM schlechter. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von TIRF-Objektiven ist die starke chromatische Aberration im Vergleich zu neuwertigen Wasserimmersions-Objektiven (eigene Beobachtung). Eine aberrationsfreie, simultane Detektion von zwei spektral verschiedenen Kanälen, wie sie für FRET-Experimente notwendig sind, ist deshalb mit Objektiven, deren NA bei 1,45 oder höher liegt, bis dato nicht durchführbar. Außerdem ist zu beachten, dass analog zu Prisma-TIRFM, wo das Prisma aus

hochreinem, synthetischem Quarz sein muss, bei Objektiv-TIRFM das Deckglas aus Fluorophor-freien Quarzmaterial bestehen muss, um eine Erhöhung des Hintergrundsignals zu vermeiden.

Beide TIRFM-Anregungsverfahren über das evaneszente Feld können mit der Weitfeld-Detektion durch hochsensitive CCD-Kameras kombiniert werden, die auch bei größeren zu untersuchenden Probenflächen eine hohe zeitliche Auflösungen erreichen (wenige Millisekunden). Auf diese Weise können simultan bis zu mehrere hundert Moleküle untersucht werden, wodurch Statistiken zur Beschreibung der Probenheterogenität oder des synchronisierten Verhaltens auf schnelle Parameteränderungen während eines Experimentes erstellt werden können.

Die Untersuchung einzelner Fluorophore mit herkömmlicher Epi-Fluoreszenz-Anregung ist durchaus möglich [136], doch verhindert das viel höhere Hintergrundsignal durch angeregte Fluorophore außerhalb des Detektionsfokus unter Umständen eine Analyse von subtilen Intensitätsänderungen, wie sie bei spFRET-Zeitspuren vorkommen können [121]. Bei der Einzelmolekül-Detektion durch rastermikroskopische Methoden wie z. B. der Konfokalmikroskopie oder der *Scanning Near-Field Optical Microscopy* (SNOM) wiederum wird zwar ein hohes Signal/Hintergrund-Verhältnis durch ein kleines Anregungsvolumen erreicht; eine gleichzeitige Detektion von mehreren Molekülen mit einer zeitlichen Auflösung von wenigen Millisekunden ist jedoch nicht möglich.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass TIRFM die Fluoreszenz-Mikroskopiemethode der Wahl darstellt, um einzelne Moleküle bei physiologisch relevanten Temperaturen an der Probenraum-Grenzfläche zu untersuchen. Dabei findet Objektiv-TIRFM hauptsächlich bei Einzelmolekül-Experimenten an lebenden Zellen Anwendung, da zur Probenkultivierung und -manipulation während einer Messung häufig eine offene Probenkammer notwendig ist. Prisma-TIRFM hingegen führt zu einem noch höheren Signal/Hintergrund-Verhältnis und ist somit für die geplanten *in vitro*-Experimente dieser vorliegenden Doktorarbeit besonders geeignet, da für die Untersuchung der Dynamik von individuellen TBP-DNA-NC2-Komplexen auch geringe Intensitätsunterschiede der Fluoreszenzsignale erkannt werden müssen.

3. Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

4. Experimenteller Aufbau des TIRF-Mikroskops

Um die im letzten Abschnitt erklärten Vorteile der verschiedenen TIRFM-Methoden für hoch empfindliche Einzelmolekül-Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* nutzen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Fluoreszenzmikroskopiesystem entwickelt, das die Anwendung von Prisma-TIRFM und Objektiv-TIRFM am selben Mikroskopstativ ermöglicht. Neben beiden Methoden der TIRF-Mikroskopie kann mit diesem System zusätzlich Epi-Fluoreszenz-Weitfeldmikroskopie sowie Durchlichtmikroskopie mit differentieller Interferenzkontrast (*differential interference contrast*, DIC) durchgeführt werden. In Kombination mit einer ultra-sensitiven, bildgebenden Zweifarben-CCD-Detektion ist die entwickelte Apparatur somit für verschiedenste biophysikalische Messungen geeignet, die höchste Empfindlichkeit erfordern.

Im Folgenden werden die jeweiligen Teilaufbauten der verschiedenen Mikroskopiemethoden dieses umfassenden Systems sowie spezielle Erweiterungen vorgestellt.

4.1. Der Aufbau im Überblick

Die Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Aufbau der TIRFM- und Weitfeld-Apparatur. Das optional verwendbare Inkubationssystem sowie die DIC-Beleuchtung sind dabei aus Gründen der besseren Übersicht nicht eingezeichnet worden.

Das System basiert auf einem inversen Fluoreszenzmikroskop (TE 2000-U, Nikon). Für Prisma- und Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Beleuchtung werden die selben Laserlichtquellen (532 und 633 nm) genutzt. Die Anregung kann mit einem programmierbaren Shutter-System gesteuert werden. Durch einen Klappspiegel (kinematischer Halter, Thorlabs) kann zwischen Prisma- und Objektiv-TIRFM/Weitfeld-

4. Experimenteller Aufbau des TIRF-Mikroskops

Beleuchtung umgeschaltet werden. Der Prisma-TIRFM-Aufbau wurde durch ein automatisch gesteuertes Mikro-Flusssystem erweitert, womit ein Austausch der Probenlösung während der Messung möglich ist. Bei der Fluoreszenzdetektion mit einer EMCCD-Kamera können aufgrund des dualen Farbkanalaufbaus die Emissionen zweier verschiedener Fluorophore (z. B. FRET-Paar) simultan und räumlich getrennt voneinander aufgenommen werden.

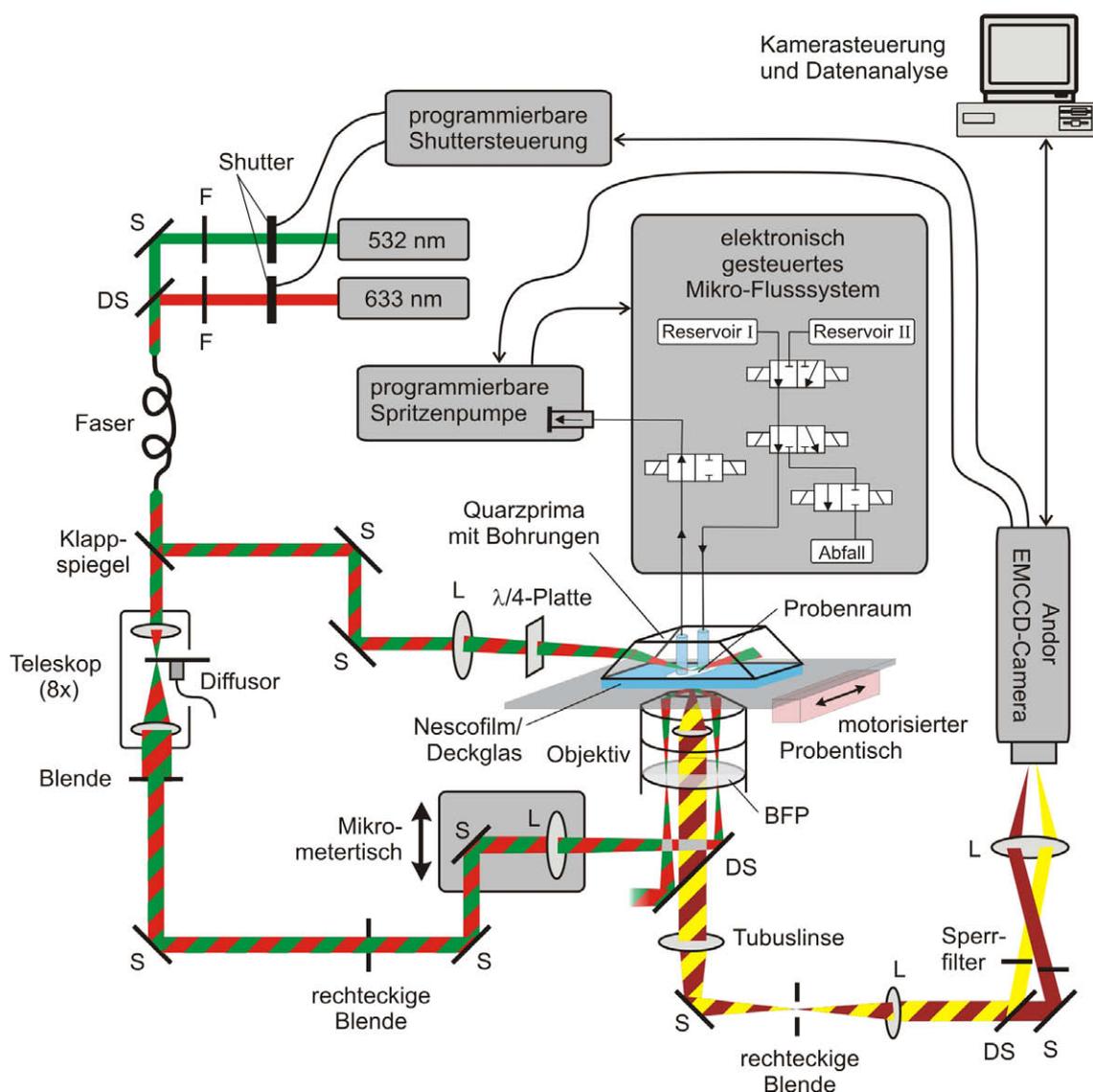


Abbildung 4.1.: Schematischer Überblick des Aufbaus zur Prisma- bzw. Objektiv-TIRF/Weitfeld-Mikroskopie mit folgenden Abkürzungen: Spiegel (S), dichroitischer Spiegel (DS), Linse (L), Filterrad (F).

4.2. Prisma-TIRFM

4.2.1. Fluoreszenzanregung

Als *continuous wave*-Anregungsquelle für die TIRF-Mikroskopie dient ein Nd:YVO₄-Feststofflaser, der eine Wellenlänge von 532 nm mit maximal 110 mW emittiert (GCL-100-L, CrystaLaser) und ein HeNe-Gaslaser, der 633 nm mit maximal 13 mW emittiert (Laser 2000). Die Laserlinien werden mit einem dichroitischen Spiegel (z590DCSP, AHF) kombiniert, bevor sie durch eine polarisationserhaltene Einzelmode-Faser (optimiert für 532/647 nm, OZ Optics) an das Mikroskop geführt werden. Neben der Möglichkeit der vereinfachten Positionierung des Anregungslichts auf einem bereits dicht bebauten Lasertisch, liegen die verschiedenen Laserlinien durch die Lichtleitung beim Faseraustritt auf der selben optischen Achse, wodurch eine genaue Justage und die Qualität der Zweifarbenanregung verbessert wird. Die Faser dient außerdem zur Bereinigung des Stahlprofils sowie zur Behebung der auftretenden Strahldivergenz bei den eingesetzten Lasern. Über mehrere Spiegel wird der Anregungsstrahl nach dem Faserausgang auf dem selbst entworfenen Mikroskoptisch geführt (Abb. 4.2) und dort mit einer achromatischen Linse ($f = 200$ mm) durch eine $\lambda/4$ -Platte auf die Unterseite des Quarzprismas fokussiert, wo es zur internen Totalreflexion kommt. Mit der $\lambda/4$ -Platte wird das linear polarisierte Laserlicht in zirkular polarisiertes Licht umgewandelt, sodass eventuell auftretende Artefakte, die auf einer linearen Anregungspolarisation basieren, vermieden werden. Für die durchgeführten Prisma-TIRFM-Messungen (Kapitel 6) wurde im Prisma ein Einfallswinkel θ_i von ca. 72° eingestellt, was in wässriger Probenlösung nach Gleichung 3.30 zu einer Penetrationstiefe d_p des evaneszenten Feldes von ca. 106 nm für die grüne Anregung und 126 nm für die rote Anregung führt.

Die verwendeten Laserlinien können durch Shutter (LS6Z, Uniblitz, Bajonett-Verschlussystem, 6 mm Apertur) und Grau-Filterräder (NDC-50C-2M, Thorlabs) individuell zu- oder abgeschaltet und in ihrer Intensität stufenlos reguliert werden. Zur Kontrolle der Shutter wurde im Rahmen dieser Arbeit eine umfangreich programmierbare Steuerung entwickelt, welche es erlaubt, die verschiedenen Anregungslinien in frei wählbaren Sequenzen wechseln zu lassen. Diese Sequenzen werden direkt durch Trigger-Pulse der CCD-Kamera gesteuert, sodass sie stets synchron mit der Detektion verlaufen. In einer programmierten Sequenz beträgt die Zeit, die

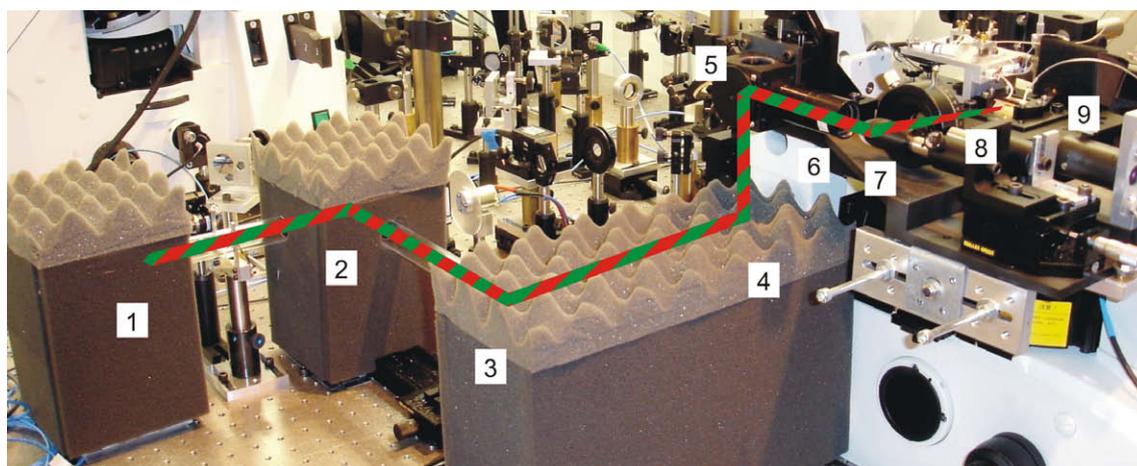


Abbildung 4.2.: Anregungsstrahlengang zu Prisma-TIRFM nach dem Faseraustritt: (1) Faseraustritt; (2) Klappspiegel; (3 - 5) Spiegel; (6) achromatische Linse; (7) Spiegel; (8) $\lambda/4$ -Platte; (9) Flusskammer mit Prisma. Um Schwankungen im Anregungslicht erfolgreich aufzuheben, wurden über die optischen Elemente eine möglichst weite Strecke mit schaumstoffgedämpften Kästen verpackt. Der Weg zwischen den Kästen wurde mit Plexiglasröhren abgedeckt (vgl. Abschnitt 4.2.2).

die Shutter zur kompletten Schließung einer Laserlinie brauchen, 6 ms. Die höchste Frequenz, mit der eine alternierende Sequenz zwischen beiden Shuttern zuverlässig ablaufen kann, beträgt 25 Hz. Bei schnelleren Sequenzen kommt es zu mechanisch bedingten Aussätzern der Shutter. Die kürzeste Probenanregungszeit mit einer programmierten Sequenz, die äquitemporal zwischen roter und grüner Anregung wechselt, beträgt daher 40 ms pro Trigger-Puls. Jedem Shutter kann eine individuelle Vorlaufzeit, Offen-Zeit und Nachlaufzeit zugewiesen werden. Mit dem weiten Zeitbereich, der von einer Millisekunde bis zu 10.000 Minuten für jede Einstellung frei wählbar ist, ist diese Steuerung sowohl für Messung mit höchster Zeitauflösung als auch für Messungen entwickelt worden, die extrem lange Belichtungs- oder Dunkelzeiten erfordern.

4.2.2. Optimierung des Anregungsstrahlengangs

Im Laufe der Entwicklung des experimentellen Aufbaus wurden mehrere Probleme erkannt und behoben, die zu einer unruhigen Laseranregung führten. Zum einen musste der interne Lüfter des älteren HeNe-Gaslaser von seinem Gehäuse entkoppelt werden, um die Übertragung der Lüfterschwingung auf das Gehäuse des Lasers zu vermeiden. So wurde eine störungsfreie Emission des Lasers erreicht. Des Wei-

teren wurde der Anregungsstrahlengang über weite Strecken abgeschirmt, um den Einfluss von thermischen Schwankungen in der Luft zu vermeiden. Besonders der HeNe-Gaslaser wärmte sich innerhalb einer halben Stunde merklich auf. Da sich die gesamte Apparatur jedoch unter einer laminaren Strömung gefilterter Luft befindet, die ein Verstauben des Aufbaus verhindern soll, wird die wärmere Luft verwirbelt und führt im Strahlengang zu turbulenten Änderungen des Brechungsindex der Luft. Die resultierenden Ablenkungen der beiden Laserlinien vor der Faser waren als starke Intensitätsschwankungen ($> 30\%$) hinter dem Lichtleiter deutlich zu erkennen, da bereits kleinste Abweichungen bei der Strahleinkopplung in die polarisationserhaltenden Einzelmode-Faser zu hohen Einbrüchen im Faserdurchsatz führen. Quantitative Fluoreszenzmessungen sind mit dieser unruhigen Anregung nicht durchführbar gewesen. Um die thermischen Schwankungen im Anregungsstrahlengang zu verhindern, wurde dieser bis zur Fasereinkopplung komplett mit Schaumstoff-gedämpften Karton- und Aluminiumhüllen sowie Plexiglasröhren verkleidet (ähnlich wie der Strahlengang hinter dem Faserausgang in Abb. 4.2).

Hinter der Faser wurden weitere Schwankungen im Strahlengang festgestellt. Die Beobachtung des TIRF-Anregungsfokus an der Prismaunterseite mit einem $10\times$ -Luftobjektiv zeigte eine turbulente xy-Auslenkung der ausgeleuchteten Fläche von teilweise bis zu $\sim 100\ \mu\text{m}$. Hier wurde ein größerer Hauptshutter (VS14Z, UniblitZ, 14 mm Apertur) als thermische Quelle erkannt. Dieser Shutter, der direkt hinter der Faser als gemeinsame Kontrolle beider Laserlinien dienen sollte, erwärmte sich nach länger anliegender Haltespannung und wurde deshalb aus dem Aufbau entfernt. Außerdem wurde der Anregungsstrahlengang auch nach der Faser für Prisma-TIRFM über weite Strecken verkleidet, um eine möglichst störungsfreie Anregung zu garantieren (Abb. 4.2). Auf diese Weise konnte der TIRF-Anregungsfokus ruhig gestellt werden. Mit Hilfe all dieser Maßnahmen zur Verbesserung der Anregungsqualität konnten die Schwankungen in der Laserintensität erfolgreich unterdrückt werden. Die Intensitätsschwankungen direkt vor dem Eintritt ins Prisma liegen für beide Laserlinien bei weniger als ein Prozent.

Bei der Prisma-TIRFM-Beleuchtung ist der entstehende Anregungsfokus aufgrund des schrägen Einfallswinkels oval verzerrt. Der Versuch, diese Verzerrung durch eine elliptische Strahlaufweitung ($4\times$) zu vermeiden, hat jedoch nicht funktioniert. Der Fokus wurde durch den Einsatz eines elliptischen Teleskops zwar kreisrund, aber die

ausgeleuchtete Fläche war für eine Weitfeld-Detektion zu klein. Eine Defokussierung mit der elliptischen Strahlaufweitung führte wiederum zu einer viel stärkeren Verzerrung als ohne den Einsatz des Teleskops. Aus diesem Grund wurde im endgültigen Aufbau auf die elliptische Anpassung verzichtet.

4.2.3. Probenraum

Als Probenraum bei den hier durchgeführten Prisma-TIRFM-Experimenten dienten Flusskammern, die in einer Sandwich-Bauweise aus Quarzprisma (Suprasil 2, $30 \times 24 \times 7 \text{ mm}^3$), Nescofilm und Deckglas zusammengesetzt wurden. In die verwendeten Prismen wurden zwei Löcher ($ID = 1,6 \text{ mm}$) gebohrt, sodass ein Flüssigkeitswechsel im Probenraum während der Messung möglich ist. In der Mitte des Nescofilms, der als Abstandshalter diente, befand sich eine Aussparung von $20 \times 3 \text{ mm}^2$, welche die Grenzen des Probenraumes definierte (Abb. 4.3). Nach Zusammenkleben von Prisma, Nescofilm und Deckglas durch Erhitzen auf 150°C wies der Probenraum eine Höhe von $\sim 100 \mu\text{m}$ auf. Eine detaillierte Beschreibung des Zusammenbaus der Flusskammern sowie der Reinigung und Wiederverwertung der Prismen ist in Anhang A zu finden.

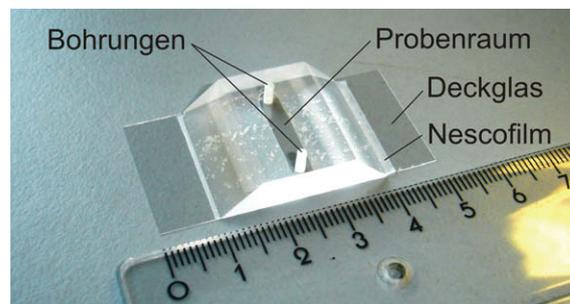


Abbildung 4.3.: Fotografie und schematischer Querschnitt einer Flusskammer, wie sie für Prisma-TIRFM-Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Der Probenraum ($20 \times 3 \times 0,1 \text{ mm}^3$) entstand durch eine Aussparung im Nescofilm, der als Abstandshalter zwischen Deckglas und Prisma diente. Die Probe wurde direkt auf dem Prisma fixiert.

Die anzuregende Probe wurde in der Kammer direkt auf der Unterseite des Quarzprismas fixiert (vgl. Abb. 6.3). Gegenüber Flusskammern, bei denen das Prisma mit Glycerin auf eine räumlich abgetrennte Kammer aus Deckglas-Abstandshalter-Deckglas aufgebracht ist, wurde mit den direkten Messungen an der Prismaunterseite

eine Erhöhung des Hintergrundsignals aufgrund eventueller Verunreinigungen der zusätzlichen Komponenten (oberes Deckglas und Glycerin) vermieden. Zur Immobilisierung der in dieser Arbeit untersuchten biologischen Probe musste die Prismaunterseite jedoch besonders modifiziert werden, sodass die biologische Aktivität der Probe erhalten blieb. Die Maßnahmen zu dieser Oberflächenmodifizierung werden ausführlich in Abschnitt 6.1.2 behandelt.

4.2.4. Fluoreszenzdetektion

Das emittierte Licht der fluoreszierenden Probe wird mit einem $60\times$ Wasserimmersions-Objektiv (CFI Planapochromat VC, Nikon, NA 1,2) eingesammelt. Der Arbeitsabstand des Objektivs von $270\ \mu\text{m}$ und die Deckglasdicke von $\sim 160\ \mu\text{m}$ schränkt die maximale Höhe des Probenraums auf $110\ \mu\text{m}$ ein. Das vom Objektiv eingefangene Licht wird im unendlich-korrigierten Strahlengang des Mikroskops durch die Tubuslinse ($f = 200\ \text{mm}$) in einer Bildebene außerhalb des Mikroskops projiziert, wo eine rechteckige Feldblende platziert wurde (Abb. 4.4). Zur chromatischen Trennung von spektral unterschiedlichen Fluorophoremmissionen wird das Bild durch eine weitere Linse (Achromat, $f = 100\ \text{mm}$) ins Unendliche fokussiert. Im kollimierten Detektionsstrahlengang wird von einem dichroitischen Spiegel nur der kürzerwellige Emissionsanteil reflektiert (vgl. Abb. 4.5). Die transmittierte, längerwellige Emission wird von einem Silberspiegel (F21-005, AHF) abgelenkt. Beide Teilemissionen passieren Bandpassfilter, die als Sperrfilter gegen Streulicht der Laseranregung dienen (Abb. 4.5), bevor die parallelen Strahlen von der letzten Linse im Strahlengang (Achromat, $f = 200\ \text{mm}$) auf eine Elektronen-multiplizierende CCD-Kamera (EMCCD) fokussiert werden. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Filter werden in Abschnitt 4.2.5 vorgestellt. Die Kombination der beiden externen Linsen im Detektionssystem ergeben eine Nachvergrößerung um den Faktor 2. Zusammen mit dem $60\times$ Wasserimmersions-Objektiv wird mit der Detektion eine 120-fache Gesamtvergrößerung erreicht.

Die farblich getrennten Teilemissionen werden nebeneinander auf dem CCD-Chip projiziert, sodass eine zeitgleiche Detektion beider Farbkanäle stattfindet. Hierzu wird das Detektionssignal in der ersten Bildebene (nach der Tubuslinse) mit der rechteckigen Feldblende in Höhe und Breite so beschnitten, dass die zwei durch die anschließende Farbtrennung entstehenden Bilder auf dem CCD-Chip nebeneinander

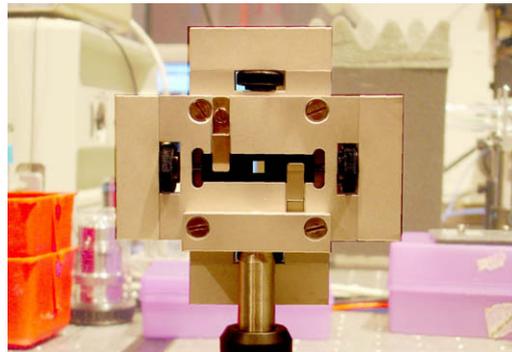


Abbildung 4.4.: Fotografie der speziell entwickelten Blende zur räumlich getrennten Mehrfarben-Detektion mit einer CCD-Kamera (im ausgebauten Zustand). Mit dieser rechteckigen Blende kann das Signal in der ersten Bildebene nach dem Mikroskopausgang in Höhe und Breite beschnitten werden, um anschließend die spektral unterschiedlichen Komponenten des Bildes nebeneinander auf dem CCD-Chip abzubilden. Die Kanten der Blende liegen dabei alle in der selben optischen Ebene.

abgebildet werden können. Bei der Entwicklung dieser speziellen Blende im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf geachtet, dass die beschneidenden Kanten der vier individuell mit Feingewinde positionierbaren Blendenschieber alle in der selben Ebene liegen. Auf diese Weise können die Ränder des beschnittenen Signals ebenfalls scharf auf der CCD-Kamera abgebildet werden (Abb. 4.4).

4.2.5. Einbau des Filtersatzes und Anwendung der Deckglaskorrektur

Die verwendeten Filter im Anregungs- und Detektionsaufbau können je nach Anregungswellenlänge und Fluoreszenzemission des Experiments ausgetauscht werden. Zur Detektion zeigt Abbildung 4.5 das Transmissionsspektrum des verwendeten dichroitischen Spiegels (630DCXR, AHF) (blau) sowie der beiden Bandpassfilter (HQ585/80 bzw. HQ715/150, AHF) (grün bzw. rot) für das in dieser Arbeit am häufigsten verwendete FRET-Farbstoffpaar Atto532/Atto647 (Emissionsspektren in magenta bzw. violett gestrichpunktet eingezeichnet). Die verwendeten Wellenlängen 532 bzw. 633 nm (grün bzw. rot gestrichelt) der Donor- bzw. Akzeptoranregung sind in der Abbildung ebenfalls enthalten. Der Dualbandfilter (z532/633rpc, AHF) (schwarz) wird für diese Anregungslinien zur Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Beleuchtung im Filterrevolver des Mikroskops eingebaut.

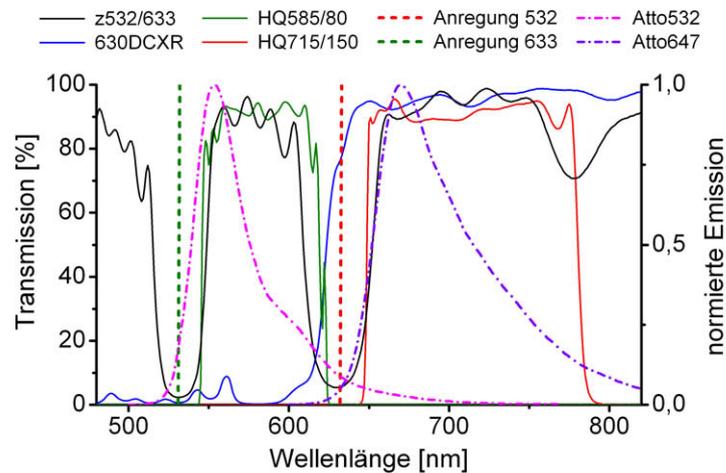


Abbildung 4.5.: Spektrale Übersicht des Filtersatzes zur Detektion von Atto532 bzw. Atto647 (oder Farbstoffen mit ähnlichem Emissionsspektrum): Dichroitischer Spiegel 630DCXR (blau) zur Farbtrennung, Bandpassfilter HQ585/80 (grün) und HQ715/150 (rot), Dualbandfilter z532/633rpc (schwarz) für Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Beleuchtung, Anregungswellenlängen 532 nm bzw. 633 nm (grün bzw. rot gestrichelt) und Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Atto532 bzw. Atto647 (magenta bzw. violett gestrichpunktet).

Um eine möglichst verzerrungsfreie Weitfeld-Abbildung des detektierten Fluoreszenzsignals zu erhalten, wurde darauf geachtet, dass die optischen Elemente im Detektionsstrahlengang völlig spannungsfrei in ihren Halterungen sitzen. Besonders bei den dünnen Spiegeln der Farbtrennung konnte ein starker Verzerrungseffekt beobachtet und durch Lockerung ihrer Halterungen aufgehoben werden. Zum Test auf einen verzerrungsfreien Detektionsstrahlengang wurde das Bild einer Monoschicht aus Polystyrolkugeln mit Durchlichtbeleuchtung aufgenommen (Abb. 4.6A). Die Überlagerung beider Farbkanäle durch eine geradlinige Translationsverschiebung zeigt eine fast perfekt Kolokalisation der Signale, die nur eine sehr geringe Verzerrung aufweist (Abb. 4.6B und C).

Bei der Benutzung von Objektiven mit einer NA von 0,8 oder höher treten Probleme durch Abweichungen der Deckglasstärke auf. Die Deckgläser der selben nominellen Stärke unterscheiden sich bezüglich ihrer tatsächlichen Dicke leicht voneinander, da sie vom Hersteller nur mit gewissen Toleranzen in der Glasstärke gefertigt wer-

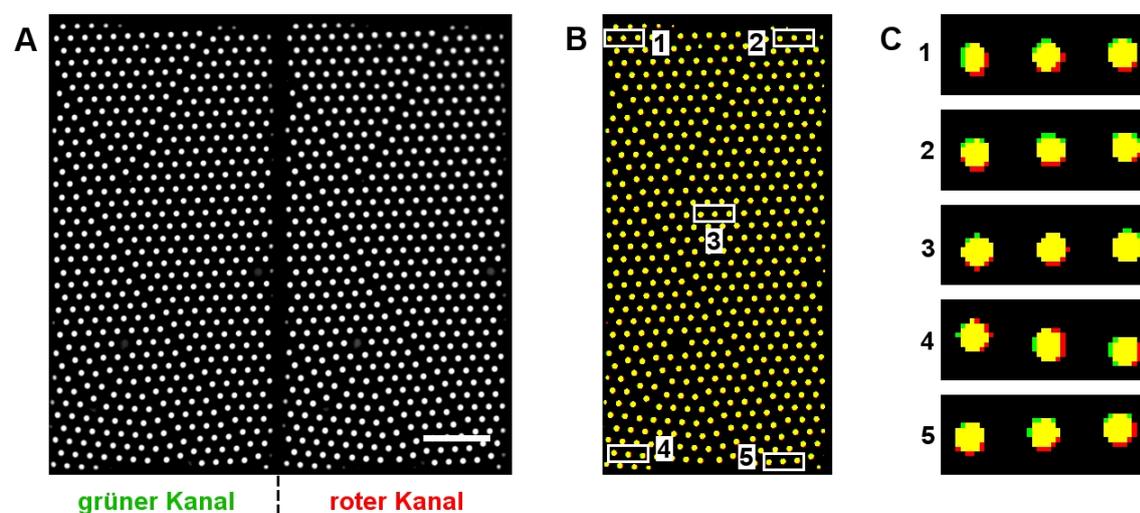


Abbildung 4.6.: Prüfung auf optische Verzerrungen bei der Detektion. (A) Eine Monoschicht von Kugeln aus Polystyrol mit einem Durchmesser von $2,16\ \mu\text{m}$ (Polybead, Polysciences Inc.) wurde mit Durchlichtbeleuchtung auf der EMCCD-Kamera abgebildet (Maßstabsmarkierung = $10\ \mu\text{m}$). Zur Anpassung beider Farbkanäle wurde, aufgrund des stärkeren Rotspektrums der verwendeten Halogenlichtquelle, die Intensität des roten Kanals durch einen Graufilter (OD 0,4) nach dem entsprechenden Bandpassfilter abgeschwächt. (B) Durch eine gradlinige Translationsverschiebung wurden die Farbkanäle der Aufnahme (A) übereinander gelegt. Die einzelnen Kanäle wurden mit Schwellenwertanpassung in binäre Dateien umgewandelt und sind mit den entsprechenden Falschfarben Grün bzw. Rot dargestellt. Die Kolokalisation der Kugeln führt zur gelben Mischfarbe. (C) Die in (B) gekennzeichneten Bereiche von jeweils drei nebeneinander liegenden Kugeln wurden zur genaueren Betrachtung um den Faktor 5,3 vergrößert. Selbst in den Ecken des ausgeleuchteten EMCCD-Chips sind nur geringfügige Verzerrungen vorhanden, die durch das Auftreten unvollkommener Kolokalisation an einigen Kugelrändern zu erkennen sind.

den können. So wird z. B. die tatsächliche Deckglasdicke von Borosilikatgläser der Firma Schott AG mit $0,145 \pm 0,015\ \text{mm}$ für die Glasstärke #1 und $0,175 \pm 0,015\ \text{mm}$ für die Glasstärke #1,5 angegeben. Stimmt die Dicke des Deckglases, das bei der Detektion die Probe vom Objektiv trennt, jedoch nicht exakt mit der präzisen Optik des Hoch-NA-Objektivs überein, so kommt es zu Aberrationen, welche die Detektionsqualität deutlich herabsetzen [137]. Aus diesem Grund kann bei hochwertig korrigierten Objektiven die axiale Position der zentralen Linsengruppe mit einem äußeren Ring der tatsächlichen Deckglasdicke angepasst werden [138]. In Abbildung 4.7 ist der Einfluss der Deckglaskorrektur-Einstellung am Beispiel der Einzelmolekül-Detektion mit dem Wasserimmersions-Objektiv der Apparatur dargestellt. Für die präsentierten Prisma-TIRFM-Aufnahmen von einzelnen DNA-Strängen, die

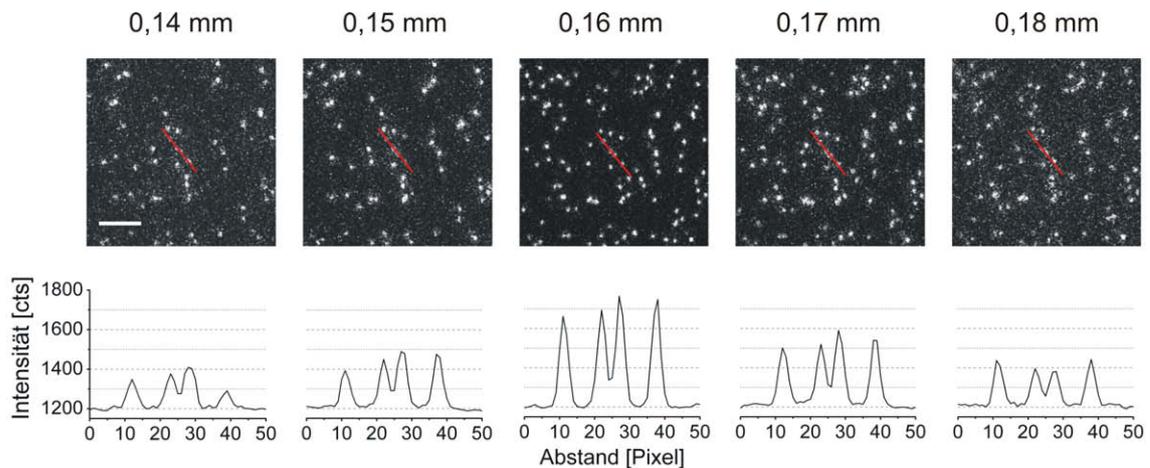


Abbildung 4.7.: Vergleich von Deckglaskorrektur-Einstellungen mit Prisma-TIRFM-Aufnahmen von einzelnen Molekülen. Die Fluoreszenz von Atto647-markierten DNA-Strängen (70 bp lange Oligomere) wurde bei unterschiedlicher Deckglaskorrektur mit einem Wasserimmersions-Objektiv (60 \times , NA 1,2, Nikon) aufgenommen. (Oberere Reihe) Darstellung der Einzelbilder bei unterschiedlicher Deckglaskorrektur, wobei die Korrekturwerte über den Bildern angegeben sind (Maßstabmarkierung = 5 μ m). Die unterschiedliche Anzahl von detektierten Molekülen ist auf Photobleichen der Probe während der durchgeführten Messreihe zurückzuführen. (Untere Reihe) Zum Vergleich der Detektionsqualität sind die Intensitätsprofile entlang einer Linie dargestellt, die in den Einzelbildern rot eingezeichnet ist. Um die Profile nicht durch photophysikalisches Signalrauschen der Fluorophore (Blinken, partielle Fluoreszenzlöschung, etc.) zu verfälschen, wurden sie von Bildern erstellt, die über 20 Einzelaufnahmen gemittelt wurden.

mit einem Atto647-Fluorophor markiert sind, wurden unterschiedliche Einstellungen der Deckglaskorrektur genutzt (Abb. 4.7 obere Reihe). Die Anpassung für eine Deckglasdicke von 0,16 mm ist offensichtlich die richtige Korrektoreinstellung für die gemessene Probe. Bei Einstellungen für höhere oder niedrigere Glasdicken zeigen die Einzelbildaufnahmen eine deutliche Qualitätsabnahme im Signal/Hintergrund-Verhältnis. Dies ist auch durch die Betrachtung der Intensitätsprofile über die eingezeichnete Strecken (rote Linien) zu erkennen. Im Profil sind die Intensitäten von vier einzelnen Fluorophoren aufgetragen, die bei falscher Deckglaskorrektur stark abnehmen (Abb. 4.7 untere Reihe).

4.2.6. Die EMCCD-Kamera

Zur Detektion des eingefangenen und farbgetrennten Fluoreszenzsignal wird eine Einzelphotonen-sensitive Kamera mit *electron-multiplying charge coupled device*

(EMCCD)-Technologie eingesetzt (iXon DV887 ECS-BV, Andor). Analog zu herkömmlichen CCD-Kameras werden auch bei dieser CCD-Technologie Elektronen durch das Auftreffen von Photonen auf einen Silicium-Halbleiter-Chip freigesetzt [137]. Bei dem verwendeten iXon-Modell handelt es sich um einen rückwärtig beleuchteten CCD-Chip (*back-illuminated*), der durch eine verdünnte Siliciumschicht höhere Quantenausbeuten ($> 90\%$) erreicht. Der photoaktive Bereich des Chips ist in einer Fläche von 512×512 Einheiten (Pixel) aufgeteilt und wird mit der *frame transfer*-Methode ausgelesen. D. h. die entstehende Ladung bei jedem Pixel wird nach abgeschlossener Belichtungszeit parallel in einen abgedunkelten Bereich verschoben, aus dem sie anschließend seriell durch einen A/D-Wandler ausgelesen wird (Abb. 4.8). Auf diese Weise kann die photoaktive Fläche noch während des Auslesevorgangs erneut belichtet werden, wodurch höhere Bildraten und geringere Totzeiten zwischen zwei Aufnahmen erreicht werden.

Die Geschwindigkeit der parallelen Verschiebung (*vertical shift speed*, $[0,4 \dots 6,6 \mu\text{s}]$) und die dafür benötigte Spannung (*vertical clock voltage amplitude* [normal/+1/+2/+3/+4]) kann bei der verwendeten iXon-Kamera variabel eingestellt werden. Bei besonders hoher Ladung pro Pixel, d. h. besonders hellem Signal, muss die *shift*-Geschwindigkeit herabgesetzt oder die *shift*-Spannung heraufgesetzt werden, um ein Verschmieren des Signals über mehrere Pixel zu vermeiden. Während des anschließenden seriellen Auslesens durch den A/D-Wandler wird das Signal auf eine

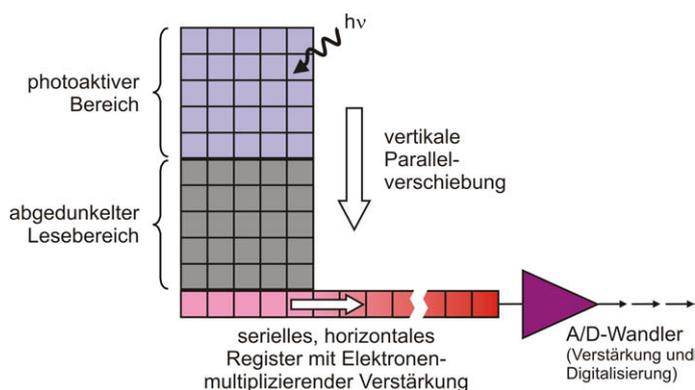


Abbildung 4.8.: Schematische Darstellung eines EMCCD-Detektors mit *frame transfer*-Technologie. Durch Beleuchtung des photoaktiven CCD-Bereichs kommt es zur Ladungstrennung im Halbleitermaterial. Die Ladung wird vertikal in den abgedunkelten Bereich verschoben, von wo sie horizontal ausgelesen wird. Im seriellen Register wird die Ladung noch vor der A/D-Umwandlung Elektronen-multiplizierend verstärkt.

Spannung von Millivolt bis Volt erhöht, um einen Ladungstransport über längere Leitungen zum Computer zu ermöglichen. Gleichzeitig wird das Signal bei einer Umwandlungsrate von 10 MHz und einem dynamischen Bereich von 14 bit digitalisiert.

Das Signalrauschen bei CCD-Kameras entsteht aus dem Rauschen durch thermische Elektronen, dem *clock induced charge*-Rauschen sowie dem Ausleserauschen des A/D-Wandlers. Bei herkömmlichen CCD-Kameras werden unter geringer Beleuchtung die verschiedenen Rauschbeiträge durch das Ausleserauschen dominiert. Ein schwaches Signal mit geringer Photonenzahl (z. B. von einzelnen Fluorophoren) wird von solchen Kameras nicht erkannt werden, sondern im Rauschen untergehen. Die EMCCD-Technologie behebt dieses Problem, indem bei ihr das Signal noch vor dem Auslesen verstärkt wird. Die auszulesenden Elektronenladungen wandern dazu nach der Parallelverschiebung in ein serielles Verstärkungsregister, wo mittels einer angelegten Spannung weitere Elektronen durch Stoßionisierung erzeugt werden. Der Verstärkungsfaktor dieses lawinenartigen Prozesses kann durch die Spannung variabel über den so genannten Gain-Faktor der Kamera eingestellt werden. Durch eine hohe Verstärkung des Signals vor dem Auslesen ist es mit der EMCCD-Kamera möglich auch einzelne Photonen zu detektieren. Abbildung 4.9 zeigt den experimentell ermittelten, exponentiellen Verlauf der Verstärkung in Abhängigkeit des Gain-Faktors. Eine weitere Verstärkung erhält das Signal durch den „Vorverstärker-Gain“ (*pre-amplifier gain*). Dieser optional zuschaltbare Faktor beeinflusst die Sensitivität des A/D-Wandlers. Alle Einzelmolekül-Messungen der vorliegenden Arbeit wurden mit einem Vorverstärker-Gain von $2,4\times$ durchgeführt. Mit diesem Faktor ergibt sich eine A/D-Wandler-Sensitivität von 23 Elektronen für eine Zählleinheit der Kamera (*counts, cts*).

Laut individuellem Datenblatt der verwendeten Kamera liegt das Rauschen für ein einzelnes Pixel (*single pixel noise*) bei einer A/D-Umwandlungsrate von 10 MHz und einem Vorverstärker-Gain von $2,4\times$ bei 106,6 Elektronen. Da für jedes Photon beim Auftreffen auf den EMCCD-Chip nur ein Elektron freigesetzt wird, muss dieses Elektron um einen Faktor $> 106,6$ verstärkt werden, damit das einzelne Photon als Signal über dem Rauschen erkannt werden kann. Nach dem Ergebnis aus Abbildung 4.9 wäre die Detektion eines einzelnen Photons demnach mit einem Gain-Faktor > 180 erreicht.

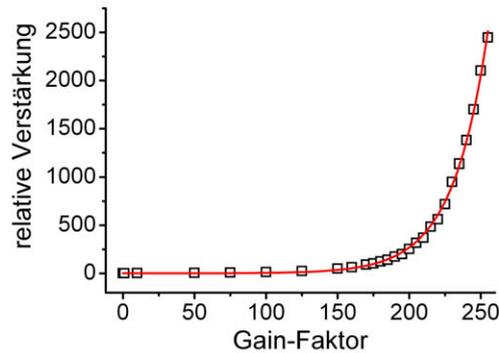


Abbildung 4.9.: Ermittelter Verlauf der relativen Verstärkung in Abhängigkeit des Gain-Faktors bei einer Kamerakühlung von $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gain 0 = rel. Verstärkung von 1).

Ein Nachteil der Elektronen-multiplizierende Verstärkung besteht darin, dass die Rauschbeiträge durch Einzelelektronen-Ereignisse ebenfalls verstärkt werden. Thermisch erzeugte Elektronen während einer Belichtungsphase werden durch das Verstärkungsregister fälschlicherweise als einzelnes Photon wiedergeben. Bei EMCCDs ist deshalb eine besonders starke Kühlung während der Messung notwendig. Mit der zur Verfügung stehenden Kamera werden Tiefsttemperaturen von $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittels Luft- und ca. $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittels Wasserkühlung erreicht.

Auch während der vertikalen Ladungsverschiebung vom Chip in das Ausleseregister werden einzelne Elektronen freigesetzt, die zum Rauschen beitragen (*clock induced charge*, CIC). Das CIC-Rauschen tritt bei jeder Art von CCD-Kamera auf, doch bei EMCCD-Kameras gilt der CIC-Beitrag als limitierender Faktor des Signal/Rausch-Verhältnisses. Dieser Umstand schränkt die Anpassung der bereits erwähnten *vertical clock voltage amplitude* für einen schnelleren Verschiebungsprozess ein. Eine Erhöhung der Verschiebungsspannung würde zu einem höheren CIC-Rauschen führen. Durch das Zusammenfassen mehrerer Pixel beim Auslesen des Chips (*binning*) kann diesem Problem theoretisch entgegen gewirkt werden.

Das entstehende Signal einer Detektionsmethode, bei der praktisch einzelne Photonen gezählt werden, unterliegt zusätzlich einem Poisson-statistisch bedingtem Signalrauschen (*shot noise*). Dieses Rauschen wird bei EMCCD-Kameras durch statistische Schwankungen des Stoßionisierungsprozesses erhöht. Die wahrscheinlichkeitsbedingte Natur der lawinenartigen Photoelektronengenerierung erhöht das Poisson-Rauschen des Signals um den multiplikativen Faktor $\sqrt{2}$ [137].

Vor Beginn der eigentlichen Probenuntersuchungen wurden Messreihen mit dem fertig gestellten Probensystem aus TBP, DNA und NC2 durchgeführt, um die optimalen Einstellungen der EMCCD-Kamera für das maximale Signal/Rausch-Verhältnis bei der Detektion einzelner, fluoreszierender Moleküle zu bestimmen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Kameratemperatur von $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausreichend ist, um das thermische Rauschen zu minimieren. Die Variation des Gain-Faktors zeigte, dass eine Erhöhung dieses Verstärkungsfaktors nur bis zu einem Wert von 225 sinnvoll ist, um eine überproportionale Signalverstärkung zum Rauschen zu erreichen. Bei höheren Gain-Faktoren wird das Rauschen jedoch proportional zum Signal verstärkt. Ab einem Gain von 250 nimmt das Rauschen sogar überproportional zum Signal zu. Das Variieren der *vertical shift*-Geschwindigkeit und der angelegten *shift*-Spannung bei der parallelen Ladungsverschiebung des Ausleseprozesses sowie unterschiedliche *binning*-Einstellungen zeigten wiederum keinen Effekt auf das resultierende Signal/Rausch-Verhältnis. Die Qualität des Signals ist demnach unabhängig vom CIC-Rauschen. Vielmehr wurde erkannt, dass Hintergrundphotonen, die durch eine unreine Prismaoberfläche mit fluoreszierendem Dreck sowie durch Streulicht im Prisma entstehen, den limitierenden Faktor der Signalqualität darstellen.

Mit den Erkenntnissen aus diesen Testmessungen wurden die Untersuchungen der biophysikalischen Probe stets bei einer Temperatur von $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, einem Gain von 230, einer *shift*-Geschwindigkeit von $0,6\text{ }\mu\text{s}$ und der *shift*-Spannungseinstellung „normal“ durchgeführt. Die Zeit zwischen zwei Belichtungszyklen der EMCCD-Kamera betrug mit diesen Parametereinstellungen nur $320\text{ }\mu\text{s}$. Mit der schnellsten A/D-Wandlerrate von 10 MHz wird die kürzeste Belichtungszeit für eine Bilderfolge von 29 ms erreicht (bezogen auf das Auslesen der gesamten 512×512 Pixel)¹. Eine Übersicht zu den verwendeten Kameraeinstellungen der durchgeführten Prisma-TIRFM-Experimente

¹Noch kürzere Belichtungszeiten bei voller Chipgröße sind zwar möglich, aber die Bildrate wird durch die Geschwindigkeit des A/D-Wandlers limitiert. Für Belichtungszeiten $< 29\text{ ms}$ wird deshalb automatisch ein *keep clean cycle* eingefügt, der die kürzeste Zeit zwischen zwei Bildaufnahmen auf 185 ms festsetzt. Durch diesen „Reinigungszyklus“ werden die Ladungen, die während des Auslesens durch weiter einfallendes Licht entstanden sind, vom Chip gelöscht. Erst dann wird mit der nächsten Belichtungsphase begonnen. Zeitlich höher aufgelöste Bilderfolgen durch kürzere Belichtungszeiten können deshalb nur erreicht werden, wenn der Bereich des auszulesenden Chips (*region of interest*, ROI) eingeschränkt wird.

ist tabellarisch in Anhang B aufgeführt.

Die Größe eines EMCCD-Pixels der verwendeten iXon-Kamera beträgt $16 \times 816 \mu\text{m}^2$. Bei einer Gesamtvergrößerung des Detektionsaufbaus um den Faktor 120 (Abschnitt 4.2.4) ergibt sich auf jedem Pixel eine theoretisch abgebildete Probenfläche von $133,3 \times 133,3 \text{ nm}^2$. Um die tatsächliche Abbildungsgröße eines Pixels festzustellen, wurde ein *US Air Force*-Testmuster (Linien aus Chrom auf Glas, Thorlabs) mit Durchlichtbeleuchtung auf der Kamera abgebildet. Die Vermessung der standardisierten Abstände und Linienbreiten des Musters (bis zu $2,19 \mu\text{m}$ dünn) ergab bei beiden Farbkanälen eine tatsächliche Abbildungspixelgröße von $135,1 \times 135,1 \text{ nm}^2$. In den Kanälen wurde somit eine jeweilige Gesamtfläche von $69,2 \times 34,6 \mu\text{m}^2$ abgebildet.

Die iXon-Kamera besitzt zwei Trigger-Ausgänge, die für die durchgeführten Messungen als Taktgeber zum automatisierten Messablauf genutzt wurden. Der *fire out*-Ausgang der Kamera gibt bei der Aufnahme einer Bildsequenz für jedes Bild ein erneutes Signal aus. Dieses Trigger-Signal eignet sich deshalb zur Synchronisierung der programmierten Shuttersteuerungssequenzen bei der Zweifarbenanregung (Abschnitt 4.2.1). Der *shutter out*-Ausgang gibt bei den beschriebenen Kameraeinstellungen nur zu Beginn einer Bildsequenzaufnahme ein Signal aus und wird zum synchronen Start der Flusssystemsteuerung genutzt (Abschnitt 4.2.7).

4.2.7. Probenpositionierung und Flusssystem

In Abschnitt 3.1.3 wurde bereits das Bleichen einzelner Fluorophore behandelt. Die Beobachtung von einzelnen Molekülen mittels TIRFM-Messungen bei Raumtemperatur ist aufgrund des Photobleichens in der Regel nicht länger als ca. eine Minute möglich. Anschließend sind alle Fluorophore, die auf dem Prisma fixierten Probe, durch das Anregungslicht zerstört worden. Für weitere Messungen muss deshalb der Probenbereich durch das Verschieben der Flusskammer gewechselt werden. Bei der hohen axialen Auflösung von $\sim 100 \text{ nm}$ durch die TIRFM-Beleuchtung ist es jedoch wichtig, dass trotz der Probenraumverschiebung die Fokusposition der Weitfeld-Detektion beibehalten wird. Andernfalls wird der maximale Beobachtungszeitraum für einzelne Fluorophore durch eine notwendige Nachfokussierung vor der eigentlichen Messung verkürzt.

Bei der Einzelfertigung des in Abbildung 4.10 gezeigten Mikroskoptisches wurde aus diesem Grund besonders auf eine hohe Steifigkeit und eine geringe Höhenabweichung

im Positionsbereich des Kreuztisches geachtet. Als Kreuztisch wird ein stabiler xy-Verschiebetisch mit einer Apertur von 57,1 mm Durchmesser (M-401, Newport) verwendet. Die Flusskammer selber wird in einer eigenen Halterung auf den Kreuztisch befestigt. Während die Probenraumposition parallel zum einfallenden Anregungsstrahl mit einer Mikrometerschraube am Kreuztisch einstellbar ist, wird die senkrechte Position zum Anregungsstrahl mit einem elektronisch gesteuerten Aktuator (NewStep NSA12, Newport) verschoben. Mit diesem Motor sind ultra-feine aber auch extrem lange Schritte schnell durchführbar. So kann quasi mit einem Sprung des Probenraums der belichtete Bereich vor einer Messung komplett ausgetauscht werden. Die externe Steuerung des Motors ermöglicht die präzise Verschiebung in einer Dimension und verhindert eine Änderung der axialen Probenposition, wie sie bei der Anwendung von Mikrometerschrauben aufgrund von manuell-mechanischer Belastung vorkommen kann. Abhängig von der Güte der Flusskammer können mit diesem Positionierungssystem für die Probe Messungen von bis zu zehn benachbarten Belichtungsbereichen im Probenraum durchgeführt werden, bevor eine Nachfokussierung notwendig ist.

Um die Möglichkeit zu haben, während einer Prisma-TIRFM-Messung den Inhalt des Probenraumes zu ändern (für Medienwechsel, Proteinzugabe, etc.), wurde ein Flusssystem entwickelt, dessen Komponenten ebenfalls in Abbildung 4.10 zu finden sind (schematische Darstellung siehe Abb. 4.1). Die Zugabe der Probenlösung aus den zwei zur Verfügung stehenden Reservoirs geschieht über ein elektronisch gesteuertes System aus 2-Wege- bzw. 3-Wege-Ventilen (Teflon Valve TV-2 bzw. Mini Solenoid Valve SV-1, Harvard Apparatus). Diese Miniventile weisen ein Totvolumen von nur wenigen Mikrolitern auf. Als Leitungen werden Polypropylenschläuche (AD 0,96 mm/ID 0,58 mm, Portex) verwendet. Ein abgedichteter Anschluss an den Probenraum über die Bohrungen der Flusskammer (ID 1,6 mm) wird mit kurzen Silikonschläuchen (AD 1,6 mm/ID 0,8 mm, Reichelt Chemietechnik Heidelberg) erreicht, welche mit innen eingebrachten Teflonschläuchen (AD 1,03 mm/ID 0,7 mm, Reichelt Chemietechnik Heidelberg) aufgeweitet sind. Das 3-Wege-Ventil, über das die Zugabe gestartet wird, ist besonders nah am Flusssystem angebracht, um eine möglichst schnelle Probenzugabe zu erreichen und die Vermischung, mit einer sich bereits im Flusssystem befindlichen Lösung, zu minimieren. Das Totvolumen zwischen diesem Ventil und der Flusskammer wurde auf $\sim 10 \mu\text{L}$ bestimmt. Die Fluss-

4. Experimenteller Aufbau des TIRF-Mikroskops

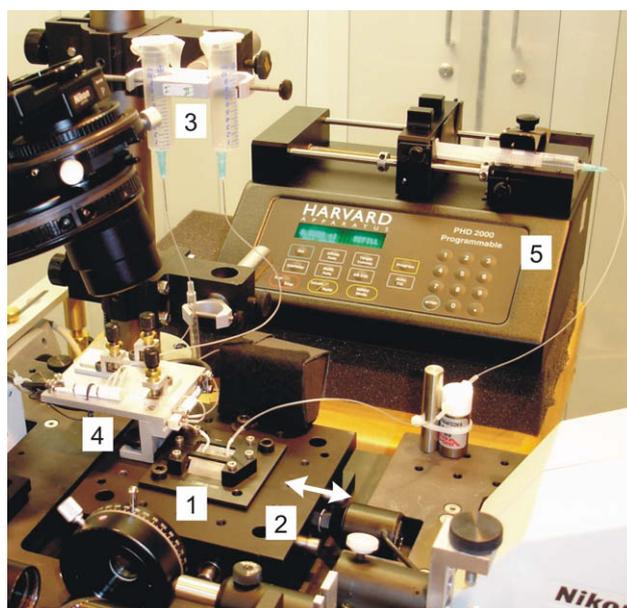


Abbildung 4.10.: Fotografie des Probenstischaufbaus und des Mikro-Flusssystem für Prisma-TIRFM-Experimente. Probenpositionierung: (1) Halterung der Flusskammer, unter der sich das Objektiv befindet; (2) auf dem Mikroskoptisch befestigter Kreuztisch mit Apertur, der in der eingezeichneten Dimension motorisiert bewegt werden kann. Mikro-Flusssystem: (3) Zwei Probenreservoirs, zwischen denen während einer Messung gewechselt werden kann; (4) Teil des Mikro-Ventilsystems direkt an der Flusskammer; (5) programmierbare Spritzenpumpe zur Kontrolle der Flussrate und Steuerung der Ventile.

rate wird von einer programmierbaren Spritzenpumpe (PHD 2000 Programmable, Harvard Apparatus) gesteuert, die im Saugmodus betrieben wird².

Zum reproduzierbaren Ablauf einer Messung, bei der ein Austausch der Probenlösung während der Messung stattfindet, wird die Steuerung der Pumpe und Ventile durch die iXon-Kamera mit den Start der Messung synchronisiert. Der Trigger-Puls der Kamera (*shutter out*) startet ein angepasstes Messprogramm der Spritzenpumpe. Die Pumpe wiederum öffnet im Laufe der Messung die entsprechenden Ventile automatisch, um die Probenzugabe zu einem bestimmten Zeitpunkt stattfinden zu lassen.

²Trotz des geringen Totvolumens vor der Flusskammer dauert die Zugabe einer Probenlösung auch bei einer Saugrate von 2 mL/min mehrere Sekunden, da sich der Saugdruck durch die längeren Schläuche hinter der Kammer nur mit einer gewissen Trägheit aufbaut.

4.3. Objektiv-TIRFM und Weitfeld-Mikroskopie

Der experimentelle Aufbau des Mikroskops wurde so konzipiert, dass ein schnelles Umschalten von Prisma-TIRFM auf herkömmliche Epi-Fluoreszenz-Weitfeldanregung möglich ist. Durch Verschieben der optischen Achse kann anschließend auch die evaneszente Beleuchtung von Objektiv-TIRFM eingestellt werden. Der Anregungsstrahlengang dieser Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Mikroskopie wurde bereits in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. In Abbildung 4.11 ist er in der Photographie des tatsächlichen Aufbaus eingezeichnet.

Um von Prisma-TIRFM auf Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Beleuchtung umzuschalten, braucht nur der Klappspiegel hinter dem Faserausgang aus dem Strah-

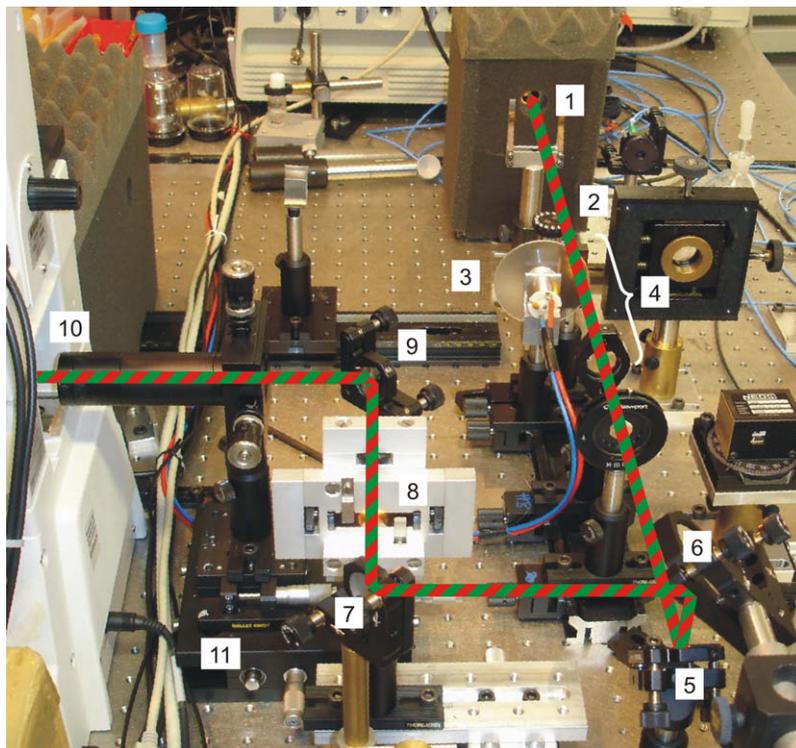


Abbildung 4.11.: Strahlengang der Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Anregung: (1) Faserausgang; (2) entnommener Klappspiegel; (3) Diffusor für eine interferenzfreie Beleuchtung; (4) Teleskop zur Strahlaufweitung; (5 und 6) Episkop; (7) Spiegel; (8) rechteckige Feldblende; (9) Spiegel zur Umlenkung auf die optische Achse des Mikroskops; (10) achromatische Linse zur Fokussierung in die rückwärtige Brennebene des Objektivs; (11) Mikrometertisch, mit dem die Elemente (9) und (10) seitlich zur optischen Achse des Mikroskops verschoben werden können, um zwischen Weitfeld-Beleuchtung und Objektiv-TIRFM wechseln zu können.

lengang entnommen zu werden. Das kollimierte Laserlicht wird dann nach der Faser mit einem 8 \times -Teleskop (achromatische Linsen, $f = 16$ mm und $f = 120$ mm) aufgeweitet. Im Fokus der Strahlaufweitung befindet sich eine rotierende Diffusorscheibe (Polycarbonat, Dicke 1,5 mm, LSD20PC60-6, Physical Optics Corporation), die von einem 5V-Elektromotor (Conrad) angetrieben wird. Der Diffusor hebt die Interferenzen der Beleuchtung auf und die Strahlaufweitung führt zu einer homogeneren Intensitätsverteilung der Weitfeld-Beleuchtung. Mit einer episkopischen Spiegelanordnung wird das Licht auf die richtige Höhe für die spätere Einkopplung ins Mikroskop gebracht. Der Einsatz einer rechteckigen Feldblende (von gleicher Bauart wie im Detektionsstrahlengang) dient zur Begrenzung des beleuchteten Feldes. Auf diese Weise wird eine Photozerstörung der Probe außerhalb des detektierbaren Sichtfeldes verhindert. Nach der Feldblende wird der kollimierte Lichtstrahl zur Weitfeld-Beleuchtung mit einem Spiegel auf die optische Achse des Mikroskops gelenkt und anschließend durch eine achromatische Linse ($f = 300$ mm) in die rückwärtige Brennebene (*back focal plane*, BFP) des Objektivs fokussiert. Der Strahl wird dabei im Filterrevolver des Mikroskops durch den bereits in Abschnitt 4.2.5 beschriebenen dichroitischen Spiegel (Dualbandfilter z532/633rpc, AHF, Spektrum siehe Abb. 4.5) in das darüber sitzende Objektiv gelenkt. Dieser Spiegel reflektiert nur die Anregungswellenlängen und transmittiert das Fluoreszenzsignal der Farbstoffe, die für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurden.

Für einen Übergang von der Weitfeld- zur Objektiv-TIRFM-Beleuchtung wurde der Spiegel, der den Anregungsstrahl auf die optische Achse lenkt, zusammen mit der Linse, die das Licht in die BFP fokussiert, auf einen Mikrometertisch positioniert. Durch Verfahren dieser zwei Elemente senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops kann der Strahlengang parallel zu dieser Achse verschoben werden. Der Strahl wird dann nicht mehr in der BFP-Mitte, sondern am Rand der BFP fokussiert. Wenn der Strahl so weit verschoben wurde, dass das Licht in einem Winkel θ_i aus dem Objektiv tritt, der höher ist als der kritische Einfallswinkel θ_c (Abb. 3.12 rechts), kommt es zur internen Totalreflexion des Anregungslichts an der Phasengrenze Deckglas/Probenmedium. Besonders große Werte für θ_i werden mit der Verwendung von so genannten TIRF-Objektiven erreicht, da sie eine große Rückapertur (≥ 11 mm) und eine NA von 1,45 oder höher aufweisen. Für den Einsatz der Objektiv-TIRF-Mikroskopie wurden im Laufe dieser Arbeit zwei dieser

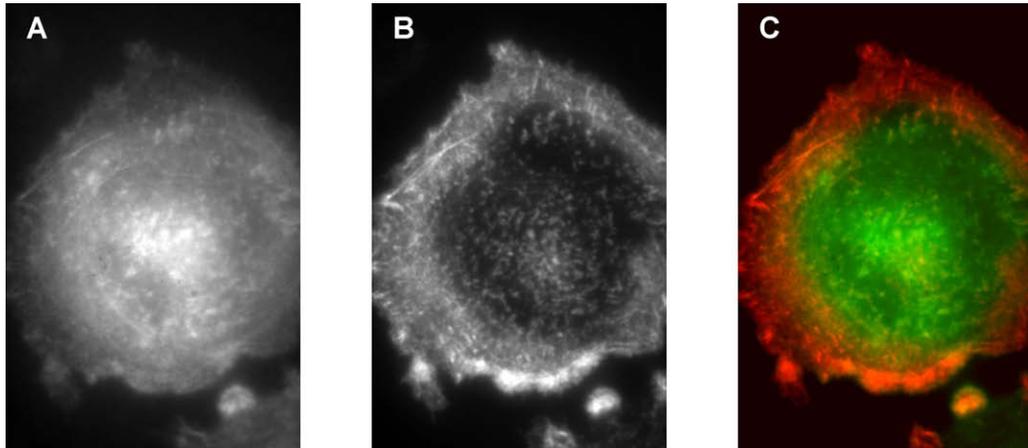


Abbildung 4.12.: Direkter Vergleich von Epi-Fluoreszenz- und Objektiv-TIRFM-Anregung. (A) DsRed-markierte Actin-Filamente an der unterseitigen Zellmembran von lebenden HeLa-Zellen sind mit der üblichen Weitfeld-Beleuchtung aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz sehr schwer zu erkennen. (B) Die Objektiv-TIRF-Anregung der selben Probenebene führt zur selektiven Anregung der Fluorophore, die sich im evaneszenten Feld befinden, wodurch das Signal/Hintergrund-Verhältnis sehr viel höher ist. (C) Überlagerung der Weitfeld(grün)- und TIRFM(rot)-Aufnahme in Falschfarbendarstellung.

TIRF-Objektive (60 \times , Ölimmersion, Nikon, NA 1,45 und 1,49) angeschafft.

Dass mit dem aufgebauten Mikroskopiesystem neben Prisma-TIRFM auch Objektiv-TIRFM sowie herkömmliche Epi-Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden kann, dient der Möglichkeit, an der selben Apparatur auch Einzelmolekül-sensitive Untersuchungen an lebenden Zellen durchführen zu können. Während mit dem Flusskammersystem bei Prisma-TIRFM nur *in vitro*-Experimente möglich sind, können mit der zusätzlichen Option der Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Beleuchtung auch *in vivo*-Untersuchungen stattfinden. Hierzu wurde das Mikroskop mit einem Inkubationssystem in Form eines Heiztisches (Heizeinsatz P (Lab-Tek type), PeCon GmbH) erweitert (Abb. 4.13), sodass Messungen bei physiologischen Temperaturbedingungen möglich sind. Um Temperaturgradienten in der Probe durch Auskühlung am Objektiv zu vermeiden, wurde das System ebenfalls mit einer Objektivheizung (OH-18 Heizring, 20/20 Technology) bestückt. Des Weiteren liegt für das System ein kompletter Filtersatz zum Arbeiten mit eGFP- und mRFP-markierten Proben (oder Fluorophoren mit ähnlichen spektralen Eigenschaften) bereit. Eine Übersicht der gemessenen Spektren dieser Filter ist in Anhang C aufgeführt.

Zum direkten Vergleich der üblichen Epi-Fluoreszenzanregung mit der Objektiv-TIRFM-Anregung, die eine viel höhere axiale Auflösung aufweist, wurde das Bild einer HeLa-Zelle mit beiden Beleuchtungsmethoden aufgenommen. Die untersuchte Zelle exprimiert DsRed-markierte Actin-Filamente, die mit 532 nm angeregt wurden. Die Bilder beider Beleuchtungsarten wurden in der selben z-Ebene der Zelle, in der Nähe der basalen Zellmembran, mit einem TIRF-Objektiv (60×, NA 1,45, Ölimmersion, Nikon) aufgenommen. Abbildung 4.12 zeigt das Ergebnis dieser Messungen. Mit der Weitfeld-Beleuchtung sind aufgrund des starken Hintergrundsignals kaum detaillierte Strukturen des Filamentgerüsts zu erkennen (Abb. 4.12A). Das dominierende Hintergrundsignal entsteht u. a. durch monomer gelöstes Actin im Cytoplasma, das außerhalb des Fokus zusätzlich detektiert wird. Die TIRF-Beleuchtung hingegen führt zu einer selektiven Anregung der Aktin-Filamente nahe der unterseitigen Zellmembran (Abb. 4.12B). Die Actin-Monomere im Cytoplasma werden gar nicht oder nur sehr schwach angeregt, wodurch das Signal/Hintergrund-Verhältnis stark verbessert wird. Die einzelnen Actin-Filamente der adherenten HeLa-Zelle sind nun deutlich zu erkennen. Die Überlagerung beider Aufnahmen (Abb. 4.12C) zeigt, dass besonders in der Zellmitte, wo die Zelle am höchsten ist, viel monomeres Actin vorkommt, das zu einem hohen Hintergrundsignal der Weitfeld-Beleuchtung führt (grün dargestellt). Auf der Zellunterseite sind die Actine jedoch in filamentöser Form und hauptsächlich am äußeren Rand der Zelle zu finden (rot dargestellt), da die strukturgebenden Actin-Filamente bei HeLa-Zellen zur adherenten Haftung und Fortbewegung auf einer Oberfläche dienen.

4.4. Durchlichtmikroskopie mit differentiellm Interferenzkontrast

Neben Prisma-TIRFM, Objektiv-TIRFM und einfacher Epi-Fluoreszenzmikroskopie kann mit dem beschriebenen Aufbau auch die spezielle Durchlichtmikroskopie mit differentiellm Interferenzkontrast (*differential interference contrast*, DIC) durchgeführt werden. DIC dient zur Untersuchung von Phasenpräparaten, die - wie z. B. lebende, nicht angefärbte Zellen - bei einfacher Durchlichtbeleuchtung nur mit unzureichendem Kontrast beobachtet werden können. Die Durchlichtoptik sowie das bereits im vorangegangenen Abschnitt 4.3 beschriebene Inkubationssystem ist in der

Abbildung 4.13 dargestellt.

Bei der DIC-Mikroskopie wird ein besonders hoher Bildkontrast durch die Interferenz zweier phasenverschobener Wellenzüge erreicht [139]. Abbildung 4.14 gibt schematisch das Prinzip dieser Methode und die Anordnung der Mikroskopoptik wieder, die für dieses Beleuchtungsverfahren benötigt wird. Das Licht der Halogenlampe wird durch Passieren eines Polarisationsfilters (Polarisator) in linear polarisiertes Licht umgewandelt. Anschließend wird es durch ein Wollaston-Prisma in zwei Wellenfronten gespalten, die in leicht unterschiedlichen Richtungen das Prisma verlassen. Die Schwingungsebenen beide Wellenzüge werden in ihrer Orientierung durch das Prisma senkrecht zueinander ausgerichtet. Zusätzlich wird vom Prisma ein Gangunterschied zwischen beiden Zügen eingefügt. Das Wollaston-Prisma als polarisationsoptisches Element setzt sich aus zwei Quarzkeilen zusammen, die an ihrer Hypothenuse miteinander verklebt sind. Die optischen Achsen der Keile stehen dabei senkrecht zu einander. Linear polarisiertes Licht, dessen Schwingungsebene in einem 45° -Winkel zu den beiden Achsen des Prismas orientiert ist, wird somit im optisch anisotropen Raum in die beschriebenen Wellenzüge mit senkrechter Schwingungsebenen zueinander aufgespalten. Im häufigsten Fall werden für die DIC-Mikroskopie modifizierte Wollaston-Prismen nach Nomarski (Nomarski-Prismen)



Abbildung 4.13.: Fotografie der DIC-Durchlichtoptik des inversen Mikroskops mit dem sich darunter befindenden Inkubationssystem.

4. Experimenteller Aufbau des TIRF-Mikroskops

eingesetzt, die im Vergleich zu herkömmlichen Wollaston-Prismen in einem größeren Abstand zur benachbarten Optik (Kondensator oder Objektiv) positioniert werden können.

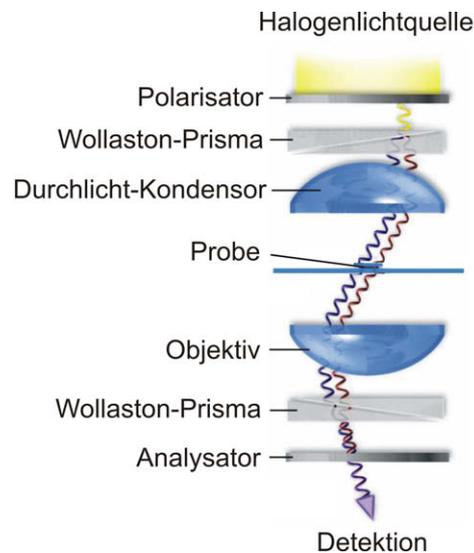


Abbildung 4.14.: Schematische Darstellung des Durchlichtstrahlengangs mit DIC-Optik.

Die erzeugten Wellenzüge werden durch den Kondensator des Mikroskops parallel ausgerichtet und passieren mit einem bestimmten Abstand zueinander die Probe. Die laterale Distanz der Wellen liegt dabei unterhalb der mikroskopischen Auflösungsgrenze. Da die Wellenzüge senkrecht zueinander polarisiert sind, werden sie nach der parallelen Ausrichtung nicht interferieren. Durch lokal unterschiedliche Brechungsindices in der Probe kommt es einer weiteren Modifizierung des Gangunterschieds der lateral versetzten Wellenzüge. Ein Wellenzug benötigt für das Passieren eines optisch dichteren Probenbereichs mehr Zeit als der Wellenzug im optisch dünneren Bereich.

Die modifizierten Wellenzüge passieren nach dem Objektiv des Mikroskops ein zweites Wollaston- bzw. Nomarski-Prisma, das die Wellenzüge wieder zusammenfügt, indem der laterale Abstand und der vom ersten Prisma initial erzeugte Gangunterschied aufgehoben wird. Der zusätzlich durch die Probe eingebrachte Phasenunterschied bleibt jedoch bestehen. Ein zweiter Polarisationsfilter (Analysator), der in Kreuzstellung zum ersten Filter steht, bringt die Schwingungen der vereinten Wellenzüge wieder in eine gemeinsame Ebene und auf eine gemeinsame Achse. Die

phasenverschobenen Wellenfronten werden auf diese Weise zur Interferenz miteinander gebracht. Durch die Interferenz wird die abgebildete Probe reliefartig dargestellt.

Der künstlich erzeugte 3D-Effekt durch DIC führt zu einem deutlich verbesserten Probenkontrast bei Phasenpräparaten als dies mit der normalen, nach Köhler optimierten Durchlichtbeleuchtung möglich ist. In der Abbildung 4.15 sind hierzu Durchlichtbilder von HUH7-Zellen aufgeführt, die mit der beschriebenen Messapparatur aufgenommen wurden. Es können mit DIC-Verfahren allerdings nur Probenstrukturen dargestellt werden, die in der Probenebene senkrecht zur lateralen Wellenfront-Aufspaltung verlaufen. Parallel zur Aufspaltung verlaufende Strukturen hingegen bewirken keine *unterschiedliche* Phasenverschiebung der Wellenzüge. Es sei abschließend nochmals darauf hingewiesen, dass die reliefartige Probendarstellung auf die lokal unterschiedlichen Brechungsindices in der Probe basiert. Das daraus entstehende Relief darf deshalb nicht zwingend als tatsächliche Probendicke interpretiert werden.

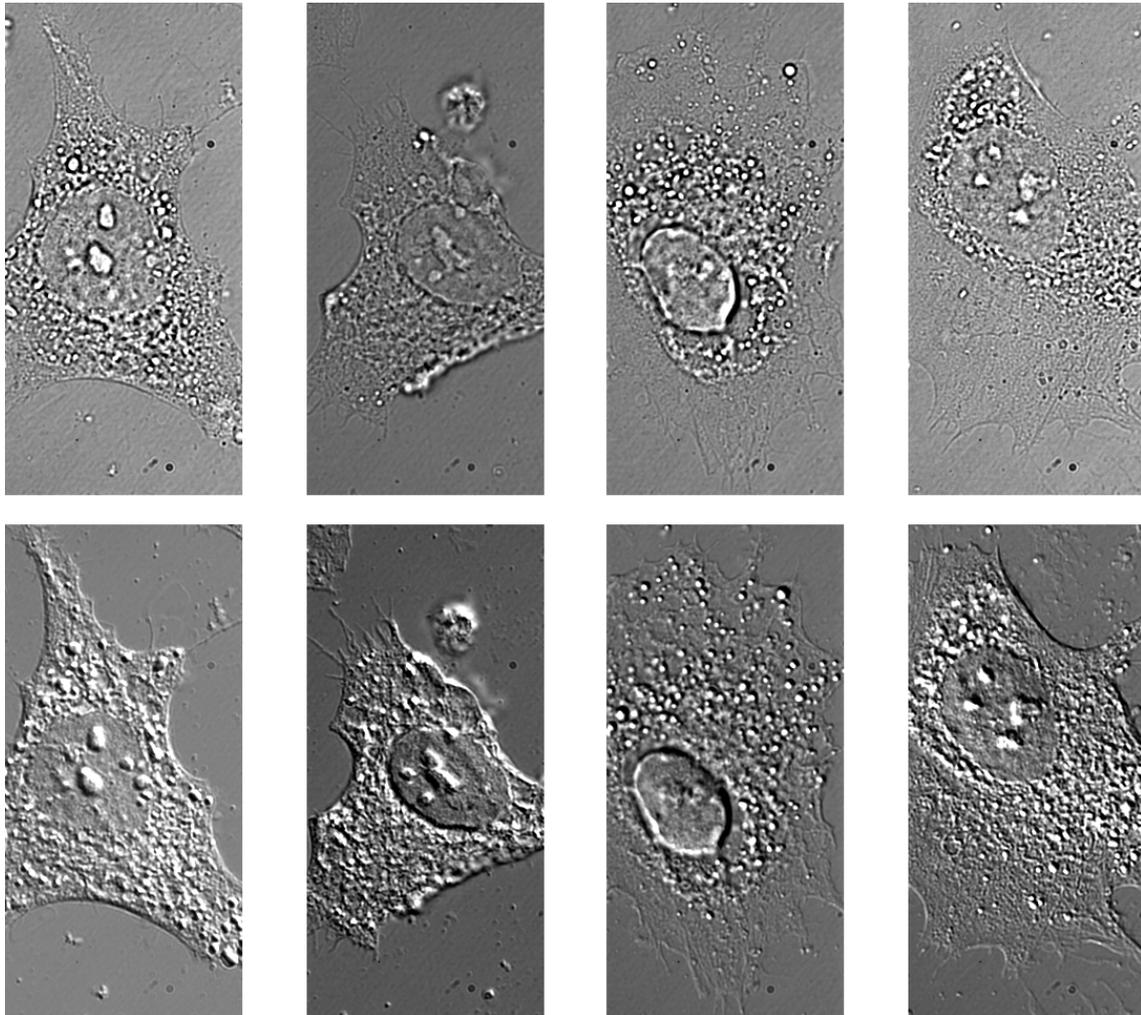


Abbildung 4.15.: Vergleich von einfacher Durchlichtmikroskopie und DIC-Mikroskopie an der beschriebenen Messapparatur. (obere Reihe) Aufnahmen mit einfacher Durchlichtbeleuchtung von HUH7-Zellen, die mit Paraformaldehyd fixiert wurden. (untere Reihe) Die selben Zellen mit DIC-Beleuchtung. Diese Beleuchtungsmethode zeigt vor allem die besonders dünnen Ausläufer am Rand der adherenten Zellen in einem viel höheren Kontrast.

5. Die Datenanalyse

Mit der beschriebenen experimentellen Apparatur wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit dynamische Prozesse des TBP-DNA-NC2-Probensystems untersucht. Hierzu wurden spFRET-Experimente *in vitro* mit Prisma-TIRF-Mikroskopie durchgeführt. Um die Dynamik eines Probensignals beobachten zu können, muss die Intensität der Fluoreszenzemission zeitlich verfolgt werden. Dies geschieht durch die EMCCD-Aufnahme von Bilderfolgen einzelner FRET-Paare, in denen der Intensitätsverlauf des FRET-Donors und -Akzeptors durch Zweifarben-Detektion separat festgehalten wird. Die Datenanalyse dieser Bildsequenzen gliedert sich in die Extraktion und der anschließenden Analyse der Intensitätsverläufe. Abbildung 5.1 dient als Übersicht dieser Schritte, die separat im Folgenden erläutert werden.

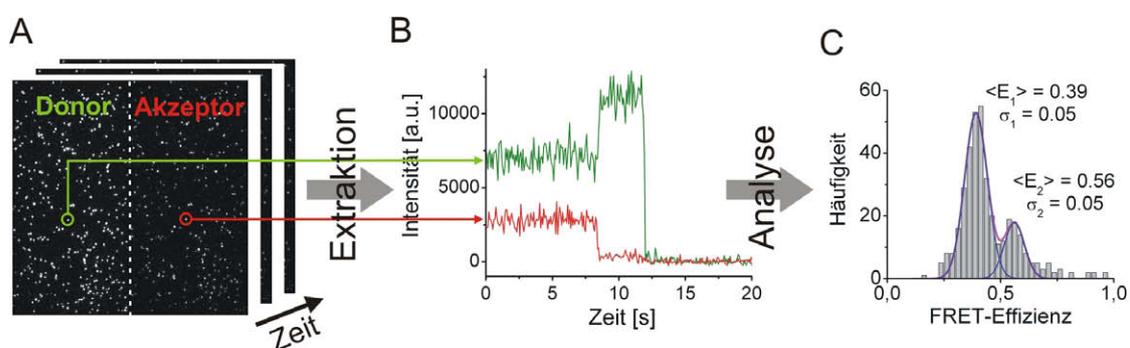


Abbildung 5.1.: Übersicht zu den einzelnen Schritten der Datenanalyse. (A) Bilderfolge als Rohdaten der spFRET-Experimente mit dem zeitlichen Verlauf von Donor- und Akzeptorintensität. (B) Extrahierte Intensitäts-Zeitspuren einzelner Moleküle. (C) Histogramm von FRET-Effizienzen als ein Beispiel für die Ergebnisse, die aus der Analyse der Intensitätsverläufe gewonnen werden können.

5.1. Extraktion der Intensitätsverläufe einzelner Moleküle

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise zur Extraktion von Intensitätsverläufe aus den aufgenommenen spFRET-Filmen ist durch ein im Arbeitskreis entwickeltes MatLab-Programm (MathWorks Inc.) automatisiert worden.

Aus den aufgenommenen Bildsequenzen mussten zuerst die Donor- und Akzeptorsignale identifiziert werden, die zum selben FRET-Paar gehörten. Hierzu wurde durch die Anwendung einer Polynomfunktion dritter Ordnung ein *mapping*-Muster erstellt, sodass Donor- und Akzeptorkanal auch bei auftretenden Verzerrungen perfekt aufeinander abgebildet werden konnten. Als Vorlage diente ein Bild aus der Mittelung über die ersten 20 bis 50 Aufnahmen eines zu untersuchenden Films. Das erstellte *mapping*-Muster wurde dann für die Datenauswertung aller aufgenommenen Filme der gleichen Messreihe verwendet.

Nur Signale, die über einen wählbaren Schwellenwert lagen, wurden weiter verarbeitet. So konnte zwischen kolokalisierten FRET-Paaren und schwach leuchtenden Schmutzmolekülen, deren breites Emissionsspektrum ebenfalls in beiden Kanälen detektiert wurde, unterschieden werden. Um Fehler durch Intensitätsschwankungen der einzelnen Fluorophore (z. B. Blinkvorgänge) beim Schwellenwertvergleich zu vermeiden, wurde der Schwellenwert mit Signalintensitäten verglichen, die eine Mittelung über die ersten 50 Bilder des Films darstellten. Bevor die Intensitäten der einzelnen Pixel mit dem Schwellenwert verglichen wurden, wurde der lokale Hintergrund, bezogen auf ein größeres Gebiet des 512×512 -Pixel-Bildes,¹ vom Signal abgezogen. Für die Signale, die über den Schwellenwert lagen, wurde der Signalmittelpunkt als lokaler Maximalwert einer quadratische Fläche mit einer Kantenlänge von 7 Pixel bestimmt.

Nach der Ermittlung des Signalmittelpunktes konnte zusätzlich eine weitere Filterung zur Aussonderung von übrig gebliebenen Schmutzpartikeln erfolgen. Hierzu wurde ein Test auf Kreisförmigkeit der Signale durchgeführt. Signale, die den Rand einer kreisförmigen, binären Maske mit einem Durchmesser von 7 Pixel überschritten, wurden ausgesondert. Fluorophoren, die zu nah beieinander lagen und

¹Der lokale Hintergrund wurde als Minimalwert in jedem Feld eines Rasters mit der Einheit von 32×32 Pixel ermittelt und anschließend mit einem 20×20 -Filter homogenisiert.

deshalb nicht getrennt aufgelöst werden konnten, wurden mit diesem Test ebenfalls aussortiert.

Die Fluoreszenzintensitäten, der gefundenen und überprüften Signale der FRET-Paare, wurden für jedes Bild des Films durch die Summierung der Intensitäten über eine 7×7 Pixel große Box um den Mittelpunkt des Signals herum bestimmt. Der mittlere Hintergrund des Signals wurde durch die Summierung der Intensität in einem zwei Pixel breiten Rahmen um die beschriebene 7×7 -Box bestimmt und anschließend durch einen zeitlichen Mittelungsfiler (*uniform smoothing average filter*) über fünf Bilder hinweg geglättet. Signale von benachbarten Fluorophoren, die zumindest teilweise im zwei Pixel breiten Hintergrundrahmen liegen, würden den Hintergrund verfälschen. Um zu vermeiden, dass alle enger benachbarten FRET-Komplexe aussortiert werden müssen, wurde der Hintergrundrahmen in vier Bereiche (oben links, oben rechts, unten links, unten rechts) aufgeteilt. Ergab ein oder mehrere Pixel eines Hintergrundrahmenbereiches einen deutlich höheren Wert als der Minimalwert aller vier Bereiche, so wurde dieser Bereich von der Hintergrundermittlung ausgeschlossen. Der Hintergrund wurde für jedes Bild individuell bestimmt und von der Signalintensität des jeweiligen Bildes abgezogen. Auf diese Weise konnte z. B. nach dem Bleichen des benachbarten Moleküls ein vorher ausgeschlossener Bereich des Hintergrundrahmens wieder in die Hintergrundbestimmung integriert werden. Die Zeitspuren der Donor- und Akzeptorintensitäten ergeben sich aus den getrennt behandelten Intensitäten beider Kanäle.

Neben dem automatisiertem MatLab-Programm stand zusätzlich ein ebenfalls vom Arbeitskreis entwickeltes PvWave-Programm (Visual Numerics Inc.) zur Verfügung. Für eine gezielte Betrachtung einzelner Molekülsignale konnten die Zeitspuren mit diesem Programm manuell ausgelesen werden. Die Vorgehensweise zur Berechnung der Signalintensitäten und ihrer umgebenden Hintergrundsignale war dabei identisch mit dem beschriebenen MatLab-Programm.

5.2. Analyse der Intensitätsverläufe

Die extrahierten Intensitätsverläufe individueller FRET-Paare wurden mit einem selbst geschriebenen PvWave-Programm manuell analysiert. In Abbildung 5.2 ist die Oberfläche dieses Programms und einige der umfangreichen Möglichkeiten zur

Auswertung der Zeitspuren dargestellt.

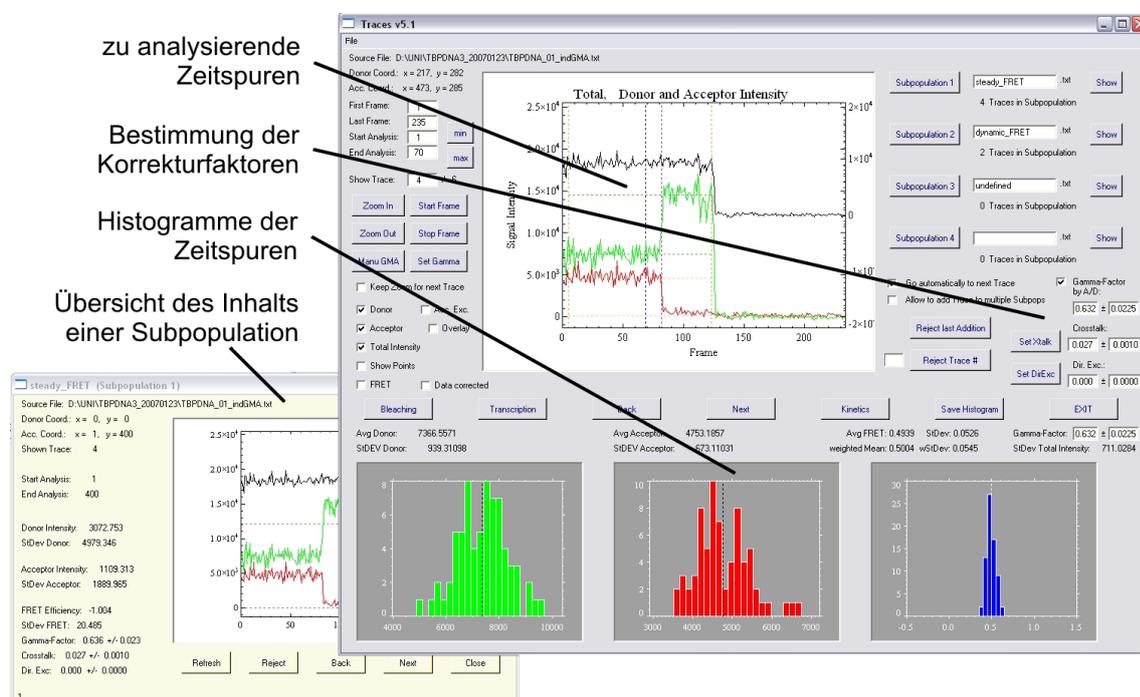


Abbildung 5.2.: Oberfläche des selbst entwickelten PvWave-Programms „Traces v5.1“ zur Analyse der extrahierten Zeitspuren.

Zur Bestimmung der mittleren FRET-Effizienz eines individuellen Donor-Akzeptor-Paares wurde E nach Gleichung 3.26 für jedes Bild des Films bestimmt und bis zum Zeitpunkt des Photobleichens von Donor oder Akzeptor als Mittelwert zusammengefasst. Der entsprechende Abschnitt einer FRET-Zeitspur wurde dabei manuell mit Cursor-aktiven Start- und Stoppwerten durch einfaches Hineinklicken in die Spur festgelegt. Das angezeigte Histogramm aus den Einzelbild-FRET-Werten konnte außerdem separat abgespeichert werden.

Die Bestimmung der in Gleichung 3.26 berücksichtigten Korrekturfaktoren für unterschiedliche Detektionssensitivitäten in Donor- und Akzeptorkanal (γ), spektrales Übersprechen des Donorsignals (β) und Direktanregung des Akzeptors (α) geschah durch die Anwendung des Programms wie schematisch in Abbildung 5.3 dargestellt.

Der γ -Faktor wurde nach der Gleichung

$$\gamma = \frac{\bar{I}_A - \bar{I}'_A}{\bar{I}'_D - \bar{I}_D} = \frac{\Delta I_A}{\Delta I_D} \quad (5.1)$$

aus Zeitspuren einzelner FRET-Paare berechnet, bei denen der Akzeptor vor dem Donor bleichte [104, 114]. \bar{I}_D bzw. \bar{I}_A sind die jeweiligen Mittelwerte der Donor- bzw. Akzeptorintensitäten vor dem Bleichen des Akzeptors und \bar{I}'_D bzw. \bar{I}'_A die Intensitätsmittelwerte nach dem Bleichschritt (Abb. 5.3A). Damit die auf diese Weise ermittelten γ -Faktoren für die Bestimmung der FRET-Effizienz nach Gleichung 3.26 genutzt werden konnten, wurde vor der γ -Berechnung der Anteil des spektralen Übersprechens sowie der Direktanregungsanteil von der Akzeptorintensität abgezogen (vgl. Abschnitt 3.2.2). Zur Überprüfung der γ -Bestimmung wurde der Verlauf der Gesamtintensität mit $I_A + \gamma I_D$ berechnet. Mit einem korrekten γ -Faktor zeigte die Gesamtintensität auch bei sich änderndem Energietransfer (z. B. durch Akzeptorbleichen) einen konstanten Verlauf, wie in Abbildung 5.3A exemplarisch zu erkennen ist. Es wurde zudem versucht, diesen Zusammenhang zwischen γ -Faktor und Gesamtintensität für einen anderen Ansatz der γ -Berechnung zu nutzen, indem der Korrekturfaktor auf eine minimale Standardabweichung der Gesamtintensität optimiert wurde. Diese Art der γ -Bestimmung führte jedoch zu γ -Faktoren, deren Werte stets zu niedrig waren.

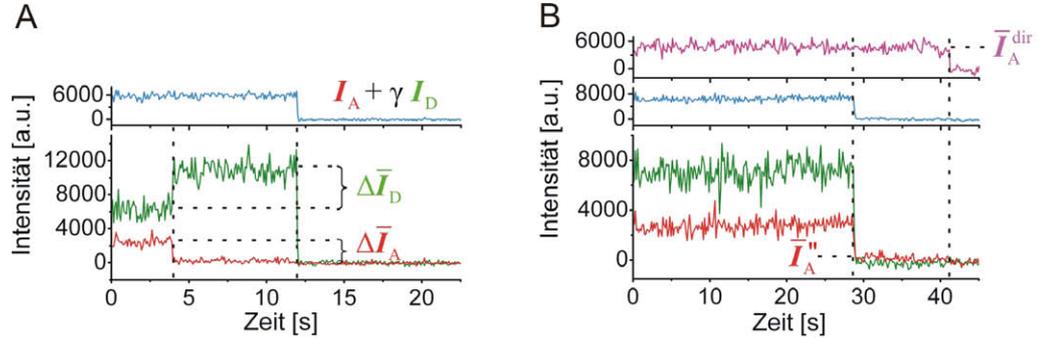


Abbildung 5.3.: Schema zur Bestimmung der Korrekturfaktoren α , β und γ . (A) Zeitliche Intensitätsverläufe eines individuellen FRET-Paares, bei denen der Akzeptor (rot) vor dem Donor (grün) bleicht (zur γ - bzw. β -Berechnung nach Gleichung 5.1 bzw. 5.2). Die Gesamtintensität (blau) weist durch einen korrekt bestimmten γ -Wert keine Stufen beim Bleichen des Akzeptors auf. (B) Zeitspuren aus msALEX-Messungen, bei denen der Donor vor dem Akzeptor bleichte (zur α -Berechnung nach Gleichung 5.3). Der Intensitätsverlauf der Akzeptor-spezifischen Anregung (magenta) diente als Referenzsignal.

Die Abbildung 5.4 zeigt eine Verteilung des γ -Faktors aus den analysierten Zeitspuren von 79 spFRET-Paaren. Die vereinzelt sehr stark vom Mittelwert abweichenden Werte für γ machen deutlich, dass es besser ist, diesen Korrekturfaktor für

jedes spFRET-Paar individuell zu bestimmen. Bei den durchgeführten Experimenten für diese Arbeit bleichte der Akzeptor jedoch nur in seltenen Fällen vor dem Donor. Deshalb wurde der γ -Faktor als Mittelwert aus der globalen Analyse einer ganzen Messreihe bestimmt und entsprechend für die Analyse aller extrahierten Zeitspuren der Messreihe angewandt (vgl. Abschnitt 6.1.4). Für das am häufigsten angewandte FRET-Paar Atto532/Atto647 hatte der γ -Faktor einen Wert von 0,55 ... 0,67.

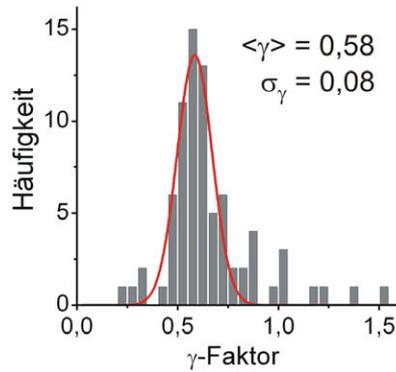


Abbildung 5.4.: Beispiel zur Bestimmung des γ -Faktors aus der globalen Analyse einer ganzen Messreihe.

Die Bestimmung des Korrekturfaktors β für das spektrale Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal wurde vom Analyseprogramm mit den Intensitätsmittelwerten für Donor und Akzeptor nach dem Akzeptorbleichen durchgeführt:

$$\beta = \frac{\bar{I}'_A}{\bar{I}'_D} \quad (5.2)$$

Da auch dieser Faktor aus Intensitäts-Zeitspuren ermittelt wurde, bei denen der Akzeptor vor dem Donor bleichte, wurde β - analog zur γ -Ermittlung - ebenfalls aus der globalen Analyse als Mittelwert bestimmt (vgl. Abschnitt 6.1.4). Der β -Faktor für die durchgeführten Experimente mit dem Donor Atto532 betrug 0,027.

Mit dem α -Faktor wurde der Anteil der Direktanregung des Akzeptors von der extrahierten Akzeptorintensität abgezogen, um eine exakte FRET-Effizienz bestimmen zu können. Zur Ermittlung dieses Faktors wurden Messungen analysiert, bei denen nicht nur der Donor, sondern durch alternierende Anregungswellenlängen auch der Akzeptor direkt angeregt wurden. Diese Beleuchtungsmethode

wird für Anregungsdauern im Millisekunden-Bereich als alternierende Laseranregung (*millisecond alternating laser excitation*, msALEX [140]) und im Nano- oder Picosekunden-Bereich als gepulste alternierende Anregung (*pulsed interleaved excitation*, PIE [141, 142]) bezeichnet. Bei msALEX-Aufnahmen geben somit die Bilder mit ungerader Nummerierung das FRET-Signal wieder und die Bilder mit gerader Nummerierung zeigen das Akzeptorsignal mit spezifischer Anregung. Die zusätzliche Zeitspur der Akzeptor-spezifischen Anregung (I_A^{dir}) dient als Referenz für die ungewollte Akzeptor-Direktanregung bei Intensitätsverläufen, in denen der Donor vor dem Akzeptor bleicht:

$$\alpha = \frac{\bar{I}_A''}{\bar{I}_A^{\text{dir}}}, \quad (5.3)$$

wobei \bar{I}_A'' der Mittelwert der Akzeptorintensität nach dem Bleichen des Donors darstellt. \bar{I}_A^{dir} wiederum ist die mittlere Emissionsintensität bei Akzeptor-spezifischer Anregung nach dem Donor-Bleichen (Abb. 5.3B). Da zur Bestimmung des α -Faktors ein Referenzsignal des Akzeptors benötigt wird, ist dieser Korrekturfaktor generell vom Verhältnis der eingesetzten Anregungsleistungen für Donor und Akzeptor abhängig. Für die durchgeführten Experimente mit Atto647 wurde ein Korrekturwert zur Akzeptor-Direktanregung von 0,037 bestimmt (vgl. Abschnitt 6.1.4).

Da für die Berechnung von γ und β anhand einzelner Moleküle Zeitspuren benötigt werden, bei denen der Akzeptor zuerst bleicht, die α -Bestimmung, aber nur mit Verläufen durchführbar ist, bei denen wiederum der Donor zuerst bleicht, ist eine vollständige Beschreibung aller Korrekturfaktoren an einem einzigen Molekül nicht möglich.

Mit dem beschriebenen PvWave-Programm konnten die automatisch extrahierten Zeitspuren während der anschließenden Analyse in vier unterschiedlichen Subpopulationen gespeichert werden (Abb. 5.2). So konnten Statistiken über unterschiedliches Verhalten der einzelnen FRET-Paare, z. B. zeitlich konstanter/dynamischer Energietransfer, Bleichverhalten, usw., erstellt werden. Neben den Zeitspuren der verschiedenen Intensitätssignale und des berechneten FRET-Verlaufs wurden dabei sämtliche zur FRET-Bestimmung verwendeten Parameter abgespeichert. Umfang-

reiche Möglichkeiten zur Inhaltskorrektur der Subpopulationen sowie zur Sichtung der sortierten Daten in separaten Programmfenstern komplettierten das entwickelte Trace-Analyseprogramm. Die empirisch gefundene Grenze des PvWave-Programms bezüglich der maximal einlesbaren Anzahl an extrahierten Zeitspuren lag bei 230 Molekülen.

6. spFRET-Untersuchungen der TBP-NC2-Mobilität entlang der DNA

In Abschnitt 2.5.3 wurde erläutert, dass jüngste Ergebnisse biochemischer Untersuchungen ein neues Bild des Mechanismus der DNA-Transkriptionseinhibition durch den Negativen Cofaktor 2 aufzeigen. Es wird angenommen, dass die Bindung von NC2 an den TBP-DNA-Komplex zur Delokalisierung des TATA-Box bindenden Proteins entlang des DNA-Stranges führt.

Mit der vorgestellten Prisma-TIRFM-Apparatur wurden *in vitro* Einzelmolekül-Experimente am TBP-DNA-NC2-Probensystem durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen. Durch spFRET-Untersuchungen konnte an individuellen Komplexen die Wirkung der NC2-Präsenz auf molekularer Ebene direkt beobachtet werden.

Im Folgenden werden die verschiedenen Einzelmolekül-Messungen und ihre Ergebnisse präsentiert. Zur Verifizierung der Untersuchungsergebnisse werden anschließend die durchgeführten Kontrollexperimente beschrieben. Eine Diskussion der zusammenhängenden Ergebnisse schließt dieses Kapitel ab.

6.1. Nachweis der TBP-Mobilisierung

In Kooperation mit Prof. Dr. Michael Meisterernst und seinen Mitarbeitern vom GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München wurde zum Nachweis der TBP-Mobilisierung durch NC2-Bindung ein spFRET-Experiment für *in vitro*-Prisma-TIRFM-Untersuchungen entwickelt, dessen Ablauf in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt ist. Für die Untersuchungen wurde das TBP mit einem FRET-Donor markiert. Am DNA-Strang, dessen Basensequenz einem TATA-Box-

enthaltenden Promotor entspricht, wurde ein FRET-Akzeptor in der Nähe der TATA-Box positioniert.

Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, ist die Effizienz E des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers sehr stark vom Abstand R zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor abhängig ($E \sim R^{-6}$). Eine mögliche TBP-Bewegung aufgrund der NC2-Komplexierung sollte somit am Verlauf einer *spFRET*-Zeitspur erkennbar sein, da sich der Donor-Akzeptor-Abstand mit einer Mobilisierung von TBP ändert. Ohne die Präsenz von NC2 sollte ein Komplex aus Donor-TBP und Akzeptor-DNA bei der Anregung des Donors eine zeitlich konstante FRET-Effizienz aufweisen (Abb. 6.1 links). Bei Zugabe von NC2 wird hingegen erwartet, dass sich der FRET-Wert im zeitlichen Verlauf dynamisch ändert, wenn der TBP-NC2-Komplex tatsächlich eine Bewegung entlang des DNA-Stranges durchführt (Abb. 6.1 rechts). Weniger oder gar kein FRET-Signal sollte detektierbar sein, wenn der gebildete TBP-NC2-Komplex vom Akzeptor weg gewandert ist. Auf der anderen Seite sollte der Energietransfer im Vergleich zum Zeitpunkt vor der NC2-Bindung höher sein, wenn sich TBP-NC2 näher am Akzeptor befindet.

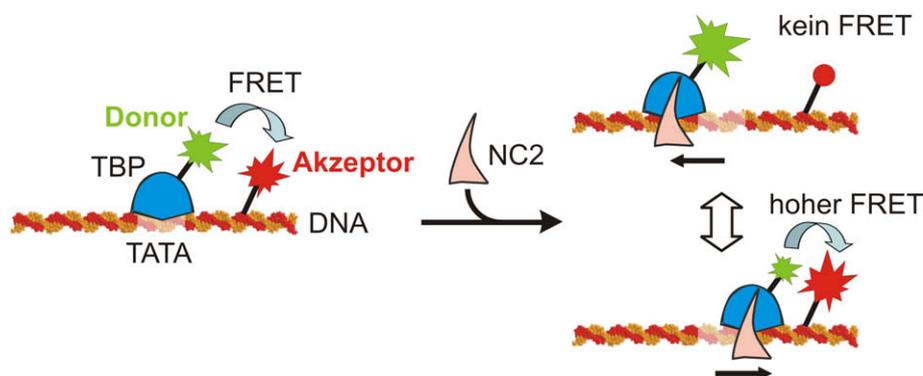


Abbildung 6.1.: Schematische Darstellung des *spFRET*-Experiments zur Untersuchung der TBP-Mobilisierung. Der gebildete Komplex aus Donor-markiertem TBP und Akzeptor-markierter DNA führt zu einem zeitlich konstanten Wert der FRET-Effizienz. Nach Bindung von NC2 sollte sich der FRET-Verlauf jedoch dynamisch ändern, wenn sich der TBP-NC2-Komplex tatsächlich entlang des DNA-Stranges bewegen kann. (Die DNA-Beugung wurde zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet.)

6.1.1. Das biologische Probensystem

Untersucht wurde die TBP-Mobilisierung am TATA-Box-Bindeprotein der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (yTBP). Trotz der in Abschnitt 2.4 beschriebenen Unterschiede zwischen humanem und Hefe-TBP bezüglich Kinetik, DNA-Bindungsfestigkeit und DNA-Beugungsstärke [63], sind die TATA-Box-Bindeproteine beider Spezies in ihrer Struktur und im mechanistischen Verhalten identisch [143]. Somit kann als Mobilisierungsfaktor humanes NC2 eingesetzt werden, das auf yTBP-DNA die gleiche Wirkung hat wie auf DNA-Komplexe mit humanem TBP [83].

Um eine gut definierte Markierungsposition des Donor-Farbstoffes zu erreichen, wurde für die spFRET-Messungen eine spezielle *single cysteine*-Mutante von yTBP eingesetzt, die nur ein einziges Cystein beinhaltet und freundlicherweise von P. A. Weil (Vanderbilt University) zur Verfügung gestellt wurde [144]. In der TBP-Mutante sind die zwei endogen vorkommenden Cysteine (Cys78 und Cys164) durch die Aminosäure Alanin ersetzt worden. Das Serin an Position 61 hingegen wurde durch ein Cystein ersetzt. An dieser Position der exprimierten Proteine konnte über die Thiolgruppe des Cysteins der Maleimid-aktivierte Fluoreszenzfarbstoff Atto532 als FRET-Donor kovalent gebunden werden (Abb. 6.2). Die Durchführung der Verknüpfungsreaktion des Atto532-Maleimids an TBP ist in Anhang D detailliert beschrieben. Es wurde durch P. A. Weil und seinen Mitarbeitern gezeigt, dass die biochemische Aktivität dieser TBP-Mutante auch durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff nicht herabgesetzt wird [145]. Gleiches wurde für das hier verwendete und selbst markierte yTBP durch Kontrollexperimente (*electrophoretic mobility shift assays*) von Meisterernst und seinen Mitarbeitern bestätigt.

Als DNA-Strang des Probenkomplexes wurde eine 70 bp lange Sequenz des AdML-Promotors [49, 50] eingesetzt. Der Sequenzausschnitt dieses starken und gut untersuchten Promotors wurde so gewählt, dass die TATA-Box in der Mitte des Oligomers liegt. Die Basensequenz der DNA ist als „DNA I“ in der Abbildung E.1A im Anhang dieser Arbeit wiedergegeben. Die DNA wurde nicht selber synthetisiert, sondern bereits mit dem FRET-Akzeptor Atto647 markiert in einzelsträngiger Form von der IBA GmbH bezogen und anschließend selber zum fertigen Doppelstrang zusammengeschweißt. Das Fluorophor wurde elf Basenpaare stromaufwärts von TATA positioniert (Abb. 6.2). Zur Möglichkeit der Immobilisierung des Proben-

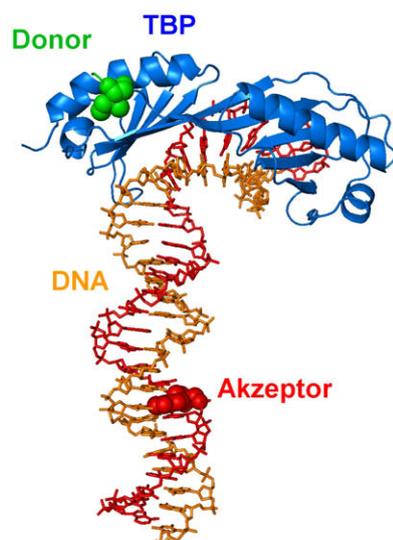


Abbildung 6.2.: Position des FRET-Donors und -Akzeptors in der Röntgenkristallstruktur des TBP-DNA-Komplexes (von Alfred Lammens modifizierte PDB-Datei 1RM1). Am TBP wurde das mit 532 nm anzuregende Atto532 als Donor an das sphärisch und grün dargestellte Cystein gebunden. Als Akzeptor wurde das mit 633 nm anregbare Atto647 an die sphärisch und rot dargestellte Thymin-Base der DNA positioniert.

komplexes (vgl. folgenden Abschnitt 6.1.2) befand sich am 3'-Ende des codierenden Stranges zusätzlich ein Biotin-Molekül. Die Abbildung 6.2 zeigt die beschriebenen Positionen des FRET-Donors und FRET-Akzeptors im TBP-DNA-Komplex an einer Röntgenkristallstruktur. Das Oligomer in dieser Struktur wurde mit der Hilfe von Alfred Lammens (AG Prof. Dr. Hopfner) als B-Form-DNA verlängert.

Ideale Fluoreszenz-Farbstoffe für *spFRET*-Untersuchungen sollten besonders photostabil sein, damit sie lange beobachtet werden können. Sie sollten hell sein, d. h. eine hohe Lichtabsorption durchführen können und eine hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute aufweisen. Ihre Fluoreszenzemission darf keine großen Intensitätsfluktuationen zeigen, da diese die Untersuchungen dynamischer Prozesse verfälschen würden. Außerdem sollten die Farbstoffe eine geringe molekulare Masse haben, um das natürliche Verhalten des markierten Biomoleküls so wenig wie möglich zu beeinflussen [100]. Das verwendete *spFRET*-Paar Atto532/Atto647 (Atto-Tec GmbH) erfüllt all diese Kriterien. Im Vergleich zu anderen Farbstoffen sind die Atto-Farbstoffe durch ihre relativ hohe Photostabilität in Verbindung mit ihrer starken Helligkeit ($\epsilon_{\max} = 115.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\Phi_{\text{F}} = 90\%$ für Atto532

sowie $\varepsilon_{\max} = 120.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\Phi_{\text{F}} = 20\%$ für Atto647) für die geplanten spFRET-Messungen besonders gut geeignet. Die Photostabilität dieser Fluoreszenzfarbstoffe in wässriger Lösung ist dabei nicht vom Einsatz von Sauerstoffängern abhängig. Außerdem zeigen sie eine sehr geringe Tendenz zur Besetzung des Triplett-Zustandes, d. h. ein Blinken im Emissionssignal wird nur selten beobachtet. Der Förster-Radius des Atto532/Atto647-Paares beträgt 60 \AA (Angabe des Herstellers).

Um die Experimente mit einer streng definierten TBP-DNA-Konformation beginnen zu können, wurde das rekombinant hergestellte Hefehomolog zu TFIIA, TOA, eingesetzt. Genau wie TFIIA bindet TOA an den TBP-DNA-Komplex [143] und stabilisiert die TBP-Bindungsorientierung, die auch in der Kristallstruktur zu erkennen ist [73] (Abschnitt 2.4.3). Die Komplexierung mit TOA führt somit zu einer TBP-DNA-Bindung, bei der nur eine Komplexkonformation möglich ist. Aus diesem Grund wurden die TBP-DNA-Komplexbildungen vor der Zugabe von NC2 mit einer TOA-Vorinkubation durchgeführt. Die Notwendigkeit dieser Vorinkubation wird im Abschnitt 6.2.1 gezeigt. Das gebundene TOA besetzt im TBP-DNA-Komplex strukturelle Anteile der NC2-Bindungsstellen (Abb. 2.10). Wird NC2 in einer stöchiometrischen Konzentration zugegeben, verdrängt es das TOA aus dem TBP-DNA-Komplex [83].

6.1.2. Anpassung der Flusskammer

Die vorgestellte Strategie der spFRET-Experimente basiert auf der Detektion von Änderungen im FRET-Verlauf. Um auch geringe Veränderungen im Energietransfer zwischen den einzelnen Donor- und Akzeptor-Fluorophoren deutlich erkennen zu können, wird das *in vitro*-Experiment mittels ultra-sensitiver Prisma-TIRF-Mikroskopie durchgeführt. Bei der Anwendung dieser Mikroskopiemethode müssen jedoch die zu untersuchenden Probenkomplexe auf der Unterseite des Prismas immobilisiert werden, wo die FRET-Fluorophore durch das evaneszente Feld der internen Totalreflexion angeregt werden.

Die Abbildung 6.3 zeigt eine schematische Darstellung der durchgeführten Probenimmobilisierung. Hierzu wurde die starke Wechselwirkung zwischen Biotin und dem Protein Streptavidin ausgenutzt ($K_{\text{D}} = 10^{-15} \text{ M}$). Streptavidin weist vier aktive Biotin-Bindungsstellen auf, wodurch die Probe mit der Bildung einer Biotin-Streptavidin-Biotin-Kopplung an der Oberfläche gebunden werden kann [100]. Der

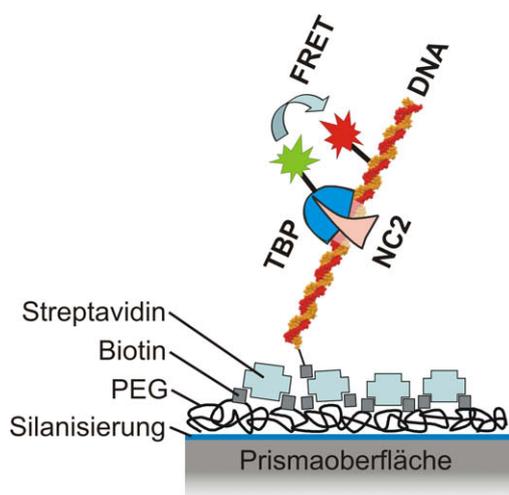


Abbildung 6.3.: Schematische Darstellung der Immobilisierung des TBP-DNA-NC2-Komplexes an der Prismaoberfläche. Um eine unspezifische Adsorption der Probenmoleküle auf der Oberfläche zu vermeiden, wurde sie silanisiert und mit einer hohen Konzentration von PEG beschichtet. Die spezifische Bindung der Probe findet über eine Biotin-Streptavidin-Biotin-Kopplung statt.

verwendete Probenkomplex wurde dabei über das Biotin des DNA-Stranges am Streptavidin gebunden. Das Streptavidin wiederum kann auf verschiedene Arten auf der Quarzoberfläche des Prismas fixiert werden.

Bovinseryalbumin (BSA) z. B. besitzt eine hohe unspezifische Affinität zu den meisten Oberflächen. Über diese Oberflächenaffinität konnte Biotin-markiertes BSA auf das Prisma aufgebracht werden, sodass anschließend die Immobilisierung des Streptavidins auf der Oberfläche möglich wurde. Nach der BSA-Streptavidin-Verbindung konnte dann die DNA auf dem Prisma fixiert werden. Ein Problem dieser Vorgehensweise stellte die ebenfalls sehr hohe Tendenz von TBP zur unspezifischen Adsorption an Oberflächen dar. Durch Inselbildungen von BSA bei der Bindung auf die Prismaoberfläche (eigene Beobachtung) wurde TBP an die noch freiliegenden Stellen des Prismas unspezifisch adsorbiert, ohne einen Komplex mit der Proben-DNA zu bilden.

Um das Problem des TBP-Affinitätsverhaltens zu lösen, wurde die Prismaunterseite durch die Beschichtung mit langkettigen Polymeren aus Polyethylenglycol (PEG) passiviert [111]. Für eine kovalente und homogen verteilte Oberflächenbindung von PEG wurde die Quarzoberfläche zuerst mit einer Aminosilan-Verbindung (Vectabond, Vector Labs) silanisiert. An den Aminogruppen wurden

anschließend die N-Hydroxysuccinimidylester-aktivierten PEG-Moleküle (M-PEG-SPA, $M_r = 5000$, Nektar Therapeutics) gebunden. Es wurde jedoch festgestellt, dass zur erfolgreichen Abblockung des TBP von der Oberfläche eine sehr dichte PEG-Schicht notwendig ist. Die PEG-Beschichtung musste deshalb mit einer besonders hoch konzentrierten PEG-Lösung (45 % (m/v)) durchgeführt werden. Prismaoberflächen mit PEG-Beschichtungen aus 10, 20 oder 30 % (m/v) zeigten keinen ausreichenden Abblockungseffekt gegen die unspezifische TBP-Bindung.

Zur Probenimmobilisierung via Biotin-Streptavidin-Biotin-Kopplung, wurden 2 % (m/m) des PEG als bifunktionalisiertes Polymer eingesetzt, an deren oberflächenabgewandten Enden zusätzlich ein Biotin-Molekül gebunden ist (biotin-PEG-NHS, $M_r = 3400$, Nektar Therapeutics). Eine ausführliche Beschreibung zum Bau der kompletten Flusskammer sowie zur Wiederverwertung der silanisieren und PEG-beschichteten Quarzprismen findet sich in Anhang A.

Im Gegensatz zu TBP zeigte NC2 keine Tendenz zur unspezifischen Oberflächenadsorption. Bei der geplanten NC2-Zugabe mit dem Flusssystem der Messapparatur kam es deshalb nicht zu einem verfälschenden Konzentrationsverlust von NC2 durch Adsorptionseffekte.

6.1.3. Probenvorbereitung

Für die geplanten spFRET-Messungen wird ein sehr hohes Signal/Hintergrund-Verhältnis benötigt, um auch geringe Änderungen im FRET-Verlauf identifizieren zu können. Der Silanisierungsprozess sowie die Beschichtung durch PEG mussten jedoch mit Reagenzien durchgeführt werden, die nicht absolut frei von fluoreszierendem Schmutz gewesen sind. Diese Schmutzpartikel wiesen allerdings keine hohe Photostabilität auf. Zu Beginn einer Messreihe wurde der vorhandene Schmutz auf der Prismaunterseite einer neuen Flusskammer deshalb vor der Probenbeschickung photogeblickt ($> 5 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$, 532 nm für 15 s pro Prismaposition). Mit Hilfe des motorisierten Aktuators am Kreuztisch konnte während des Bleichvorganges der gesamte Bereich einer Flusskammer automatisch durchgefahren werden. Entlang der gebleichten Strecke von 11 mm konnten anschließend bis zu ca. 60 Aufnahmen an unterschiedlichen Positionen auf der Prismaoberfläche durchgeführt werden.

Nach dem Bleichprozess wurde die Flusskammer mit einer Streptavidin-Lösung (0,3 mg/mL in PBS-Puffer, pH 7,4) beschickt und für mindestens 15 min inku-

biert, sodass eine vollständige Sättigung der Biotin-PEG-beschichteten Prismaoberfläche durch Streptavidin erreicht wurde. Nicht gebundenes Streptavidin wurde mit Arbeitspuffer gewaschen.¹

Zur Bildung des TBP-DNA-Komplexes wurde eine Mischung aus 5 – 10 nM TBP, 20 nM TOA und 10 nM DNA in Arbeitspuffer für 15 – 30 min bei 28 °C vorinkubiert. Für eine hohe Ausbeute an Komplexen, die aus allen drei Bindungspartnern bestehen, wurde die DNA-Lösung als letzte Komponente zur Mischung gegeben. So wurde eine frühe Bindung von TBP oder TOA alleine an die DNA vermieden. Die gewählten Konzentrationen zur Probenvorinkubation nahe der Dissoziationskonstante des Komplexes ($K_D = 2$ nM) sowie das molekulare [TBP : DNA]-Verhältnis von [0,5...1 : 1] verhinderten eine Mehrfachbindung von TBP an die DNA.

Direkt vor der Probenbeschickung der Flusskammer wurde die TBP-DNA-TOA-Lösung mit Arbeitspuffer auf 20 – 50 pM verdünnt. Um eine Fluorophor-Kontamination in den Schläuchen und Ventilen des Flusssystems durch adsorbiertes TPB zu vermeiden, wurde die Probe über eine Pipette direkt in die Flusskammer gegeben. Der Probenraum wurde mit dem TBP-DNA-Komplex für 5 min inkubiert. Nicht gebundene Probenkomplexe wurden anschließend mit Arbeitspuffer aus der Flusskammer gespült.

6.1.4. Experimentelle Durchführung und Bestimmung der Korrekturfaktoren

Die *spFRET*-Messungen wurden mit einer Leistungsdichte der Donor-Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 523$ nm) von 350 – 670 nW/ μm^2 durchgeführt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals geschah mit einem Wasserimmersions-Objektiv (60 \times , NA 1,2, Nikon). Die in diesem Unterabschnitt diskutierten Messungen wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 30, 75 oder, im Falle von msALEX-Messungen, 80 ms/Bild aufgenommen. Unter den beschriebenen Messbedingungen endeten - aufgrund des Photobleichens von Donor oder Akzeptor - fast alle durch FRET entstandenen Akzeptorsignale innerhalb der ersten 30 s (400 Bilder) bzw. 60 s (400 Bilder bei msALEX-Anregung) einer Messung. Aus den aufgenommenen Filmen wurden in der bereits

¹Dieses Puffersystem wurde speziell für die Komplexbildung von TBP, DNA und NC2 optimiert: 12 mM Tris-HCl pH 7,3, 60 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 25 mM Hepes-KOH pH 8,2, 12 % Glycerin, 0,25 mg/mL BSA, 0,6 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF und 0,025 % NP-40.

beschriebenen Weise (Kapitel 5) die Zeitspuren der Fluoreszenzintensitäten von den individuellen FRET-Paaren extrahiert und anschließend analysiert.

Die Bestimmung der FRET-Korrekturfaktoren α , β und γ wurde an den individuellen Fluoreszenzintensitätsverläufen der FRET-Paare durchgeführt. Bei den meisten Komplexen photobleichte der FRET-Donor vor dem Akzeptor (z. B. Abb. 6.5A). Nur bei ca. 10 % aller untersuchten Komplexe bleichte der Akzeptor vor dem Donor (z. B. Abb. 6.5B). Die Ermittlung des γ -Faktors zur Korrektur der Kanalabhängigen Detektionssensitivität konnte somit nicht für jedes FRET-Paar individuell durchgeführt werden (vgl. Abschnitt 5.2). Der γ -Faktor wurde deshalb als Mittelwert einer statistischen Gauß-Verteilung bestimmt, welche die besagten 10 % der für γ auswertbaren, konstanten Zeitspuren beinhaltete. Der auf diese Weise ermittelte Korrekturfaktor wurde anschließend für die Auswertung aller Zeitspuren einer Messreihe (Aufnahmen vor, während und nach der Zugabe von NC2 - insgesamt bis zu 60 Messungen) angewandt.

Die Abbildung 6.4A zeigt exemplarisch das Histogramm aus 79 FRET-Komplexen zur γ -Bestimmung der Messreihe. Die teilweise starken Abweichungen einzelner γ -Werte vom Mittelwert der Verteilung sind durch die molekular variierenden Quantenausbeuten der Fluorophore zu erklären. Diese Variationen können durch Änderungen der Fluorophor-Umgebung oder durch Änderungen in der Struktur des Fluorophors entstehen. Eine zusätzliche Verbreiterung der γ -Verteilung ist durch Messungen zu erwarten, bei denen zur Detektion des Fluoreszenzsignals keine perfekte Fokussierung auf die Prismaunterseite erfolgte, was zu einer Verschiebung des Intensitätsverhältnisses zwischen Donor- und Akzeptorkanal führen kann.

Die bestimmten Mittelwerte der γ -Faktoren für die Messreihen der hier diskutierten TBP-DNA-TOA/NC2-Probe lagen zwischen 0,55 und 0,67. Die Schwankungen zwischen den verschiedenen Messreihen sind vor allem auf eine nicht immer optimal erreichte Einstellung der Deckglaskorrektur am Objektiv zurückzuführen. Die Detektionseffizienz ist dann für die zwei spektral getrennten Kanäle unterschiedlich, was wiederum zu verschiedenen γ -Werten zwischen den Messreihen führt. Da für jede Messreihe eine neue Flusskammer (mit unterschiedlicher Deckglasdicke) eingesetzt wurde, wurde γ für jede Messreihe neu bestimmt.

Die Bestimmung des β -Faktors zur FRET-Korrektur des spektralen Übersprechens vom Donorsignal in den Akzeptorkanal wurde analog zur be-

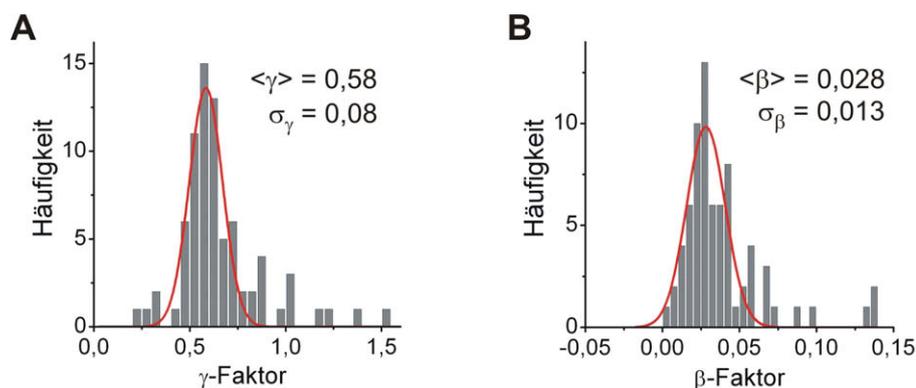


Abbildung 6.4.: Exemplarische Darstellung der γ - und β -Bestimmung. Die Korrekturfaktoren für eine Messreihe ergeben sich aus der Analyse der Histogramme, welche die Einzelwerte der individuellen Auswertungen von spFRET-Komplexen zusammenfassen. (A) Histogramm aus 79 individuell ermittelten γ -Faktoren einer Messreihe. (B) Histogramm aus 72 individuell ermittelten β -Faktoren einer Messreihe.

schriebenen γ -Bestimmung durchgeführt. Ein exemplarisches Histogramm aus 72 FRET-Komplexen einer Messreihe ist in Abbildung 6.4B dargestellt. Die Mittelwerte dieses Korrekturfaktors lagen für fünf verschiedene Messreihen zwischen 0,025 und 0,032. Aufgrund der geringen Schwankungen dieser Mittelwerte wurde der β -Faktor für alle Messungen mit Atto532-markiertem TBP zum Mittelwert von 0,027 zusammengefasst. Wegen des nur sehr kleinen Beitrags von β wurde das spektrale Übersprechen des Donors nur für quantitative Auswertungen berücksichtigt. Für qualitative Aussagen wurde der β -Faktor vernachlässigt.

Zur FRET-Korrektur der Akzeptor-Direktanregung wurde versucht, den Wert des α -Faktors aus den individuellen Zeitspuren durch msALEX-Messungen zu bestimmen (vgl. Abschnitt 5.2). Unglücklicherweise stellte sich heraus, dass die zwei verschiedenen Anregungslinien (532 nm zur Donor-, 633 nm zur Akzeptoranregung) beim Eintritt ins Prisma der TIRFM-Flusskammer so unterschiedlich gebrochen wurden, dass die Positionen der Anregungsmittelpunkte auf der mit interner Totalreflexion beleuchteten Probenfläche ca. 30 μm auseinanderlagen. Dadurch konnte keine Ausleuchtung erreicht werden, die gleichzeitig homogen für beide Kanäle gewesen wäre. Eine optimale Ausleuchtung mit der Akzeptor-spezifischen Anregung zur alternierenden Aufnahme eines Referenzsignals, wie es zur Bestimmung des α -Faktors benötigt wird, war somit nicht durchführbar. Die α -Bestimmung bei einer solch inhomogenen Verteilung des Intensitätsverhältnisses zwischen Donor-

und Akzeptor-Anregung wäre nur durch eine ortsabhängige Zuordnung des Referenzsignals möglich gewesen.

In den durchgeführten Messungen wurden zur msALEX-Anregung identische Leistungsdichten für beide Anregungslinien eingestellt. Aus der Analyse von einigen FRET-Komplexen, die sich zwischen den verschiedenen Anregungsmittelpunkten beider Kanäle befanden (was einer annähernd gleichen Leistungsdichte für Donor und Akzeptor entspricht) wurde ein mittlerer Wert des α -Faktors von 0,037 ermittelt. Aufgrund der Tatsache, dass msALEX-Messungen durch das beschriebene Shutterssystem (Abschnitt 4.2.1) die zeitliche Auflösung einer Messung einschränken, der ermittelte α -Faktor für das Probensystem nur einen kleinen Beitrag an der FRET-Effizienz ausmacht und in den geplanten spFRET-Untersuchungen nur die *Änderungen* der FRET-Effizienzen (und nicht deren absoluten Werte) relevant sind, wurde der Beitrag der Akzeptor-Direktanregung bei den Auswertungen vernachlässigt.

6.1.5. Konstanter Energietransfer beim TBP-DNA-Komplex

Zwei typische Signalverläufe der ausgewerteten Messungen von einzelnen TBP-DNA-TOA-Komplexen vor der Zugabe von NC2 sind in Abbildung 6.5 dargestellt. Die zeitlichen Verläufe der FRET-Effizienzen wurden mit den ermittelten Werten für γ und β korrigiert und sind über den gesamten Zeitraum der Belichtung bis zum Photobleichen des Akzeptors (Abb. 6.5A) bzw. Donors (Abb. 6.5B) konstant. Sie weisen einen mittleren Wert von $\sim 40\%$ bzw. $\sim 45\%$ auf. Die magenta-farbig eingezeichnete Region im FRET-Diagramm (32,5 - 50 %) gibt den typischen Bereich der zeitlich gemittelten FRET-Effizienzen stabiler Probenkomplexe für alle durchgeführten Messreihen wieder.

Von allen TBP-DNA-Komplexen, die ein klares FRET-Signal aufwiesen, zeigten 93 % eine zeitlich konstante FRET-Effizienz vor der NC2-Zugabe. Dieses konstante Verhalten des FRET-Signals konnte ebenfalls nach Anschluss des Flusssystems an den Probenraum sowie während einer Spülung mit Arbeitspuffer (Strömungsgeschwindigkeit 2 mL/min) beobachtet werden.

In Abbildung 6.6 sind die FRET-Mittelwerte von 631 TBP-DNA-TOA-Komplexen einer Messreihe als Histogramm zusammenfasst. Es gibt ein deutliches

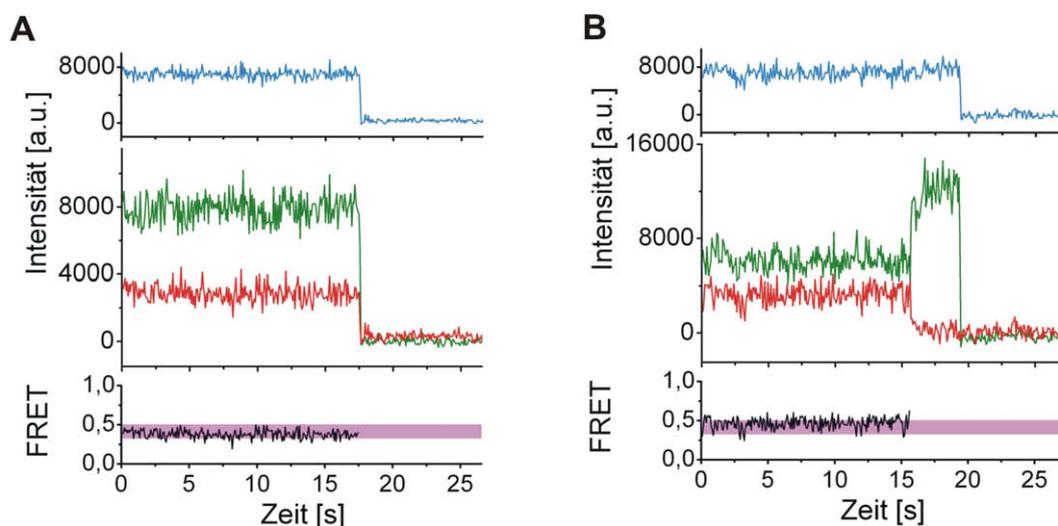


Abbildung 6.5.: Typische Zeitverläufe der Fluoreszenzintensität von TBP-DNA-TOA-Komplexen vor der Zugabe von NC2 (75 ms/Bild). Es sind die Zeitspuren von Donor- und Akzeptor-Signal (I_D , grün und I_A , rot), die daraus berechneten FRET-Effizienzen E (nach Gleichung 3.26, schwarz) sowie die Gesamtintensitäten ($I_A + \gamma I_D$, blau) der einzelnen Komplexe eingetragen. Die FRET-Verläufe der TBP-DNA-Komplexe sind zeitlich konstant und liegen typischerweise bei $\sim 40\%$ (Bereich in magenta: 32,5 - 50%). (A) In den meisten Fällen bleicht der Donor vor dem Akzeptor-Fluorophor. (B) Nur bei ca. 10% aller FRET-Komplexe bleicht der Akzeptor vor dem Donor-Fluorophor. (Der verwendete γ -Faktor betrug 0,58 für (A) und 0,61 für (B).)

Hauptmaximum bei einer FRET-Effizienz von 40%. Ein viel kleineres Nebenmaximum, das nur 16% der Gesamtverteilung ausmacht, liegt bei einer FRET-Effizienz von 21%. Die schmale Verteilung des Histogramms deutet auf eine streng definierte Bindungskonformation von TBP und TOA auf der DNA hin.

Der Abstand zwischen den Markierungspositionen von Donor- und Akzeptor-Fluorophor kann näherungsweise aus der TBP-DNA-Kristallstruktur (PDB-Datei 1RM1) bestimmt werden und beträgt einen Wert von $\sim 60 \text{ \AA}$ (vgl. Abb. 6.18). Dieser Wert stimmt mit dem Abstand von 64 \AA überein, der nach Gleichung 3.20 für $E = 0,40$ berechnet wurde². Das 40%-Maximum des FRET-Histogramms stellt somit das konstante FRET-Signal dar, das von der bekannten TBP-DNA-Struktur erwartet wird. Die Herkunft der schwächeren 21%-Population konnte hingegen

²Die Verbindungsmoleküle zwischen Fluorophor und Biomolekül, verlängern den Donor-Akzeptor-Abstand zusätzlich. Der aus den FRET-Daten ermittelte Abstand ist etwas größer als der Abstand aus der Kristallstruktur, weil bei der durchgeführten Näherung mit der Kristallstruktur diese Verlängerung, nicht berücksichtigt wurde.

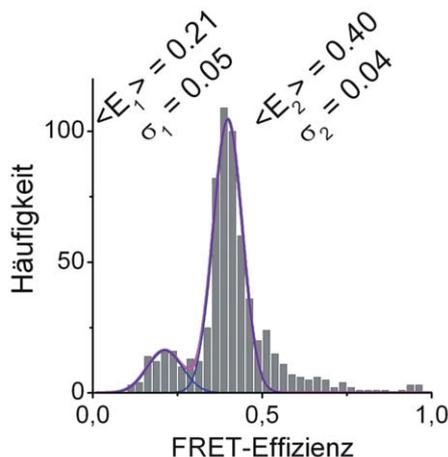


Abbildung 6.6.: Histogramm über die Mittelwerte zeitlich konstanter FRET-Effizienzen von 631 stabilen TBP-DNA-TOA-Komplexen einer Messreihe vor der Zugabe von NC2.

noch nicht vollständig geklärt werden. Eine alternative TBP-Bindungsorientierung auf der DNA als mögliche Ursache für das Nebenmaximum konnte ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 6.2.1). Verantwortlich für das Nebenmaximum könnte jedoch eine zweite stabile DNA-Bindungsstelle des TBP stromabwärts in der AdML-Promotorsequenz oder eine alternative TBP-DNA-Bindungskonformation sein.

6.1.6. Dynamischer FRET-Verlauf nach NC2-Zugabe

Nach 20 bis 30 min wurde mit Hilfe des automatisierten Flusssystems während einer Messung NC2 zur TBP-DNA-Probe gegeben. Innerhalb von 10s wurde das 6 μ L große Volumen des Probenraumes mit 333 μ L einer 8 nM NC2-Arbeitspuffer-Lösung und einer Strömungsgeschwindigkeit von 2 mL/min gespült. Die Flusskammer wurde anschließend 5 min mit der NC2-Lösung inkubiert. In der Abbildung 6.7 ist ein repräsentativer FRET-Verlauf eines einzelnen TBP-DNA-Komplexes während der NC2-Zugabe aufgetragen. Zu Beginn der Messung zeigt das FRET-Signal den bekannt konstanten Wert von $\sim 40\%$. Bei der Bindung von NC2 an TBP-DNA geht der konstante Verlauf in ein sehr dynamisches Signal über, das schnell zwischen verschiedenen FRET-Werten fluktuiert, bis die Fluorophore schließlich bleichen. In den aufgenommenen Filmen dieser Messungen ist die Dynamik als ein anitkorreliertes Schwanken der Fluoreszenzintensitäten in den beiden Detektionskanäle deutlich zu beobachten (siehe Donor- und Akzeptorsignal in Abb. 6.7). Das dynamische FRET-

6. *sp*FRET-Untersuchungen der TBP-NC2-Mobilität entlang der DNA

Signal fluktuiert zwischen Effizienzen von $\sim 40\%$ (magenta-farbige Region) und $\sim 80\%$ (gelbe Region). FRET-Werte zwischen diesen beiden Bereichen sind nur selten zu beobachten.

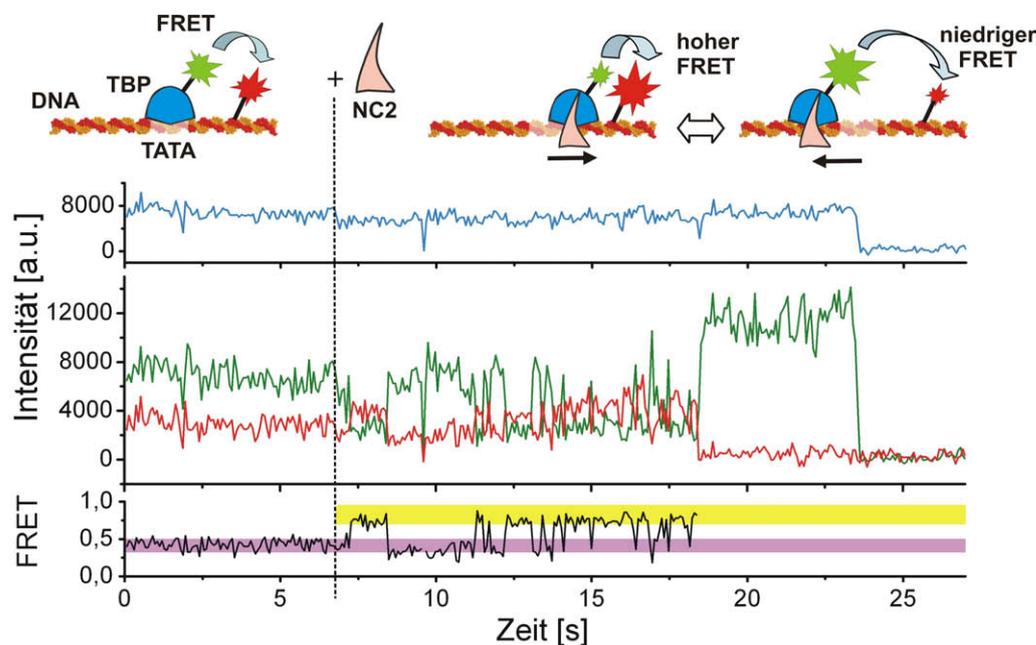


Abbildung 6.7.: Typischer FRET-Verlauf während der NC2-Zugabe durch das Flusssystem (75 ms/Bild). Das konstante FRET-Signal des TBP-DNA-Komplexes wird nach der Bindung von NC2 dynamisch und fluktuiert schnell zwischen unterschiedlichen FRET-Werten. Hervorgehoben sind die FRET-Bereiche 32,5 - 50 % (magenta) und 70 - 95 % (gelb). Die Interpretation des FRET-Verlaufs ist anschaulich in Bildern über dem Diagramm dargestellt.

Der Übergang von einem konstanten zu einem dynamischen FRET-Signal wurde nur bei der Zugabe einer NC2-Lösung beobachtet. Der Durchfluss von Arbeitspuffer ohne NC2 führte hingegen zu keiner Änderung im FRET-Signal, sodass mögliche Artefakte durch die Anwendung des Flusssystems als Grund für die Dynamik ausgeschlossen werden können. Die deutliche Antikorrelation zwischen Donor- und Akzeptorsignal weist außerdem darauf hin, dass die Dynamik tatsächlich als Änderungen des Energietransfers zwischen den beiden Fluorophoren interpretiert werden kann. Durch zahlreiche Kontrolluntersuchungen konnte die Dipolorientierung der Fluorophore, die Akzeptorwahl und -position an der DNA sowie simple photophysikalische Effekte wie z. B. die Fluoreszenzlöschung am Donor oder Akzeptor als Grund für die FRET-Dynamik ausgeschlossen werden (Abschnitt 6.2). Die beobachtete Änderung

des FRET-Signals ist deshalb nur mit Änderungen des Donor- und Akzeptorabstandes zu erklären.

Eine solche Abstandsänderung könnte bedeuten, dass der TBP-NC2-Ringkomplex, wie schematisch in Abbildung 6.7 dargestellt, seine Position entlang der DNA dynamisch ändern kann. Dies würde die eingangs erläuterte Hypothese bestätigen, dass eine NC2-Bindung tatsächlich zur Mobilisierung von TBP führt. Eine zwischenzeitige TBP-Dissoziation von der DNA kann dabei ausgeschlossen werden, da das FRET-Signal beim Bindungsprozess von NC2 nicht verloren geht. Die beobachtete Dynamik ist somit nicht durch Sprünge von TBP an der DNA zu erklären, was auf eine Verschiebung des TBP-NC2-Komplexes entlang der DNA schließen lässt.

Nach fünfminütiger Inkubation der NC2-Lösung wurde die Flusskammer über das Flusssystem mit 260 μ L Arbeitspuffer gespült (Strömungsgeschwindigkeit 2 mL/min). Da NC2 ohne TBP nur schwache Wechselwirkungen mit der DNA eingeht [4], kann angenommen werden, dass alle TBP-ungebundenen NC2-Moleküle aus dem Probensystem entfernt wurden. Auch nach dieser Spülung wurde die beschriebene FRET-Dynamik bei TBP-DNA-NC2-Komplexen weiterhin beobachtet (Abb. 6.8). Ein Artefakt durch den hohen NC2-Überschuss kann deshalb als Ursache der Dynamik ausgeschlossen werden. Insgesamt konnte bei 74 % aller Probenkomplexe, die ein klares FRET-Signal zeigten, ein dynamisches FRET-Verhalten nach der NC2-Zugabe festgestellt werden.

Exemplarisch für die bestehende FRET-Dynamik nach der Entfernung von ungebundenem NC2 ist in Abbildung 6.8 der ermittelte FRET-Verlauf eines weiteren Probenkomplexes aufgetragen. In diesem repräsentativen Verlauf fluktuiert das FRET-Signal nicht nur zwischen den bereits beschriebenen FRET-Effizienzbereichen um $\sim 40\%$ (magenta) und $\sim 80\%$ (gelb), sondern nimmt auch Werte an, die deutlich unterhalb der anfänglichen Effizienz von 40% liegen (cyan-farbiger Bereich: $10 - 22,5\%$). Diese Werte zeigen, dass der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor nach der NC2-Zugabe nicht nur kleiner (höherer Energietransfer), sondern auch größer (niedrigerer Energietransfer) als vor der NC2-Bindung wurde. Durch eine manuelle Reproduzierung der Zeitspur-Extraktion aus den aufgenommenen Rohdaten konnte bestätigt werden, dass die niedrigen FRET-Werte

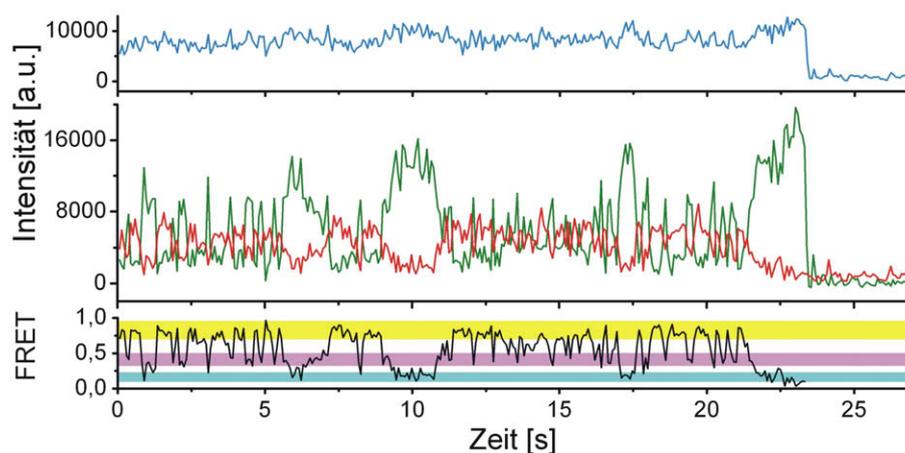


Abbildung 6.8.: Typischer FRET-Verlauf nach erfolgter NC2-Inkubation und anschließender Entfernung von nicht gebundenem NC2 (75 ms/Bild). Neben den bereits in Abbildung 6.7 erkannten FRET-Werten im magenta- bzw. gelb-farbigen (32,5 - 50 % bzw. 70 - 95 %) Bereich wurden bei den dynamischen Zeitspuren nach der NC2-Zugabe auch deutlich niedrigere FRET-Effizienzen beobachtet (cyan, 10 - 22,5 %).

nicht auf einer fehlerhaften Hintergrundkorrektur durch benachbarte Probenkomplexe basieren, sondern tatsächliche Abstandsänderungen darstellen.

6.1.7. Detaillierte Beobachtung der TBP-NC2-Dynamik

Auffallend an der beschriebenen Dynamik ist die Beobachtung, dass die FRET-Werte häufig in diskreten Sprüngen zwischen den beiden oberen Effizienzbereichen (magenta und gelb) zu springen scheinen. Zur genaueren Untersuchung dieser Beobachtung wurden deshalb höher aufgelöste *spFRET*-Untersuchungen nach erfolgter NC2-Zugabe mit 30 ms/Bild durchgeführt. Abbildung 6.9 zeigt eine typische *spFRET*-Zeitspur dieser Messungen. Im zeitlich höher aufgelösten FRET-Verlauf sind nun die digitalen Zustandsänderungen im Energietransfer zwischen $\sim 40/80\%$ deutlich zu erkennen. Neben den FRET-Zeitspuren ist in Abbildung 6.9 zusätzlich das Histogramm über die einzelnen FRET-Werte des zeitlichen Verlaufs dargestellt. Es zeigt die Dominanz von zwei Zuständen durch schmale Verteilungen um $\sim 40\%$ bzw. $\sim 80\%$ FRET-Effizienz. Zustände, die bei $\sim 20\%$ liegen, werden deutlich seltener beobachtet und sind im Histogramm nur als schwache Schulter zu erkennen.

Im Histogramm der Abbildung 6.10A wurden 100 dynamische *spFRET*-Verläufe in Form solcher Einzelbild-FRET-Verteilungen zusammengefasst. Um eine Gewich-

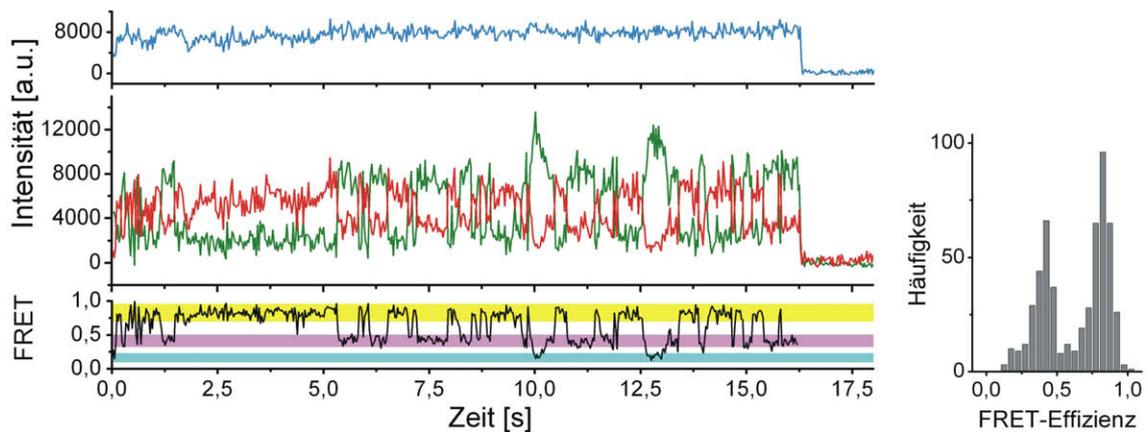


Abbildung 6.9.: Typischer FRET-Verlauf bei hoher zeitlicher Auflösung (30 ms/Bild) und Einzelbild-Histogramm der FRET-Zeitspur eines individuellen TBP-DNA-NC2-Komplexes.

zung der individuellen Verteilungen durch frühes oder spätes Fluorophorbleichen eines FRET-Partners zu vermeiden, wurden die einzelnen spFRET-Histogramme bezüglich ihrer Fläche normiert. Das resultierende Gesamthistogramm zeigt ein Maximum bei 43% und ein weiteres bei 82%. Das erste Maximum liegt bei einer FRET-Effizienz, welche sehr ähnlich zum konstanten FRET-Ausgangszustandes ist, der bei 40% (= 64 Å) lag (Abb. 6.6). Wie im vorangegangenen Abschnitt 6.1.5 erläutert, kann dieser Zustand als Komplexkonformation interpretiert

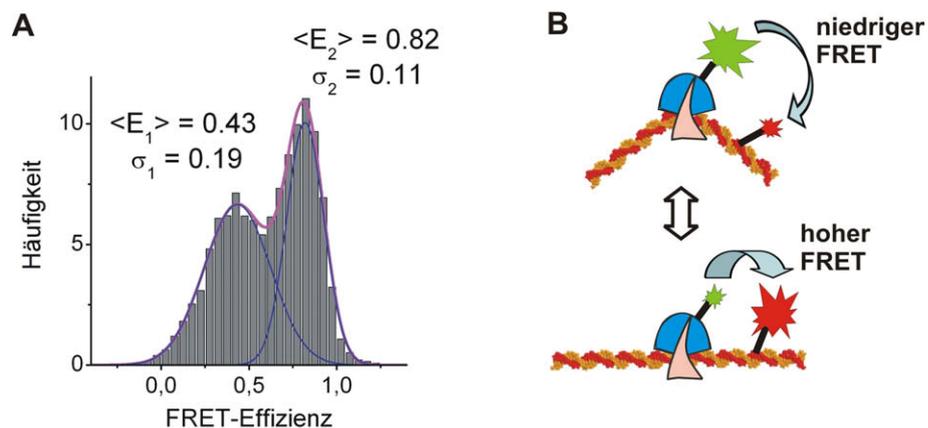


Abbildung 6.10.: Auswertung und Interpretation der hoch aufgelösten FRET-Verläufe nach NC2-Zugabe. (A) Zusammenfassung von 100 FRET-Zeitspuren in Form von normierten Einzelbild-Histogrammen. (B) Interpretation des Ergebnisses als „Schmetterling-Effekt“: Schnelle, fluktuierende Konformationsänderungen vom gebeugten zum gestreckten Zustand des DNA-Stranges.

werden, bei der die DNA in der bekannt gebogenen Form vorliegt. Aus der Röntgenkristallstruktur konnte der Donor-Akzeptor-Abstand in einer TBP-DNA-Konformation auf $43 - 56 \text{ \AA}$ geschätzt werden, bei der TBP weiterhin auf der TATA-Box lokalisiert ist, aber die DNA nun linear gestreckt vorliegt. Dieser Abstandsbereich stimmt mit dem ermittelten Abstand für den FRET-Zustand von 82 % (= 47 \AA) überein. Unter der Annahme, dass die ermittelten 43 % des ersten Maximums in Abbildung 6.10A tatsächlich den FRET-Ausgangszustand wiedergeben, könnten die schnellen Sprünge zwischen den beiden bevorzugten FRET-Zuständen somit auf dynamische Konformationsänderungen des DNA-Stranges hinweisen (Abb. 6.10B)³. Aus molekularer Sicht einer möglichen TBP-Mobilität entlang der DNA ist eine Streckung des DNA-Stranges ebenfalls sehr nahe liegend, da die DNA bei einer schwächer werdenden TBP-Bindung ihre Ausgangskonformation (gestreckte Form) wieder einnehmen wird, wenn sich die Interkalation der Phenylalaninreste aufhebt.

Während die beobachteten FRET-Werte für die dominierenden Zustände bei $\sim 40\%$ und $\sim 80\%$ durch reine Konformationsänderungen im Probenkomplex erklärt werden können, ist es hingegen nicht möglich, die niedrigeren FRET-Werte bei $\sim 20\%$ ebenfalls ohne die Annahme der TBP-Delokalisierung zu interpretieren. Die Abbildung 6.2 zeigt, dass die Markierungspositionen von Donor und Akzeptor bereits im Ausgangszustand des TBP-DNA-Komplexes vor der NC2-Bindung eine maximale Entfernung zueinander aufweisen. Eine weitere Verkürzung des Donor-Akzeptor-Abstandes durch eine reine DNA-Konformationsänderung ist nicht möglich. Die niedrigeren FRET-Werte unterhalb des 40 %-igen Ausgangszustandes weisen somit auf eine tatsächliche TBP-Positionsverschiebung entlang der DNA und ein Verlassen der TATA-Box hin.

Der in cyan kenntlich gemachte Bereich der niedrigen FRET-Werte ($E = 0,10 \dots 0,225$; $R = 73,5 \dots 86,3 \text{ \AA}$) entspricht dabei einer Donor-Akzeptor-Abstandsänderung zum Anfangszustand (bei $E = 0,40$; $R = 64 \text{ \AA}$) von $\Delta R = 9,5 \dots 22,3 \text{ \AA}$. Eine direkte Interpretation dieser Werte als die tatsächlich erreichte Weite der Delokalisierungsstrecke von TBP-NC2 ist allerdings nicht möglich,

³Aufgrund der unregelmäßigen und schnellen Sprünge im FRET-Signal wird das Bild der sich ändernden DNA-Konformation auch als „Schmetterling-Effekt“ bezeichnet.

da zu erwarten ist, dass sich der Proteinkomplex entlang der DNA-Doppelhelix schraubenförmig bewegt. Der zusätzlich veränderte Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor durch die TBP-NC2-Rotation würde eine entsprechende Aussage verfälschen.

Diese niedrigen FRET-Werte, die im dynamischen Verlauf beobachtet wurden, sind der niedrigen Effizienz der schwach populierte TBP-DNA-Konformation vor der NC2-Zugabe sehr ähnlich ($E = 0,21$; vgl. Abb. 6.6). Wie bereits in Abschnitt 6.1.5 diskutiert, könnte der niedrige Wert der konstanten FRET-Verläufe vor der NC2-Zugabe auf eine zweite DNA-Bindungsstelle für das TBP hinweisen. Die dynamischen Verläufe in Abbildung 6.8 und 6.9 würden dann zeigen, dass TBP diese alternative Bindungsstelle auf der DNA auch nach der NC2-Bindung kurzfristig besetzt. Ein direkter Nachweis für einen solchen Zusammenhang konnte jedoch bis jetzt nicht erbracht werden.

Zusammenfassend zeigen die spFRET-Verläufe der zeitlich hochaufgelösten Messungen nach der NC2-Zugabe, dass die beobachtete Dynamik des FRET-Signals eine Mischung aus unterschiedlichen molekularen Bewegungen darstellen könnte. Das Gros der detektierten Dynamik - diskrete Sprünge zwischen dem Ausgangszustand und einem ebenfalls eng definierten, höheren FRET-Zustand - könnten eine häufig auftretende, schnelle DNA-Konformationsänderung zwischen gebeugtem und gestreckten Zustand bedeuten. Die zusätzlich beobachteten niedrigeren FRET-Werte weisen hingegen auf eine tatsächliche Delokalisierung der TATA-Box von TBP-NC2 entlang des DNA-Stranges hin.

6.1.8. Identische Ergebnisse mit verlängerter DNA

Um zu untersuchen, ob die Dynamik des TBP-DNA-NC2-Komplexes von der Länge des DNA-Stranges abhängig ist, wurde das spFRET-Experiment mit einem 110 bp langen Oligomer wiederholt. Diese Proben-DNA besaß wieder die bisher verwendete AdMLP-Basensequenz doch im Vergleich zu „DNA I“ wurde sie stromabwärts um 40 bp verlängert („DNA VII“ in Abb. E.1B). Die Proben-DNA wurde an der gleichen Stelle wie „DNA I“ aber mit einem neuen FRET-Akzeptor, Atto647N (Atto-Tec

GmbH)⁴, markiert. Dieser Akzeptor weist mit $R_0 = 59 \text{ \AA}$ (Angabe des Herstellers) einen vergleichbaren Förster-Radius zum Donor Atto532 auf wie das FRET-Paar Atto532/Atto647. Neben der längeren Basensequenz und dem neuen Akzeptor-Fluorophor wurde auch die Position des Biotins am DNA-Strang geändert. Das Biotin wurde am 5'-Ende (stromaufwärts), statt wie bei den bisher verwendeten DNA-Proben am 3'-Ende (stromabwärts) positioniert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die Art der beobachteten FRET-Dynamik vielleicht auf einen eindimensionalen Käfig zurückzuführen ist, dessen Enden durch Prismaoberfläche und Akzeptor-Fluorophor definiert sind, und in dem der TBP-NC2-Ringkomplex eingesperrt ist (vgl. hierzu die schematisch dargestellte Probenimmobilisierung in Abb. 6.3). Aufgrund der großen Länge des Oligomers war diese DNA-Probe Synthesebedingt mit vielen Abbruchprodukten verunreinigt. Sie wurde deshalb vor der Verwendung für die Einzelmolekül-Untersuchungen mittels Gel-Elektrophorese gereinigt.

Die Messungen wurden zum direkten Vergleich mit den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen ebenfalls mit einer TOA-Vorinkubation durchgeführt. Aufgrund der sehr ähnlichen Absorptions- und Emissionsspektren von Atto647N und Atto647 konnte für die Atto647-Messreihen der bereits für Atto647 verwendete Filtersatz zur Fluoreszenz-Detektion verwendet werden. Zusätzlich zum zeitlichen Verlauf des FRET-Signals wurde bei den Messungen mittels msALEX-Beleuchtung alternierend zur Donoranregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ die direkte Anregung des Akzeptors mit $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ durchgeführt. So konnte überprüft werden, ob eine eventuelle Dynamik nach der NC2-Bindung auf die Photophysik des Akzeptors zurückzuführen ist (vgl. hierzu auch Abschnitt 6.2.4). Der ermittelte γ -Faktor für die Messreihe mit Atto532/Atto647N betrug 0,64. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 6.11 zusammengefasst.

Vor der Zugabe von NC2 zeigten 96 % aller TBP-DNA-TOA-Komplexe mit einem klaren FRET-Signal erneut einen zeitlich konstanten Energietransfer. Das resultierende Histogramm der FRET-Mittelwerte lässt ebenfalls das gleiche Verhalten wie beim 70 bp langen Oligomer erkennen (Abb. 6.11). Neben dem Hauptmaximum bei $E = 0,37$ gibt es auch mit der deutlich längeren DNA eine schwaches

⁴Atto647N ($\epsilon_{\text{max}} = 150.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\Phi_{\text{F}} = 65 \%$) ist noch heller als Atto 647 und besitzt zusätzlich eine deutlich höhere Photostabilität.

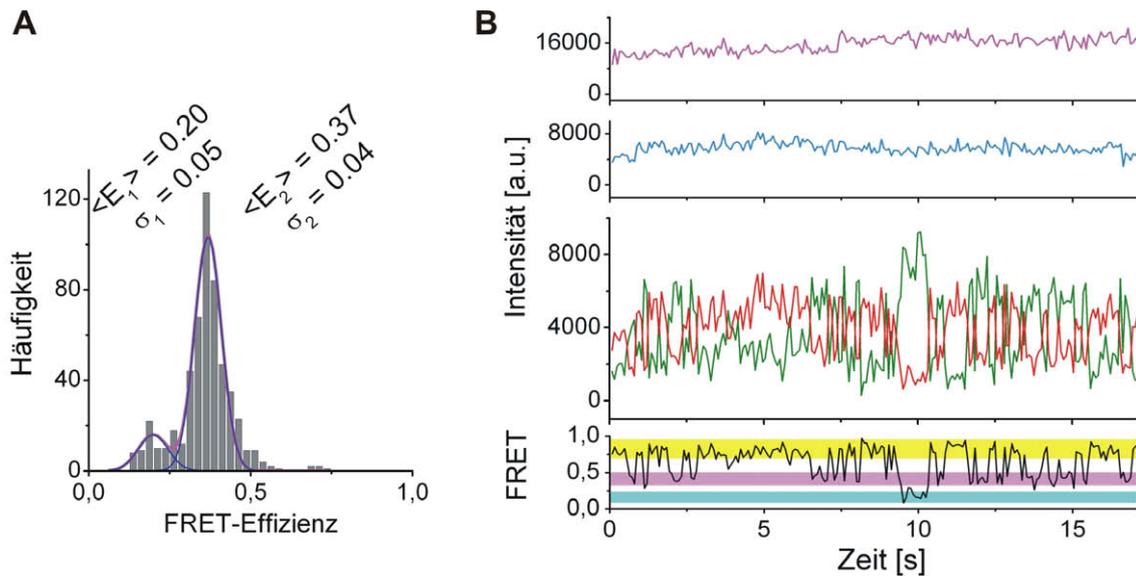


Abbildung 6.11.: Ergebnisse der spFRET-Untersuchungen mit einer 110 bp langen Proben-DNA. (A) Das Histogramm über die Mittelwerte zeitlich konstanter FRET-Signale von 544 Komplexen zeigt vergleichbare Werte für Haupt- und Nebenmaximum wie das Probensystem mit kürzerer DNA (70 bp). Das Verhältnis beider Subpopulationen ist ebenfalls identisch mit den vorangegangenen Untersuchungen. (B) Typischer FRET-Verlauf nach der Zugabe von NC2 (80 ms/Bild), der ebenfalls ein qualitativ identisches Verhalten des TBP-DNA-NC2-Komplexes im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungen zeigt. (Donor- bzw. Akzeptor-Intensität: grün bzw. rot; FRET: schwarz; Gesamtintensität: blau; Akzeptor-Intensität bei alternierender Direktanregung: magenta.) Die Regionen im FRET-Verlauf wurden analog zu den Ergebnissen der Hauptuntersuchung eingezeichnet (vgl. Abb. 6.8).

Nebenmaximum bei $E = 0,20$, das bezüglich der Fläche nur 15 % der Gesamtpopulation ausmacht. Das gleiche Verhältnis der beiden Subpopulationen wurde auch aus den Untersuchungsergebnissen der kürzeren DNA-Sequenz erhalten. Die ermittelten FRET-Werte der beiden Maxima liegen durch den geringfügig kleineren Förster-Radius des Atto532/Atto647N-Paares etwas niedriger als bei der kürzeren DNA-Probe mit dem Atto532/Atto647-Paar (Abb. 6.6).

Im dynamischen Verhalten des FRET-Signals nach erfolgter NC2-Zugabe konnten ebenfalls keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 6.11B). In den Zeitspuren mit der längeren DNA wurden die bereits bekannten Sprünge zwischen den dominanten FRET-Zuständen bei $\sim 40\%$ und $\sim 80\%$ ebenso beobachtet wie die zwischenzeitige Besetzung des niedrigen FRET-Zustandes bei $\sim 20\%$. Die zusätzlich durchgeführte msALEX-Anregung des Akzeptors (Abb. 6.11B, Inten-

sitäts-Zeitspur in magenta) zeigt einen zeitlich konstanten Verlauf, der beweist, dass photophysikalische Artefakte des Akzeptor-Fluorophors, wie z. B. Blinken, als Ursache für die beobachtete FRET-Dynamik ausgeschlossen werden kann (vgl. hierzu die ausführlichen Kontrollversuche in Abschnitt 6.2.4).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass das Verhalten des FRET-Signals weder von der Länge der Proben-DNA noch von der Richtung abhängig ist, in welcher der TBP-DNA-Komplex auf der Oberfläche immobilisiert wird. Das Akzeptor-Fluorophor und die Prismaoberfläche befanden sich in diesem Probensystem auf der selben DNA-Hälfte bezüglich der TATA-Box. Artefakte in den vorangegangenen Messergebnissen durch ein eventuelles Einsperren von TBP-NC2 zwischen Oberfläche und Akzeptor können somit ebenfalls ausgeschlossen werden, da die beobachtete FRET-Dynamik bei diesem Probensystem nach der NC2-Bindung qualitativ identisch zu den bisherigen Messungen ist.

6.1.9. Gleiche Wirkung von NC2 am modifizierten AdML-Promotor

Zur TATA-Box des *Adenovirus Major Late* Promotors zeigt TBP eine besonders hohe Affinität. Auffallend an diesem Promotor sind die vielen G-C-Basenpaarungen, welche die TATA-Box (TATAAAA) in der AdMLP-Sequenz flankieren („G-Flankierung“). Um den möglichen Einfluss dieser G-Flankierung zu untersuchen, wurden spFRET-Messungen mit DNA-Proben durchgeführt, bei denen die G-C-reichen Nachbarregionen der AdMLP-TATA-Box mutiert wurden. Die G-Flankierung wurde hierzu durch fünf geänderte Basenpaarungen stromaufwärts und sechs geänderte Basenpaarungen stromabwärts von der TATA-Box aufgehoben („DNA VIII“ in Abb. E.1C). Auf diese Weise entstand ein Promotor, dessen TATA-Box in einer völlig neuen Sequenzumgebung liegt. Die Markierungsposition des FRET-Akzeptors Atto647N wurde jedoch beibehalten (11 bp stromaufwärts von TATA), sodass die spFRET-Ergebnisse mit den bisherigen Untersuchungen vergleichbar sind. Vor der Verwendung für die spFRET-Messungen wurde auch diese DNA-Probe mittels Gel-Elektrophorese gereinigt.

Die spFRET-Messungen wurden auf identische Weise zu den vorangegangenen Experimenten mit einer TOA-Vorinkubation durchgeführt. Zusätzlich wurde bei die-

sen Messungen wieder mittels msALEX-Beleuchtung alternierend zum FRET-Signal das Akzeptorsignal bei der 633 nm-Anregung aufgenommen.

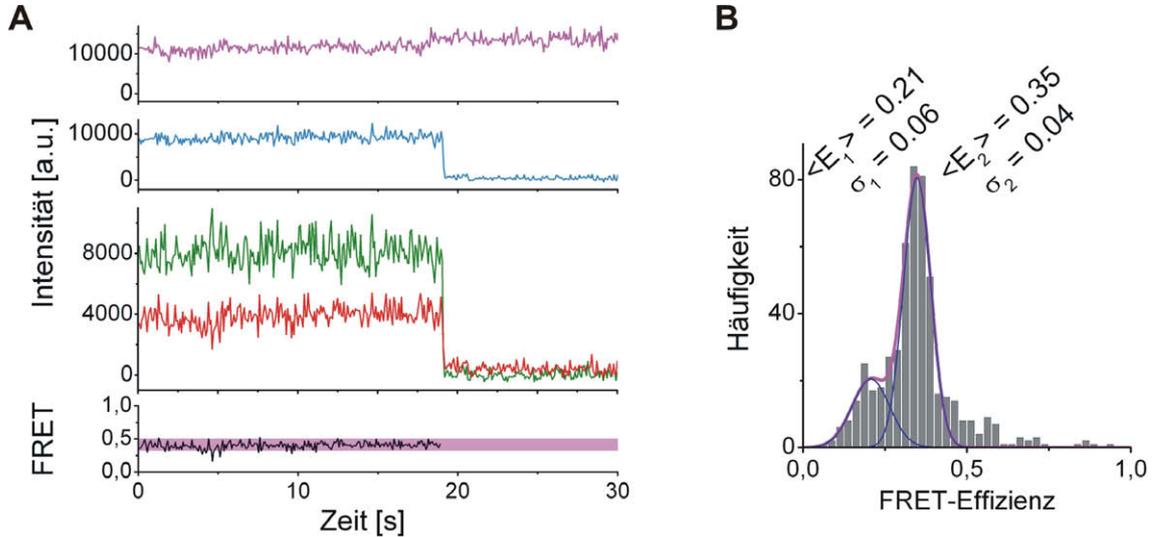


Abbildung 6.12.: Ergebnis der spFRET-Untersuchungen zur modifizierten AdMLP-Proben-DNA vor der Zugabe von NC2. (A) Typisch konstanter FRET-Zeitverlauf eines TBP-DNA-TOA-Komplexes (80 ms/Bild, magenta markierte Region: FRET-Effizienz von 32,5 - 50 %). (B) Histogramm über die Mittelwerte zeitlich konstanter FRET-Effizienzen von 523 stabilen Probenkomplexen.

Die spFRET-Untersuchungsergebnisse der AdMLP-Mutante mit aufgehobener G-Flankierung sind qualitativ identisch mit den Beobachtungen am AdMLP-Wildtyp. Vor der NC2-Zugabe zeigen die TBP-DNA-Komplexe erneut einen zeitlich konstanten FRET-Verlauf (Abb. 6.12A). Der γ -Faktor zur Korrektur der unterschiedlichen Detektionssensitivität für Donor- und Akzeptorkanal betrug 0,68. Das Histogramm der einzelnen FRET-Mittelwerte von 523 TBP-DNA-Komplexen (Abb. 6.12B) reproduziert das bereits in den vorangegangenen Experimenten erhaltene Nebenmaximum bei $E = 0,21$. Das Hauptmaximum bei $E = 0,35$ liegt allerdings etwas niedriger als bei den spFRET-Untersuchungen des AdMLP-Wildtyps ($E = 0,40$, Abb. 6.6). Diese Verschiebung kann durch leichte Veränderungen in der Windung der Doppelhelix und der Länge des Doppelstranges erklärt werden, die auf die Mutation der G-Flankierung zurückzuführen sind. Dadurch kann es zu einer veränderten Akzeptor-Position kommen, die den Abstand zwischen Donor und Akzeptor für die TBP-Moleküle der früheren 0,40-Population vergrößert hat [146]. Eine solche Veränderung der Akzeptor-Position durch eine Kombination aus Windungs- und Längenänderung

der DNA muss jedoch nicht zwangsläufig zu einer Fluorophor-Abstandsvergrößerung für die TBP-Moleküle des Nebenmaximums ($E = 0,21$) führen. Diese Population wurde in den vorangegangenen Untersuchungen als alternative TBP-Bindungsstelle bzw. alternative Komplexkonformation interpretiert, sodass die TBP-Moleküle in der alternativen Position auf der AdMLP-Mutante einen unveränderten Abstand zum Akzeptor aufweisen können.

Bezogen auf die Fläche des Histogramms nimmt das Nebenmaximum 26 % der Gesamtverteilung ein. Dieser Wert ist signifikant höher als bei den Untersuchungen des AdMLP-Wildtyps, wo das Nebenmaximum bei $E = 0,21$ nur 16 % des Histogramms ausmachte (Abb. 6.6). Diese Erhöhung des Nebenmaximums könnte bedeuten, dass die Affinität von TBP zur üblichen TATA-Bindung durch die Mutation der G-Flankierung geschwächt wurde. In Übereinstimmung dazu wurde festgestellt, dass nur noch 89 % der TBP-DNA-Komplexe, die ein deutliches *spFRET*-Signal zeigten, einen zeitlich konstanten FRET-Verlauf vor der NC2-Zugabe aufwiesen.

Nach erfolgter Zugabe von NC2 wurde auch mit der AdMLP-Mutante die typische Dynamik im FRET-Verlauf beobachtet. Die Abbildung 6.13 zeigt einen entsprechenden FRET-Verlauf, dessen Einzelbild-Histogramm auch für dieses Probensystem

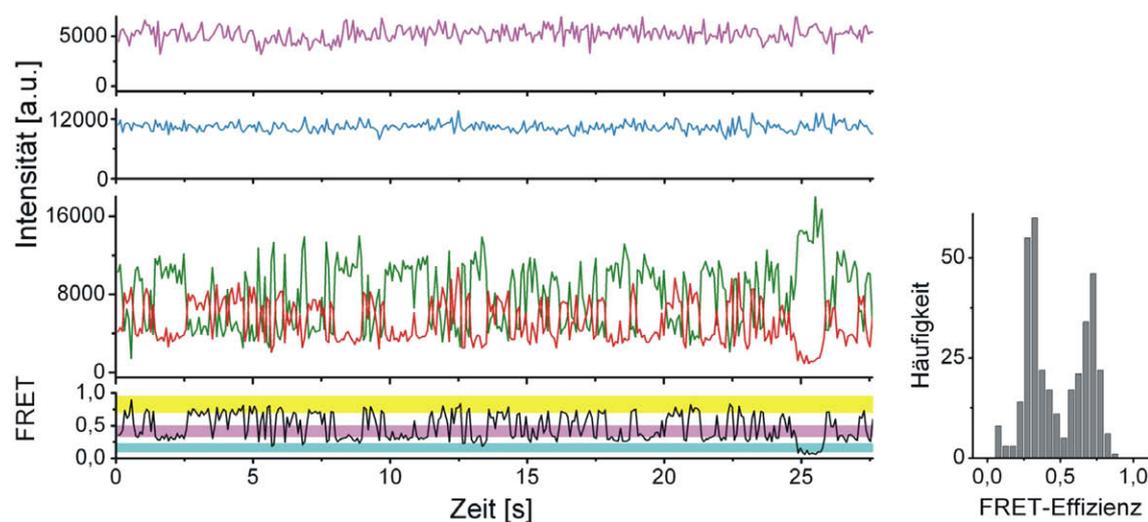


Abbildung 6.13.: Ein Typischer Verlauf der *spFRET*-Dynamik mit der AdMLP-DNA ohne eine G-Flankierung der TATA-Box (80 ms/Bild) und das Einzelbild-Histogramm der gezeigten FRET-Zeitspur des TBP-DNA-NC2-Komplexes. Die eingetragenen Regionen beziehen sich auf die typischen FRET-Zustände mit der nicht mutierten AdML-Promotorsequenz (cyan: 10 - 22,5 %, magenta: 32,5 - 50 %, gelb: 70 - 95 %).

die Existenz zweier dominanter FRET-Zustände in der Dynamik wiedergibt. Der Übergang zwischen beiden Zuständen geschieht wieder in schnellen Sprüngen. Neben den beiden dominierenden Zuständen weist die Dynamik der AdMLP-Mutante - ebenfalls analog zu den vorangegangenen Untersuchungen - FRET-Werte auf, die deutlich niedriger liegen als die beiden dominierenden Zustände (Abb. 6.13, nach ~ 25 s).

Die Betrachtung des resultierenden Einzelbild-Histogramms aus 91 dynamischen spFRET-Verläufen (Abb. 6.14) zeigt das erste Maximum des Histogramms ($E = 0,35$) dieses Mal als genaue Reproduzierung des FRET-Ausgangszustandes vor der NC2-Zugabe. Der zweite dominierende Zustand liegt bei $E = 0,69$ und ist damit niedriger als der zweite dominierende Zustand der AdMLP-Wildtyp-Probe ($E = 0,82$; Abb. 6.10A). Dieser Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen kann, analog zu den obigen Überlegungen, durch eine veränderte DNA-Windung und eine andere DNA-Länge der AdMLP-Mutante erklärt werden. Der dadurch geänderte Abstand zwischen Donor und Akzeptor im Vergleich zum nicht mutierten AdML-Promotor nimmt dann (nach dem Schema von Abb. 6.10B) auch Einfluss auf die resultierenden FRET-Werte eines gebeugten ($E = 0,35$) bzw. gestreckten Zustandes ($E = 0,69$) der DNA.

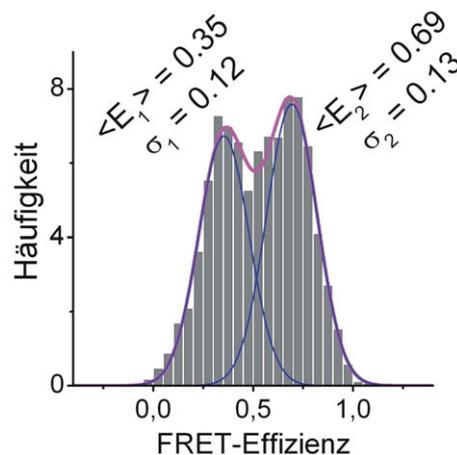


Abbildung 6.14.: Zusammenfassung von 91 FRET-Zeitspuren als normierte Einzelbild-Histogramme von dynamischen FRET-Verläufen (mit einer zeitlichen Auflösung von 80 ms/Bild) nach der Zugabe von NC2.

Um die Unterschiede der Untersuchungsergebnisse zwischen G-Flankierungsmutante und AdMLP-Wildtyp zu verdeutlichen, wurden ebenfalls in

den FRET-Verläufen der AdMLP-Mutante (Abb. 6.12 und 6.13) die Regionen für die typischen Zustände des AdMLP-Wildtyps eingezeichnet (cyan, magenta und gelb). Durch diese Darstellung wird ersichtlich, dass sich der dynamische FRET-Verlauf der AdMLP-Mutante nur in der absoluten Lage der verschiedenen FRET-Zustände vom AdMLP-Wildtyp unterscheidet, bei dem alle Zustände höher liegen. Der relative Verlauf zwischen den FRET-Werten ist hingegen für beide Probensysteme qualitativ identisch. Ein umfassender quantitativer Vergleich bzgl. der FRET-Kinetik der verschiedenen DNA-Proben ist bereits geplant (Kapitel 8).

Allerdings zeigten bei den *spFRET*-Messungen mit der mutierten AdMLP-Probe nur 60% der Proben-Komplexe nach der NC2-Zugabe einen dynamischen Verlauf, was im Vergleich zu den 74% für die nicht mutierte AdML-Promotorsequenz statistisch eine deutliche Verringerung des NC2-Effektes darstellt. Da die dynamischen Verläufe bei der AdMLP-Mutante jedoch qualitativ gleichwertig zur nicht mutierten Probe sind, könnte dieses Ergebnis bedeuten, dass die NC2-Bindungsaffinität durch die fehlende G-Flankierung herabgesetzt wurde.

Die Ergebnisse der *spFRET*-Untersuchungen mit der veränderten AdML-Promotorsequenz lassen somit vermuten, dass die G-Flankierung der TATA-Box einen Einfluss auf das Bindungsverhalten sowohl von TBP (stärkere Population des $E_{0,21}$ -Nebenmaximum und weniger konstante FRET-Verläufe von NC2-Zugabe) als auch von NC2 hat (weniger dynamische FRET-Verläufe nach NC2-Zugabe). Einen Einfluss der G-Flankierung auf die Art der Dynamik von gebildeten TBP-DNA-NC2-Komplexen konnte durch die Ergebnisse jedoch ausgeschlossen werden. Die umfangreichen Änderungen des Promotors in direkter Nachbarschaft zur TATA-Sequenz weisen außerdem darauf hin, dass der beobachtete NC2-Effekt tatsächlich allgemein für jeden eukaryotischen Promotor gilt. Für eine solche Aussage müssten jedoch zusätzlich umfangreiche Untersuchungen mit sehr verschiedenen Promotoren durchgeführt werden (vgl. Kapitel 8).

6.1.10. Reichweite der TBP-NC2-Mobilität

Da mit der Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers nur Abstandsänderungen von 10 bis 100 Å erkennbar sind, konnte mit dem Probensystem, bei dem der FRET-Akzeptor in der Nähe der TATA-Box positioniert wurde, nur die Dynamik unmittelbar am Ausgangspunkt des TBP-DNA-Komplexes untersucht werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich TBP-NC2 von der TATA-Box entfernt. Aber wie weit sich der Proteinkomplex entlang des DNA-Stranges bewegt, konnte nicht untersucht werden, da das Beobachtungsfenster der Abstandsänderung zu klein gewesen ist. Aus diesem Grund wurden vergleichbare spFRET-Untersuchungen mit einer DNA-Probe durchgeführt, die zwar die gleiche DNA-Sequenz (Wildtyp-AdML-Promotor, 70 bp) aufwies, die aber nicht an der TATA-Box, sondern an beiden Strangenden mit dem FRET-Akzeptor Atto647 markiert wurde („DNA II“ in Abb. E.1A).

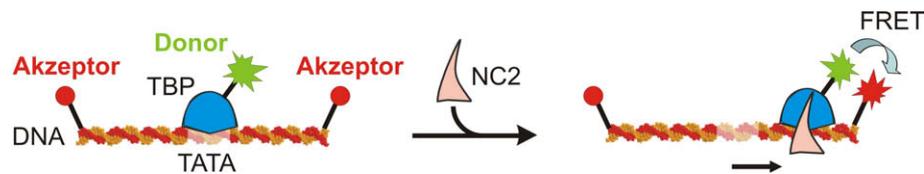


Abbildung 6.15.: Schematische Darstellung des spFRET-Experiments mit einer neuen DNA-Probe, die an beiden Enden einen FRET-Akzeptor trägt. Wenn NC2 gebunden ist und TBP-NC2 sich bis in die Nähe des DNA-Strangendes bewegen kann, sollte ein Anstieg des FRET-Signals zu beobachten sein.

Abbildung 6.15 zeigt die Strategie dieses Experiments. Im Ausgangszustand des TBP-DNA-Komplexes sollte die Probe gar kein oder nur ein sehr schwaches FRET-Signal aufweisen. Nach der Bindung von NC2 sollte dann bei einer tatsächlichen Bewegung von TBP-NC2 bis ans Ende des DNA-Stranges ein Anstieg des FRET-Signals detektierbar sein. Durchgeführt wurden diese Experimente wieder als msALEX-Messungen, sodass zusätzlich der Verlauf des Akzeptorsignals bei direkter Anregung beobachtet werden konnte.

Die Abbildung 6.16 zeigt einen beispielhaften FRET-Verlauf dieses Proben-systems nach erfolgter NC2-Inkubation und Arbeitspufferspülung. Die Zeitspuren (80 ms/Bild) zeigen auch bei dieser Probe eine Dynamik des FRET-Signals. Die Zeitspur der Akzeptor-Direktanregung durch die msALEX-Beleuchtung (magenta) weist einen Bleichschritt nach ca. 7 s auf und lässt die Existenz von zwei Akzeptoren am selben DNA-Strang erkennen.

Bei der Auswertung dieser Experimente wurde festgestellt, dass ein Teil der TBP-DNA-Komplexe (23 %) bereits vor der NC2-Zugabe ein deutliches FRET-Signal zeigten. Ein Grund hierfür könnten wiederum zusätzliche Bindungsmöglichkeiten für TBP an den Enden der verwendeten DNA-Sequenz sein wie sie bereits für die Position nahe der TATA-Box diskutiert wurden (Abschnitt 6.1.5). Die statistische

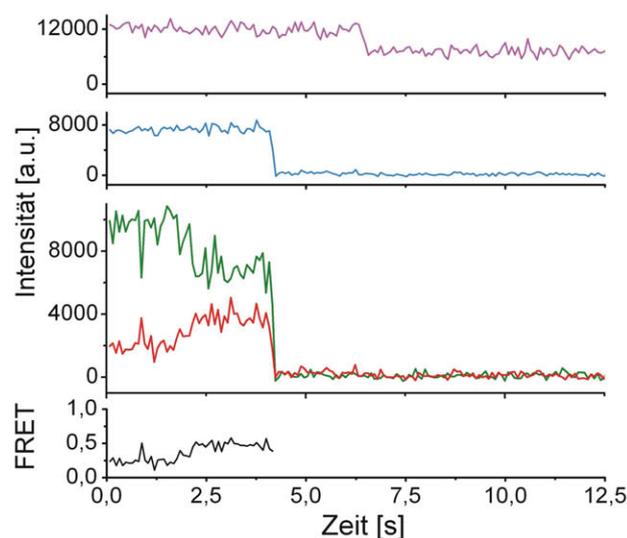


Abbildung 6.16.: Exemplarischer FRET-Verlauf einer msALEX-Messung mit der DNA-Probe, bei der FRET-Akzeptoren nicht in der Nähe der TATA-Box, sondern an beiden Strangenden positioniert wurden (80 ms/Bild). Die zusätzliche Zeitspur der direkten Akzeptor-Anregung durch msALEX-Beleuchtung (magenta) zeigt durch einen Bleichschritt nach ca. 7 s, dass sich zwei Akzeptoren am selben DNA-Strang befinden.

Auswertung von 1571 Komplexen nach der NC2-Zugabe ergab jedoch einen 16%-igen Anstieg in der Anzahl der Komplexe, die ein deutliches FRET-Signal zeigten. Dieser Anstieg konnte durch mehrere Wiederholungen des Experimentes reproduziert werden. In biochemischen *in vitro crosslinking restriction digest-coupled IP* (CRIP)-Experimente des Kooperationspartners Prof. Dr. Meisterernst und seinen Mitarbeitern konnte an TBP-DNA-NC2-Komplexen gezeigt werden, dass 8% der TBP-NC2-Komplexe an das 3'-Ende einer DNA wandern [4]. Das Konzentrationsverhältnis war dabei vergleichbar mit denen der spFRET-Messungen. Im CRIP-Experiment wurden nur TBP-NC2-Komplexe nachgewiesen, die an eines von den beiden DNA-Enden gelangt sind. Das CRIP-Ergebnis stimmt also mit der Auswertung des hier beschriebenen spFRET-Experimentes überein und zeigt wiederum, dass sich TBP-NC2 tatsächlich von TATA bis an das Ende des DNA-Stranges bewegen kann.

6.2. Kontrollexperimente

Im vorangegangenen Unterkapitel wurde durch spFRET-Messungen der Effekt des Negativen Cofaktors 2 auf den Transkriptions-initiiierenden TBP-Promotor-Komplex untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten die Hypothese, dass NC2 zur Mobilisierung von TBP entlang der DNA führt. Um die Richtigkeit der erläuterten Interpretationen aus dem FRET-Signal zu verifizieren, wurden unterschiedlichste Kontrollexperimente durchgeführt, mit denen gezeigt werden kann, dass die beobachtete FRET-Dynamik kein Artefakt des Probensystems oder der Messtechnik darstellt.

6.2.1. Wirkung der TOA-Vorinkubation

Wie bereits in Abschnitt 2.4.3 und 6.1.1 erläutert, diente die durchgeführte Vorinkubation von TBP und DNA zusammen mit TOA dazu, die Bindungsorientierung von TBP an der DNA festzulegen. Die tatsächliche Wirkung des Vorinkubationsprozesses konnte mit vergleichenden spFRET-Experimenten (ohne NC2-Zugabe) untersucht werden, bei denen zur Probenvorbereitung gar keine Vorinkubation, eine Vorinkubation ohne TOA und eine mit TOA stattfand.

Im Experiment ohne Vorinkubation wurde zunächst die DNA (500 pM) alleine auf der Oberfläche des TIRFM-Prismas immobilisiert. Nach 5 minütiger Inkubation wurde nicht gebundene DNA mit Arbeitspuffer weggespült. Anschließend wurde eine Lösung von 500 pM TBP in den Probenraum gegeben und ebenfalls für 5 min inkubiert. Wieder wurden nicht gebundene Proteine mit Arbeitspuffer aus der Flusskammer gespült. Die Experimente mit Vorinkubation wurden einmal ohne ($[TBP : DNA] = [1 : 1]$) und einmal mit TOA ($[TBP : DNA : TOA] = [1 : 1 : 2]$), wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben, durchgeführt. Die statistische Auswertung der extrahierten Zeitspuren ergab, dass bei allen drei Experimenten mehr als 96 % der klaren FRET-Signale einen konstanten Verlauf zeigten. Ein Einfluss der Vorinkubation mit/ohne TOA auf die Stabilität des FRET-Signals der gebildeten TBP-DNA-Komplexe kann somit ausgeschlossen werden.

Ein deutlicher Einfluss der Vorinkubationen wurde allerdings für die beobachteten *Werte* der konstanten FRET-Verläufe erkannt. Die Abbildung 6.17 zeigt das Ergebnis der vergleichenden Studie. Dargestellt sind die jeweiligen Histogramme der

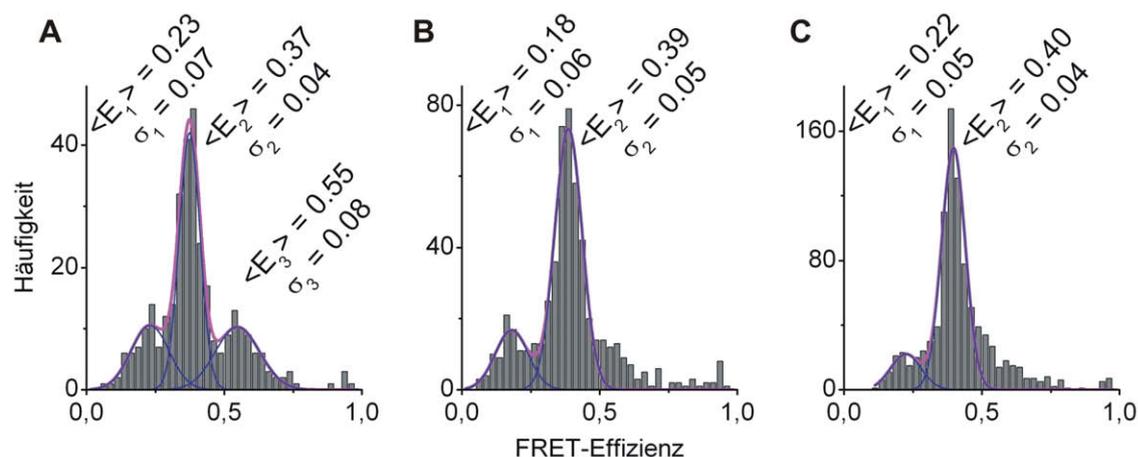


Abbildung 6.17.: Histogramme der Mittelwerte von konstanten FRET-Verläufen bei drei Messreihen, die sich in der Probenvorbereitung unterscheiden. (A) Messreihe, bei der sich die TBP-DNA-Komplexe direkt auf der Oberfläche des TIRFM-Prismas bildeten (323 Komplexe). (B) Messreihe mit Vorinkubation ohne TOA (15 min bei 28 °C, 552 Komplexe). (C) Messreihe mit TOA-Vorinkubation (15 min bei 28 °C, 944 Komplexe).

FRET-Mittelwerte von zeitlich konstanten FRET-Verläufen. Bei der Messung von TBP-DNA-Komplexen, die sich ohne Vorinkubation direkt auf der Prismaoberfläche gebildet haben, werden drei unterschiedliche FRET-Werte erhalten (Abb. 6.17A). Die Maxima bei $E = 0.23$ und $E = 0.37$ wurden schon bei den bereits beschriebenen Experimenten mit TOA-Vorinkubation erkannt (Abb. 6.6, $E = 0.21$ und $E = 0.40$) und konnten bei dieser Untersuchung nochmals durch eine neue Messreihe mit TOA-Vorinkubation bestätigt werden (Abb. 6.17C, $E = 0.22$ und $E = 0.40$). Auch in der Messreihe mit der Vorinkubation ohne TOA wurden diese zwei FRET-Zustände erreicht (Abb. 6.17B, $E = 0.18$ und $E = 0.39$). Das zusätzliche Maximum im Histogramm der vorinkubationsfreien Messreihe bei $E = 0.55$ (Abb. 6.17A) ist in Abb. 6.17B jedoch nur noch als Schulter des Hauptmaximums zu erkennen. In Abb. 6.17C ist dieser Zustand sogar noch schwächer populierte.

Anhand der TBP-DNA-Kristallstruktur kann durch die Betrachtung des Abstandes zwischen Donor- und Akzeptorposition im Probenkomplex gezeigt werden, dass die FRET-Effizienzen von $\sim 0,40\%$ ($= 64 \text{ \AA}$) und $0,55\%$ ($= 58 \text{ \AA}$) mit den Abständen korrelieren, die für die beiden möglichen Bindungsorientierungen des TBP auf der DNA abgeschätzt werden können (Abb. 6.18). Wird im Histogramm des Experimentes ohne eine Vorinkubation (Abb. 6.17A) das Nebenmaximum bei $E = 0,23$

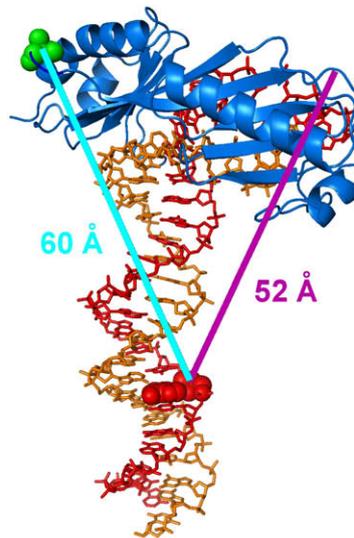


Abbildung 6.18.: Bestimmung der Abstände von Donor- und Akzeptor-Markierungspositionen aus der TBP-DNA-Kristallstruktur bei unterschiedlichen TBP-Bindungsorientierungen (von Alfred Lammens modifizierte PDB-Datei 1RM1). Die tatsächlichen Abstände der Fluorophore sind durch die Verbindungsmoleküle zwischen Fluorophor und Biomolekül zusätzlich vergrößert.

nicht beachtet, so zeigt die relative Fläche für die beiden Maxima bei $E = 0,37$ bzw. $E = 0,55$, dass nur 66 % der TBP-Moleküle in der Orientierung an die DNA gebunden sind, wie sie auch die Kristallstruktur wiedergibt (Hauptmaximum bei $E = 0,37$). Die restlichen 34 % der TBP-Moleküle haben bei der Bindung an die Probenoberfläche die entgegengesetzte Orientierung eingenommen (Nebenmaximum bei $E = 0,55$). Die Werte stimmen mit den biochemischen Ergebnissen von Scheppartz und ihren Mitarbeitern überein, die für dieses Probensystem ohne TOA (bzw. TFIIA) ein Verhältnis von 67/33 bestimmten [72].

Mit Hilfe der Vorinkubation nimmt die Population der Bindungsorientierung, die nicht im Kristall beobachtet wird, deutlich ab. Es konnte gezeigt werden, dass die bevorzugte TBP-Orientierung auf eine schnellere Assoziationsrate von TBP an die DNA zurückzuführen ist [74]. Da die TBP-DNA-Komplexe sich während der Vorinkubation länger ordnen können als bei der vorinkubationsfreien Messung, wird sich das Gleichgewicht somit zur TBP-Orientierung verschieben, die auch in der Kristallstruktur vorliegt. Durch die erhöhte Spezifität der bevorzugten TBP-Bindungsorientierung mit TOA nimmt die schwächer populierte Orientierung mit

der TOA-Vorinkubation weiter ab.

Die alternative Bindungsorientierung von TBP konnte das beobachtete Nebenmaximum bei $E = 0.55$ erklären. Das Nebenmaximum bei $E \approx 0.21$ scheint hingegen auf eine zweite Bindungsstelle am DNA-Strang oder eine alternative TBP-DNA-Konformation hinzuweisen. Im Histogramm der vorinkubationsfreien Messreihe sowie im Ergebnis des Experiments mit durchgeführter Vorinkubation ohne TOA beträgt der Histogrammanteil des Nebenmaximums bei $E \approx 0,21$ jeweils 22% (bezogen auf die Gesamtfläche). Im Histogramm der TOA-Vorinkubation liegt dieser Anteil nur bei reproduzierbare 16% (vgl. auch Abb. 6.6). TOA hat demnach nicht nur einen stärkenden Einfluss auf eine definierte TBP-Orientierung, sondern erhöht ebenfalls die Spezifität der TATA-Box-Position bzw. einer bestimmten TBP-DNA-Konformation.

6.2.2. Untersuchung der TBP-Bindungsspezifität an die TATA-Box

Um nachzuweisen, dass es sich bei der TBP-DNA-Komplexbildung um eine hoch spezifische Bindung von TBP handelt, welche auf die Präsenz einer TATA-Box angewiesen ist, wurden vergleichbare *spFRET*-Untersuchungen mit einer DNA-Probe durchgeführt, bei der die TATA-Box-Sequenz mutiert wurde. Die bekannte *TATAAAAGGGG*-Sequenz wurde durch *TAGCAGAGGAA* ersetzt. Die benachbarten flanking-Regionen sowie die Markierungsposition für das Akzeptor-Fluorophor wurden nicht verändert („DNA III“ in Abb. E.1A).

Für diese Messung wurde wiederum keine Vorinkubation von TBP, DNA und TOA durchgeführt. Wie beim Experiment zur Untersuchung der TBP-Bindungsorientierung ohne Vorinkubation (Abschnitt 6.2.1) wurde die TATA-Box-freie DNA zu Beginn der Messung alleine auf der Oberfläche des TIRFM-Prismas immobilisiert. Anschließend wurde die TBP-Lösung zugegeben.

Das beobachtete Bindungsverhalten von TBP an der TATA-Box-freien DNA ist im Vergleich zur Messung mit dem nicht-mutierten Promotor als sehr unterschiedlich zu bezeichnen. Beim Experiment mit der TATA-Mutante war eine achtfache TBP-Konzentration erforderlich, um eine ähnlich dichte Besetzung von gebundenem TBP auf der Oberfläche zu erreichen, wie sie mit dem AdML-Promotor beobachtet werden

kann. Dies zeigt, dass die Affinität von TBP zur TATA-Mutante deutlich reduziert ist. Während der TBP-Inkubation wurde eine häufige Dissoziation und erneute Bindung von TBP an die DNA-Mutante beobachtet. Zudem konnten nach erfolgter Inkubation nur wenig konstante FRET-Signale extrahiert werden. Beide Beobachtungen zeigen, dass die gebildeten Komplexe aus TBP und TATA-Box-freier DNA im Vergleich zur herkömmlichen TBP-Promotor-Verbindung sehr instabil sind.

Nach erfolgtem Entfernen nicht gebundener TBP-Moleküle durch Spülen mit Arbeitspuffer wurde innerhalb weniger Minuten eine Erhöhung des fluoreszierenden Hintergrundes aufgrund von dissoziierten und dadurch frei diffundierenden, TBP-Molekülen detektiert. Ein solches Verhalten wurde bei Experimenten mit dem AdML-Promotor nicht beobachtet und zeigt wiederum die vergleichsweise schwache Affinität von TBP zur TATA-Box-freien DNA. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass bei den Experimenten mit nicht-mutiertem AdML-Promotor tatsächlich spezifische TBP-TATA-Box-Interaktionen observiert wurden.

6.2.3. Unterschiedliche DNA-Markierungspositionen und andere Akzeptorfarbstoffe

Die beobachtete Dynamik des FRET-Signals könnte auch durch fluktuierende Konformationsänderungen des TBP-DNA-Komplexes erklärt werden, die eintreten könnten, wenn NC2 aufgrund der Akzeptor-Position auf der DNA nicht korrekt binden kann. Zur Verifizierung, dass weder die Position noch die Art des Fluorophors für die FRET-Dynamik verantwortlich sind, wurden Experimente mit DNA-Proben durchgeführt, die zwar die gleiche Sequenz wie das bisher verwendete 70 bp lange AdMLP-Oligomer („DNA I“) aufwiesen, aber die an drei verschiedenen Positionen mit dem Akzeptor-Fluorophor Alexa647 (Molecular Probes, Invitrogen) markiert wurden (Abb. 6.19, „DNA IV - VI“ in Abb. E.1A). Mit Alexa647 soll - nach dem bereits eingesetzten Atto647N (Abschnitte 6.1.8 und 6.1.9) - mit einer zweiten Akzeptor-Alternative untersucht werden, ob die Dynamik auch mit anderen FRET-Paaren zu beobachten ist. Alexa647 weist ein vergleichbares Absorptions- und Emissionsspektrum wie das bisher eingesetzte Atto647 auf. Zur Messung mussten die benutzten Filter im Detektionsstrahlengang deshalb nicht ausgetauscht werden.

Die Experimente wurden ohne Vorinkubation und in Abwesenheit von TOA

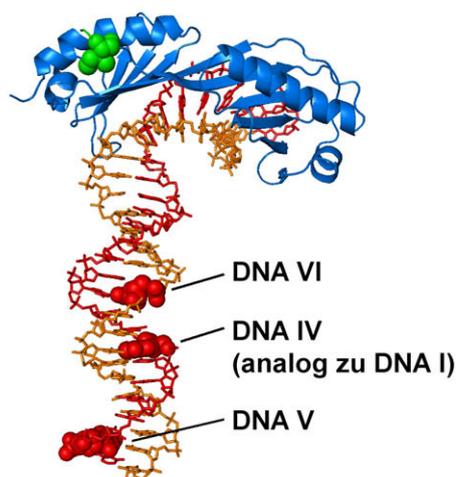


Abbildung 6.19.: Positionen der FRET-Fluorophore bei unterschiedlichen DNA-Proben in der TBP-DNA-Kristallstruktur (von Alfred Lammens modifizierte PDB-Datei 1RM1). Die Position des FRET-Donors (Atto532) am TBP ist sphärisch und grün eingezeichnet. Die jeweilige Position der FRET-Akzeptoren (Alexa647) am DNA-Strang sind sphärisch und rot hervorgehoben. Die Bezeichnungen der verschiedenen DNA-Proben sind hier analog zur Abbildung E.1A angegeben.

durchgeführt. Die ermittelten Korrekturfaktoren für die unterschiedlichen Detektionssensitivitäten von Donor- und Akzeptorkanal lagen bei $\gamma = 0,35 \dots 0,39$. Bei jedem der drei unterschiedlichen TBP-DNA-Komplexe wurden vor der NC2-Zugabe typischerweise konstante FRET-Verläufe beobachtet (Abb. 6.20A). Nach der Zugabe des Cofaktors wurden die Zeitspuren wieder dynamisch (Abb. 6.20B).

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass weder die Art des FRET-

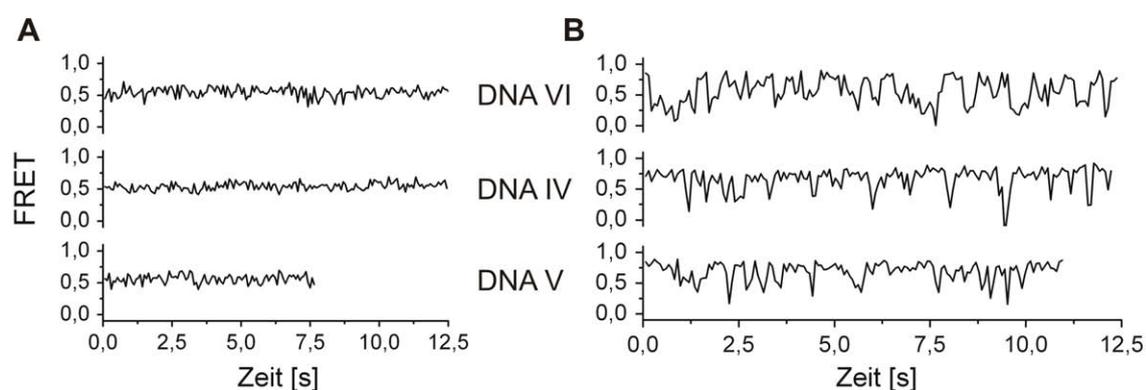


Abbildung 6.20.: Repräsentative FRET-Verläufe der Alexa647-markierten DNA-Proben mit unterschiedlichen Akzeptor-Positionen (A) vor und (B) nach der NC2-Zugabe (75 ms/Bild).

Fluorophorpaares noch die Markierungsposition des Akzeptors für die Dynamik des FRET-Verlaufs verantwortlich ist. Unglücklicherweise waren die γ -Faktoren bei diesem FRET-Paar aufgrund der deutlich stärkeren Leuchtkraft des Atto532-Donors im Vergleich zum Alexa647-Akzeptor sehr niedrig. Aus diesem Grund ist die Qualität der FRET-Verläufe nicht gut genug, um eine quantitative Analyse der konstanten FRET-Mittelwerte bzw. der dynamischen FRET-Zeitspuren durchzuführen. Die vergleichbar schlechte Qualität der FRET-Zeitspuren erklärt auch, warum die konstanten FRET-Werte für die drei unterschiedlichen Markierungspositionen keine großen Abweichungen voneinander zeigen (Abb. 6.20A).

6.2.4. Photophysik des FRET-Farbstoffpaares

Fluktuationen im photophysikalischen Verhalten einzelner Fluorophore können im Prozess des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor zu einem ähnlich dynamischen FRET-Verlauf führen, wie er bei den TBP-DNA-NC2-Komplexen beobachtet wurde. Die Intensitäten des Donor- bzw. Akzeptorsignals können z. B. durch partielle oder gänzliche Fluoreszenzlöschung sowie durch ISC-Übergänge beeinflusst werden. Da sich die FRET-Effizienz nach Gleichung 3.26 wiederum aus den Signalintensitäten berechnet, würde auch der FRET-Verlauf aufgrund der photophysikalischen Instabilität der Fluorophore fluktuieren. Dies würde bedeuten, dass bei einem instabilen Emissionsverhalten der Fluorophore die beobachtete FRET-Dynamik nach der NC2-Zugabe nicht mehr als Änderungen im Abstand von Donor und Akzeptor interpretiert werden könnte.

Die in den durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit eingesetzten Donor- und Akzeptor-Fluorophore zeigten auf der Stufe einzelner Moleküle jedoch ein sehr stabiles Emissionsverhalten (bezogen auf die Zeitskala der erfolgten Messungen). Dies wird auch durch die konstanten Zeitspuren der Fluorophorintensitäten deutlich, die vor der NC2-Zugabe aufgenommen wurden (Abb. 6.5). Nur selten wurden Signalfuktuationen durch Blinken (Abb. 3.4) oder Fluoreszenzlöschung (Abb. 6.21) beobachtet.

Da sich die FRET-Effizienz aus dem Verhältnis von Akzeptor und Gesamtintensität berechnet (Gleichung 3.26), sollten photophysikalische Fluktuationen des Donor-Fluorophors im Falle von partieller Fluoreszenzlöschung jedoch keinen Einfluss auf das resultierende FRET-Signal haben. Die Abbildung 6.21 zeigt einen sol-

chen Lösungsprozess des Donors, der nach ca. 6,5 s einsetzt. Die Gesamtintensität nimmt ab, aber das Verhältnis zwischen Donor- und Akzeptorintensität bleibt gleich, da der partiell gelöschte Donor auch entsprechend weniger Energie an den Akzeptor abgeben kann. Der berechnete FRET-Verlauf zeigt deshalb keine Änderung nach dem Einsetzen der Fluoreszenzlöschung. Das FRET-Signal weist vor und nach der Abnahme der Gesamtintensität unverändert zwei gleiche, dominierende Zustände auf. Dies bedeutet, dass die Gesamtintensität tatsächlich durch einen Prozess der Fluoreszenzlöschung abgesunken ist. Wäre der Grund dieses Abfalls das Bleichen eines zweiten FRET-Komplexes gewesen, dessen Fluoreszenz fälschlicherweise zum Intensitätssignal beitrug, dann wären im dynamischen FRET-Signal vor dem Intensitätsabfall durch die Überlagerung mit der Intensität des zweiten FRET-Paares mehr dominierende Zustände erwartet worden als nach dem Gesamtintensitätsabfall.

Ein eventuelles Blinken des Donor-Fluorophor wiederum würde zum simultanen Aussetzen des Donor- *und* Akzeptorsignals führen und könnte somit durch die Betrachtung der Intensitäts-Zeitspuren beider Detektionskanäle leicht als photophysikalischer Artefakt erkannt werden. Eine Fehlinterpretation der FRET-Zeitspuren durch unerkanntes Donor-Blinken ist deshalb nicht zu befürchten.

Im Gegensatz zur Löschung der Donor-Fluoreszenz könnten Fluktuationen im photophysikalischen Verhalten des Akzeptors hingegen tatsächlich zu dynamischen FRET-Verläufen führen, wie sie in den durchgeführten Untersuchungen nach der zur NC2-Zugabe beobachtet wurde. Partielle bzw. gänzliche Löschung des Akzeptors sowie ISC-Übergänge des Fluorophors würden zu einer entsprechenden Intensitätsabnahme oder zum Ausfall des Akzeptorsignals führen. Die Intensität des Donorsignals würde hingegen steigen, da der Donor nicht mehr so viel Energie übertragen kann, wenn der Akzeptor gelöscht wird bzw. sich in einem Dunkelzustand befindet. Die FRET-Effizienz würde somit den Fluktuationen der Akzeptorintensität folgen.

Um solche Akzeptor-Fluktuationen als Grund für die beobachtete FRET-Dynamik ausschließen zu können, wurden die beschriebenen Experimente am TBP-DNA-NC2-Probensystem wiederholt und durch das msALEX-Anregungsverfahren erweitert. Die Abbildung 6.22 zeigt eine Messung dieser Untersuchung während der NC2-Zugabe. Das FRET-Signal geht bei der NC2-Zugabe (~ 10 s nach Messungsbeginn) von einem konstanten Wert, $E \approx 0,40$, in einen dynamischen Zustand über, der in

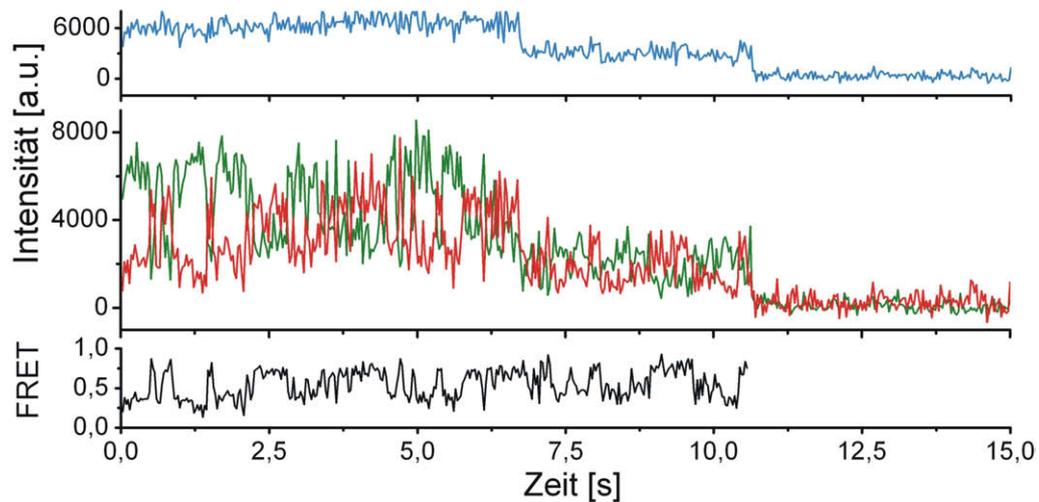


Abbildung 6.21.: Effekt der Fluoreszenzlöschung des Donors. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe von Donor- bzw. Akzeptor-Intensität (grün bzw. rot) sowie die FRET-Effizienz (schwarz) und die Gesamtintensität ($I_A + \gamma I_D$, blau) (30 ms/Bild). Nach ca. 6,5 s ist aufgrund partieller Fluoreszenzlöschung des Donors ein Abfall in der Gesamtintensität zu beobachten. Eine Änderung des FRET-Verhaltens ist jedoch nicht zu erkennen. Das FRET-Signal wird nicht durch die partielle Donorlöschung beeinflusst, da sich die FRET-Effizienz aus dem Verhältnis zwischen Akzeptor- und Gesamtintensität berechnet.

abrupten Sprüngen zwischen $E \approx 0,40$ und $E \approx 0,80$ fluktuiert und auch Abschnitte mit $E \approx 0,20$ aufweist. Die zeitlich parallel dazu beobachtete Akzeptor-Intensität der Direktanregung (in magenta eingetragen) hingegen zeigt keine Änderung des Signals nach der NC2-Zugabe. Diese Messungen demonstrieren, dass auch photophysikalische Fluktuationen des Akzeptor-Fluorophors als Grund für die FRET-Dynamik bei NC2-Bindung ausgeschlossen werden können.

Zum Beweis, dass mittels msALEX-Messungen tatsächlich FRET-Verläufe unterschieden werden können, deren Dynamik auf Akzeptor-Fluktuationen bzw. Abstandsänderungen zwischen Donor und Akzeptor zurückzuführen sind, ist in der Abbildung 6.23 einer der seltenen Fälle von zwischenzeitlichem Blinken des Akzeptors dargestellt. Bei diesen Ereignissen (~ 19 s und ~ 25 s) könnte ohne die zusätzliche Zeitspur durch die Akzeptor-spezifische Anregung nicht erkannt werden, dass der Einbruch des FRET-Signals ein photophysikalisches Artefakt der Akzeptor-Fluoreszenz darstellt.

6.2.5. Orientierung der FRET-Fluorophore

Ein weiterer Faktor, der die FRET-Effizienz beeinflussen kann, ist die räumliche Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor- und Akzeptor-Fluorophor zueinander. Wie in Abschnitt 3.2.1 erklärt, kann die Abhängigkeit des Förster-Radius R_0 eines FRET-Paares von der räumlichen Fluorophor-Ausrichtung durch den Orientierungsfaktor κ^2 beschrieben werden (Gleichung 3.21). Wenn von einer schnellen und freien Rotation der Fluorophore (*segmental motion*) um ihren Anbindungspunkt zum jeweiligen Biomoleküle ausgegangen werden kann, so mitteln sich die Ausrichtungen der Übergangsdipolmomente zu einem Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ [109]. Ist solch eine freie Fluorophor-Rotation nicht gewährleistet, könnte es bei sprunghaften Reorientierungen der Übergangsdipolmomente auf der ms-Zeitskala zu einer Dynamik im FRET-Verlauf kommen, wie sie in den durchgeführten TBP-DNA-NC2-Messungen beobachtet wurden.

Um die räumliche Flexibilität von Donor und Akzeptor zu überprüfen, wurden

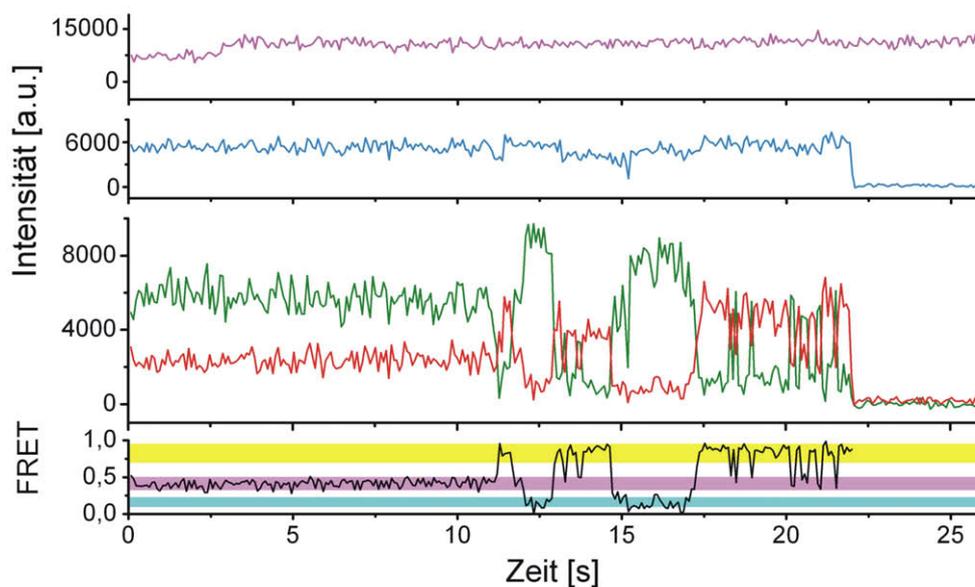


Abbildung 6.22.: Typischer FRET-Verlauf einer spFRET-msALEX-Messung während der NC2-Zugabe (80 ms/Bild). Die zusätzliche Zeitspur der Akzeptor-spezifischen Anregung (magenta) zeigt keine Änderungen des photophysikalischen Akzeptor-Verhaltens, während die FRET-Effizienz bei der NC2-Bindung von einem konstanten in einen dynamischen Verlauf übergeht.

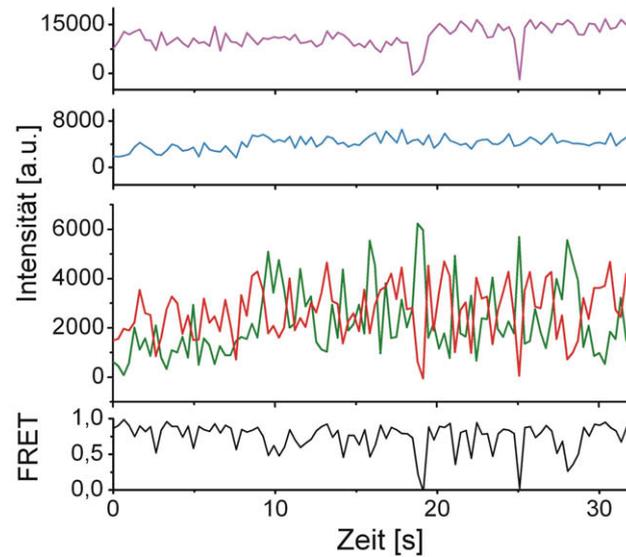


Abbildung 6.23.: Ein spFRET-msALEX-Verlauf, der ein selten auftretendes Blinken des Akzeptors zeigt (330 ms/Bild). Die Blinkereignisse führen zu einem starken Abfall im FRET-Signal (schwarz), können aber durch das zusätzliche Signal der Akzeptor-Direktanregung (magenta) als Artefakte des photophysikalischen Akzeptor-Verhaltens identifiziert werden.

zeitlich stationäre Anisotropiemessungen an Ensemble-Proben mit einem Fluoreszenzspektrometer (Edinburgh Instruments, F900) durchgeführt. Angeregt wurden Donor (Atto532) bzw. Akzeptor (Atto647) mit einer Wellenlänge von 532 nm bzw. 600 nm. Die detektierten Emissionsbereiche des Donors bzw. Akzeptors lagen bei 555 – 575 nm bzw. 640 – 660 nm. Für jede Emissionswellenlänge wurde die Anisotropie nach Gleichung 3.21 bestimmt. Der instrumentelle Korrekturfaktor G (Gleichung 3.16) wurde individuell für jede Messung ermittelt. Die resultierenden Anisotropiewerte r wurden als Mittelwerte über den jeweils untersuchten Emissionsbereich bestimmt.

Gemessen wurden die Fluoreszenz-Anisotropien des FRET-Donors an TBP ohne weitere Bindungspartner, zusammen mit (nicht-markierter) DNA und in TBP-DNA-NC2-Komplexen bei einer Konzentration der jeweiligen Komplexkomponente von 100 nM. Die Anisotropiewerte des FRET-Akzeptors an der Proben-DNA („DNA I“) wurden analog ohne Bindungspartner, mit (nicht-markiertem) TBP und zusammen mit TBP und NC2 bei jeweils 100 nM der einzelnen Komponenten gemessen. Um Artefakte während der Messung durch eine zu hohe Konzentration der einzelnen Komponenten ausschließen zu können, wurden die Anisotropiemessungen des

Akzeptors zusätzlich bei 10 nM für jeden Bindungspartner durchgeführt. Eine Vorinkubation mit TOA fand nicht statt.

Die Tabelle 6.1 fasst die Ergebnisse der durchgeführten Messungen zusammen. Die ermittelten Anisotropiewerte liegen für den Donor bei 0,13 bzw. 0,14; für den Akzeptor bei 0,16 bzw. 0,17. Die Messungen der Atto647-Anisotropie für die niedrigere Konzentration der Komplexkomponenten führte zu identischen Ergebnissen der Anisotropie. Artefakte bei einer Probenkonzentration von 100 nM können somit ausgeschlossen werden. Um aus den ermittelten Anisotropiewerten eine Interpretation für die freie Rotierbarkeit der Fluorophore ableiten zu können, müssen sie mit den zu erwartenden Werten der fundamentalen Anisotropie sowie der Rotations-Depolarisierung der Probenkomplexe verglichen werden.

Tabelle 6.1.: Gemessene Anisotropiewerte der verschiedenen Probenkomplexe.

Probenkomplex	Donor-Anisotropie (Atto532)	Akzeptor-Anisotropie (Atto647)
TBP ohne DNA	0,13	-
DNA ohne TBP	-	0,16
TBP + DNA	0,14	0,16
TBP + DNA + NC2	0,14	0,17

Nach Herstellerangaben gilt für den intrinsischen Winkel zwischen Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoment bei beiden Atto-Farbstoffen $\beta = 0$. Für die fundamentale Anisotropie beider Farbstoffe gilt somit nach Gleichung 3.7 $r_0 = 0,4$. Die Anisotropie aufgrund der Rotations-Depolarisierung der markierten Biomoleküle kann durch die Perrin-Gleichung 3.8 ermittelt werden. Wird nach [95] das spezifische Volumen \bar{v} des jeweiligen Biomolekülkomplexes mit einem Wert von 0,73 mL/g angenommen und der Beitrag der Hydrathülle des Komplexes mit $h = 0,23$ g H₂O pro g Biokomplex abgeschätzt, dann kann mit den molekularen Massen von TBP (27,0 kDa), DNA (46,2 kDa) und NC2 (41,8 kDa) nach Gleichung 3.10 die jeweilige Rotationskorrelationszeit ξ der unterschiedlichen Probenkomplexe ermittelt werden. Die Fluoreszenzlebensdauer τ des Donors beträgt 3,8 ns; die des Akzeptors 2,3 ns (Angaben des Herstellers). Die resultierenden Anisotropiewerte aus der fundamentalen Anisotropie und der Rotations-Depolarisierung, zusammengefasst nach

der Soleillet-Regel (Gleichung 3.12), sind in der Tabelle 6.2 aufgeführt. Mit zunehmendem Molekulargewicht des Probenkomplexes steigt auch die Anisotropie, da die Komplexrotation langsamer ist.

Tabelle 6.2.: Berechnete Anisotropiewerte, bei denen nur die fundamentale Anisotropie sowie die Depolarisierung basierend auf der Rotation der Probenkomplexe berücksichtigt wurde.

Probenkomplex	Donor-Anisotropie (Atto532)	Akzeptor-Anisotropie (Atto647)
TBP ohne DNA	0,31	-
DNA ohne TBP	-	0,36
TBP + DNA	0,36	0,38
TBP + DNA + NC2	0,38	0,39

Im Vergleich zu den berechneten Anisotropien, die keine selbständigen Fluorophorbewegungen (*segmental motions*) berücksichtigen (Tab. 6.2) liegen die tatsächlichen Anisotropiewerte der Probenkomplexe (Tab. 6.1) signifikant niedriger, was nur auf die zusätzliche Möglichkeit der freien Fluorophor-Rotation zurückgeführt werden kann. Diese Beobachtung rechtfertigt somit die Annahme für $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ und zeigt, dass die beobachtete FRET-Dynamik nach der NC2-Zugabe nicht durch Änderungen der Übergangsdipol-Orientierungen von Donor oder/und Akzeptor erklärt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, die freie Rotierbarkeit der Fluorophore zu überprüfen, ist die Betrachtung von FRET-Verläufen, bei denen der Donor partiell gelöscht wird [110]. Die bereits diskutierte Abbildung 6.21 zeigt einen solchen Verlauf. Würde die Dynamik des FRET-Signal auf anisotrope Artefakte der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz basieren, müsste die Löschung des Donors auch das Verhalten der FRET-Effizienz beeinflussen. Die Löschung führt zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer und somit zu einer Erhöhung der Donor-Anisotropie (Perrin-Gleichung). Eine Änderung des dynamischen Verhaltens im FRET-Verlauf der Abbildung 6.21 ist bei der Donorlöschung jedoch nicht zu erkennen, sodass auch durch diese Beobachtung die freie Drehbarkeit der Fluorophore nachgewiesen worden ist.

Durch die Abhängigkeit des Förster-Radius vom Wert des Orientierungsfaktors (Gleichung 3.21) können zusätzlich die möglichen Extremwerte der FRET-

Effizienzen errechnet werden, die nur auf den Reorientierungsbewegungen der Fluorophore basieren. Im Anhang F ist eine entsprechende Berechnung des möglichen FRET-Bereichs mit den gemessenen Fluoreszenz-Anisotropien durchgeführt worden. Unter der Annahme, dass der stark populierte FRET-Zustand des TBP-DNA-NC2-Komplexes bei 43 % (Abb. 6.10) den minimalen Grenzwert des FRET-Bereichs darstellt, ergab sich der maximale Grenzwert, der mit den gemessenen Anisotropiewerten des TBP-DNA-NC2 erreicht werden kann, zu 89 %. Theoretisch könnten die beobachteten FRET-Fluktuationen zwischen $\sim 40\%$ und $\sim 80\%$ statt durch dynamische TBP-NC2-Bewegungen oder TBP-DNA-Konformationsänderungen somit auch durch eine abrupte Reorientierung der Fluorophore zustande kommen.

Diese Erklärung der FRET-Dynamik muss jedoch als extrem unwahrscheinlich angesehen werden, da die abgeschätzten FRET-Werte durch die gemessenen Anisotropiewerte Extremfälle darstellen, bei denen der Einfluss des Orientierungsfaktors oft überschätzt wird [95]. Eine solche Begründung der Dynamik würde zudem bedeuten, dass die Übergangsdipolmomente bei $E \approx 0,40$ ideal für den minimalsten FRET-Wert zueinander ausgerichtet sind während sie bei $E \approx 0,80$ nahezu perfekt für den maximalsten FRET-Wert orientiert sein müssten (vgl. hierzu Abschnitt 3.2.1). Ein solch idealer „optischer Schalter“ aus zwei unabhängig voneinander eingebrachten Fluorophoren in einem Komplex aus drei Biomolekülen ist kaum vorstellbar. Jeder Versuch, gezielt einen solchen Schalter auf biomolekulare Ebene zu entwerfen, schlug bisher fehl (private Korrespondenz mit Robert Clegg).

Ein weiteres Argument gegen die Erklärung der FRET-Dynamik aufgrund der möglichen Extremwerte des Orientierungsfaktors ist die Tatsache, dass der Donor-Akzeptor-Abstand mit den geänderten Förster-Radien nur noch 54 \AA beträgt (Berechnung im Anhang F). Nach den Abstandsmessungen in der TBP-DNA-Kristallstruktur (Abb. 6.18) sollte die Distanz zwischen Donor und Akzeptor jedoch mindestens 60 \AA betragen.

6.3. Diskussion der Ergebnisse zur Wirkung von NC2

Mit den durchgeführten spFRET-Untersuchungen konnte die Wirkung des Negativen Cofaktors 2 (NC2) auf den DNA-gebundenen Generellen Transkriptionsfaktor TBP an individuellen Komplexen direkt verfolgt werden. Verbindungen aus Sequenzspezifisch gebundenem TBP am AdML-Promotor wurden als stabile Komplexe beobachtet, die in einer definierten Konformation ein zeitlich konstantes FRET-Signal zeigten. Durch die Bindung von NC2 gingen die stabilen Komplexe in Verbindungen über, die eine dynamische Veränderung des Donor-Akzeptor-Abstandes aufwiesen. Mit umfassenden Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Änderungen des FRET-Signals unter anderem durch eine Bewegung des TBP-NC2-Komplexes entlang des DNA-Strangs hervorgerufen wurden.

Die Ergebnisse der aufgenommenen FRET-Dynamik lassen darauf schließen, dass es nach der NC2-Bindung einerseits zu einer dynamischen Konformationsänderung des TBP-DNA-NC2-Komplexes kommt, die als Beugen und Strecken der DNA interpretiert werden könnte. Andererseits zeigt die Dynamik jedoch auch FRET-Zustände, die nur durch eine nicht-prozessive Bewegung von TBP-NC2 entlang der DNA erklärt werden können. Diese Beobachtungen bestätigen die erläuterte Hypothese, dass NC2 zu einer Delokalisierung von TBP auf der DNA führt (Abb. 2.12).

Bekräftigt wird dieses Ergebnis durch vorangegangene Erkenntnisse aus biochemischen Untersuchungen. Eine molekular strukturelle Voraussetzung für die Bewegung von TBP entlang des DNA-Stranges stellt die ringförmige Komplexierung mit NC2 dar (Abb. 2.9). Zudem weist TBP zusammen mit NC2 eine deutlich erhöhte Affinität zu DNA-Sequenzen auf, die nicht TBP-spezifisch sind [87].

Die identischen spFRET-Ergebnisse, die mit der stark veränderten AdML-Promotorsequenz erhalten wurden („DNA VIII“), deuten außerdem darauf hin, dass die beobachtete TBP-Mobilisierung keine Promotor-spezifische Wirkung von NC2 darstellt. Der Kern des Promotors, die TATA-Box, wurde für diese Untersuchungen jedoch nicht verändert. Um eine abschließende Aussage zur Gültigkeit des NC2-Effektes auf TBP-Promotor-Komplexe im Allgemeinen treffen zu können, sollten zusätzlich analoge spFRET-Untersuchungen an Promotoren vorgenommen werden, deren TATA-Box sich deutlich von der AdMLP-Sequenz unterscheidet.

Ein Problem bei FRET-Untersuchungen stellt die Tatsache dar, dass es zwischen Donor und Akzeptor nur dann zu einem Resonanz-Energietransfer kommen kann, wenn sich die Fluorophore nicht weiter als $\sim 100 \text{ \AA}$ entfernt voneinander befinden. Der Verlauf der FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Abstand der Fluorophore (Abb. 3.6) verdeutlicht, dass das untersuchte TBP-DNA-Probensystem mit $E = 0,40$ ($R = 64 \text{ \AA}$) einen Ausgangswert aufwies, der im höchstsensitiven FRET-Bereich des Donor/Akzeptor-Paares lag ($R \approx 35 \dots 85 \text{ \AA}$). Dies bedeutet jedoch auch, dass der Bereich dieser Probe, in dem ein FRET-Signal erwartet werden konnte, nur eine Abstandserweiterung von 36 \AA erlaubte. Bei größeren Fluorophor-Abständen kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Bezogen auf einen gestreckten B-DNA-Strang entspricht dieser maximale Abstand nur etwas mehr als 10 Basenpaare. Die beobachteten FRET-Zeitspuren mit der DNA-Probe, bei der der Akzeptor in der Nähe der TATA-Box positioniert wurde, konnten somit auch nur eine potentielle TBP-NC2-Bewegung in TATA-Nähe zeigen.

Durch zusätzliche spFRET-Untersuchungen mit Proben-DNA, bei der die Akzeptoren an den Enden des DNA-Stranges statt in der Nähe der TATA-Box positioniert waren, wurde jedoch ein statistischer Anstieg der Komplexe beobachtet, die sich nach NC2-Zugabe am DNA-Ende befanden und dort ein FRET-Signal erzeugten. Durch die Umpositionierung des FRET-Akzeptors konnte somit nachgewiesen werden, dass die TBP-NC2-Mobilität nicht auf die TATA-Box oder deren unmittelbaren Umgebung begrenzt ist. TBP-NC2 kann vielmehr bis an das Strangende der DNA wandern. Biochemisch wurde die große Reichweite der TBP-NC2-Mobilität ebenfalls durch CRIP-Experimente nachgewiesen (vgl. Abschnitt 6.1.10).

Ein indirekter Nachweis des weiten Mobilitätsbereiches von TBP-NC2 liegt in der Beobachtung, dass bei biochemischen Experimenten von Prof. Meisterernst und seinen Mitarbeitern, in denen *mehrere* TBP-NC2-Komplexe an einer *einzelnen* Proben-DNA gebunden sind, die Halbwertszeit von TBP-NC2 auf der DNA erhöht wurde. Wird ein kooperativer Effekt der benachbarten TBP-NC2-Komplexe auf einem DNA-Strang ausgeschlossen, zeigt dieses Ergebnis, dass die Dissoziation von TBP-DNA-NC2-Komplexen hauptsächlich durch das Runterfallen der TBP-NC2-Ringkomplexe über das Ende des DNA-Stranges geschieht [4]. Dies würde bedeuten, dass TBP-NC2 tatsächlich über die gesamte DNA-Länge mobil sein muss.

Zusammenfassend wurde durch die präsentierten Einzelmolekül-Untersuchungen an TBP-DNA-NC2-Komplexen gezeigt, dass die Bindung von NC2 einen destabilisierenden Effekt auf die gebeugte TBP-DNA-Konformation hat und zur Mobilisierung von TBP entlang der DNA führt. Zellbiologisch stellt eine solche TBP-Mobilisierung von der TATA-Box einen effektiven Mechanismus der Transkriptionshemmung durch NC2 dar, da sich ohne korrekt gebundenes TBP auf der TATA-Box der Präinitiiierende Komplex (PIC) zur DNA-Transkription nicht bilden kann (Abb. 2.5).

Die TBP-Mobilität kann aber ebenfalls erklären, warum der Negative Cofaktor 2 neben seiner hemmenden Eigenschaft auch eine starke Assoziation zu Genen mit hoch aktiven Promotoren zeigt. So ist es vorstellbar, dass eine schnellere Transkriptions-Reinitiiierung möglich ist, wenn TBP nach Auflösen des PIC nicht von der DNA dissoziiert, sondern sich mit Hilfe von NC2 um eine gewisse Strecke von der TATA-Box weg bewegt und anschließend für die nächste Transkriptionsinitiiierung wieder an die TATA-Box bindet. Damit könnte die Zelle die Reinitiiierung über die lokale Konzentration eines Transkriptionsfaktors steuern, der in direkter Bindungskonkurrenz zu NC2 steht (z. B. TFIIA).

Eine weitere positive NC2-Wirkung würde die Möglichkeit darstellen, dass TBP-Moleküle, die an schwachen Promotorregionen gebunden sind, durch die NC2-Mobilisierung an stärkere Promotoren relokalisiert werden. Dieses Bild würde auch mit den hier präsentierten Ergebnissen am starken AdML-Promotor übereinstimmen, die eine dominierende Dynamik an der TATA-Box (DNA-Beugen/-Strecken) und seltener eine Delokalisierung von TBP zeigen.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden umfassende Einzelmolekül-Untersuchungen zur Dynamik der Komplexe aus dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und dem Negativen Cofaktor 2 (NC2) auf dem AdML-Promotor durchgeführt. Die Bewegung der Transkriptionsfaktoren wurde an individuellen Proben-Komplexen mit Hilfe von spFRET-Messungen untersucht, die an einem ultrasensitiven TIRF-Mikroskop durchgeführt wurden.

Dieses umfangreiche Mikroskopiesystem ist so aufgebaut worden, dass es neben den zwei unterschiedlichen Arten der TIRF-Mikroskopie - Prisma-TIRFM und Objektiv-TIRFM - auch die herkömmliche Epi-Fluoreszenzmikroskopie sowie die Durchlichtmikroskopie mit differentiellm Interferenzkontrast ermöglicht. Mit den verschiedenen TIRFM-Apparaturen des Mikroskopiesystems sind hochempfindliche Einzelmolekül-Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch an lebenden Zellen möglich. Die herkömmliche Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie und die Durchlichtmikroskopie der Apparatur können bei *in vivo*-Experimenten zur weiteren Charakterisierung der Zellproben genutzt werden. Zur Durchführung der spFRET-Messungen wurde eine Zweifarben-EMCCD-Detektion installiert, durch die das Donor- und Akzeptorsignal simultan aufgenommen werden konnte.

Aus biochemischen Untersuchungsergebnissen zum Mechanismus der Transkriptionshemmung durch NC2 wurde die Hypothese abgeleitet, dass der Negative Cofaktor zu einer Mobilisierung des TBP entlang des DNA-Stranges führt. Um diese Hypothese durch die direkte Beobachtung einzelner TBP-DNA-NC2-Komplexe zu überprüfen, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Michael Meisterernst und seinen Mitarbeitern ein *in vitro*-Experiment entwickelt, das die Untersuchung der Dynamik des Probensystems mittels spFRET-Messungen ermöglichte. Die direkte Beobachtung der NC2-Wirkung an individuellen TBP-DNA-Komplexen konnte mit Hilfe

eines automatisierten Mikro-Flusssystems durchgeführt werden, das für die NC2-Zugabe während einer laufenden Messung entwickelt wurde.

Die spFRET-Untersuchungen wurden mit einer Prisma-TIRFM-Konfiguration durchgeführt, bei der das Prisma selbst den oberen Teil der verwendeten Probenflusskammer darstellte. Für die Messungen wurden die Proben-Komplexe auf der Prismaoberfläche immobilisiert. Um mögliche Artefakte durch die Oberflächenaffinität der Probenmoleküle zu vermeiden, wurde eine wirksame Modifizierung der Prismaoberfläche durch Silanisierung und PEG-Beschichtung erarbeitet. Zur Auswertung der aufgenommenen spFRET-Daten wurde ein Computerprogramm entwickelt, womit die automatisch extrahierten Intensitäts-Zeitspuren der Donor-Akzeptor-Paare in umfangreicher Weise manuell analysiert werden konnten.

Die spFRET-Untersuchungen des TBP-AdMLP-Komplexes zeigten vor der Bindung von NC2 einen stabilen Komplex, der durch die Vorinkubation mit dem TFIIA-Hefehomolog TOA einen eng definierten FRET-Zustand aufwies. Ohne eine Vorinkubation mit TOA konnte die zusätzliche Besetzung einer alternativen TPB-Bindungsorientierung an der DNA beobachtet werden.

Mit der Zugabe von NC2 gingen die zeitlich konstanten FRET-Verläufe der einzelnen TBP-DNA-Komplexe in Zeitspuren über, die einen dynamischen Verlauf aufwiesen. Die Analyse dieser FRET-Dynamik zeigte schnelle Fluktuationen zwischen zwei dominierenden Zuständen, die als Streck- und Beugbewegungen der DNA interpretiert werden konnten. Diese Fluktuationen stellen somit nur eine Änderung der TBP-DNA-Komplexkonformation dar. Darüber hinaus zeigten die dynamischen FRET-Zeitspuren jedoch auch Zustände, die nur durch eine zusätzliche Abstandserweiterung zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor erklärbar sind. Diese Zustände deuten deshalb auf eine tatsächliche TBP-NC2-Mobilität entlang der DNA hin, was eine TBP-Depopulierung der TATA-Box durch NC2 bedeutet. Mit spFRET-Untersuchungen an DNA-Molekülen, bei denen die FRET-Akzeptoren am Strangende statt in der Mitte positioniert wurden, konnte zudem gezeigt werden, dass der TBP-NC2-Komplex auf dem Doppelstrang bis an das Ende der DNA wandern kann.

Durch weitere spFRET-Untersuchungen konnte verifiziert werden, dass die beobachtete Art der FRET-Dynamik unabhängig von der Länge der Promotorsequenz oder der Immobilisierungsrichtung der Probe auf der Prismaoberfläche ist. Ebenso

konnte gezeigt werden, dass die starke G-Flankierung der AdMLP-TATA-Box zwar zu einer erhöhten Bindungsaffinität zwischen TBP und TATA führt, aber keinen Einfluss auf die Art der Dynamik durch die NC2-Bindung hat.

Kontrollexperimente mit AdML-Promotoren, die eine neue Fluorophor-Paarung für den Resonanz-Energietransfer sowie alternative Markierungspositionen des Akzeptors aufwiesen, zeigten weder im stationären Verhalten vor der NC2-Zugabe noch im dynamischen Verhalten nach der Bindung des Cofaktors einen qualitativen Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen. Des Weiteren konnte die Photophysik des Akzeptors als möglicher Grund für die FRET-Dynamik ausgeschlossen werden. Hierzu wurde das TIRF-Mikroskop mit einem Shutter-System erweitert, dass es ermöglichte durch msALEX-Messungen das Emissionsverhalten des Akzeptors während einer Messung unabhängig von der FRET-Anregung zu beobachten. Mit Fluoreszenz-Anisotropiemessungen an Ensemble-Proben konnte außerdem gezeigt werden, dass die Donor- und Akzeptor-Fluorophore frei im Raum rotieren können, wodurch auch anisotrope Artefakte als möglicher Grund für die FRET-Dynamik ausgeschlossen werden konnten. Zusammenfassend wurde mit diesen umfangreichen Kontrollexperimenten nachgewiesen, dass es sich bei der FRET-Dynamik tatsächlich um die Beobachtung von Abstandsänderungen der FRET-Fluorophore handelt.

Durch die präsentierten Forschungsergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Wirkung von NC2 auf den TBP-DNA-Komplex konnte die Hypothese der TBP-NC2-Mobilität bestätigt werden. Die durchgeführten spFRET-Untersuchungen ermöglichten eine detaillierte Beschreibung der Moleküldynamik durch die Beobachtung der Bewegung von individuellen Probenkomplexen und stellen die erste Einzelmolekül-Analyse zur Wirkung von Transkriptions-Cofaktoren auf sequenz-spezifisch gebundene GTFs dar.

Das bisherige Verständnis zur PIC-Formierung basierte auf einem statischen Bild der Kernpromotor-Erkennung durch die Generellen Transkriptionsfaktoren. Mit der hier nachgewiesenen Erkenntnis, dass die fest gebundenen GTFs durch die Komplexierung mit Transkriptions-Cofaktoren mobilisiert werden können, sind neue Regulierungsmöglichkeiten der DNA-Transkription vorstellbar, die bisher nicht erkannt oder erklärt werden konnten.

8. Ausblick

Die Ergebnisse der durchgeführten spFRET-Untersuchungen des TBP-DNA-NC2-Systems geben bereits eine sehr umfangreiche Analyse zur Wirkung des Negativen Cofaktors 2 auf TBP-DNA-Komplexe wieder. Aus den gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich viele neue und interessante Fragen.

Besonders wichtig erscheint die Frage, ob die beobachtete Wirkung von NC2 auf TBP eine Gültigkeit für Promotor-Sequenzen im Allgemeinen besitzt oder ob sie eine spezielle Eigenschaft von NC2 in Verbindung mit dem AdML-Promotor darstellt. Um diese Frage zu beantworten, sollten spFRET-Untersuchungen auch mit anderen Promotoren wie z. B. H2B oder IL2 durchgeführt werden.

Ebenfalls sehr wichtig ist es, einen endgültigen Beweis für die erläuterte Annahme zu finden, dass die schnelle FRET-Fluktuation zwischen den beiden dominierenden Zuständen tatsächlich die DNA-Konformationsänderung zwischen gebeugtem und gestrecktem Zustand darstellt (vgl. Abschnitt 6.1.7). Andernfalls müssten die Fluktuationen als schnelle Sprünge zwischen zwei bevorzugten TBP-NC2-Bindungsstellen auf der DNA interpretiert werden.

Für diese Untersuchungen sind spFRET-Messungen geplant, bei denen FRET-Donor und -Akzeptor auf dem selben DNA-Doppelstrang positioniert sind. Die Messungen werden entsprechend mit nicht-markiertem TBP durchgeführt. Aus einem qualitativ gleichwertigen Verlauf der FRET-Fluktuationen nach der NC2-Bindung kann geschlossen werden, dass die Fluktuationen tatsächlich durch DNA-Konformationsänderungen hervorgerufen werden. Ebenfalls für diese Fragestellung vorbereitet ist die Untersuchung mit einem Akzeptor-markiertem AdML-Promotor, der eine Punktmutation in der TATA-Box aufweist (*TGTAAAA* statt *TATAAAA*). Von dieser Mutante wird ein deutlich verändertes Beugungsverhalten im TBP-DNA-Komplex erwartet. Da der Rest der Promotorsequenz sowie die Position des Akzeptors unverändert zu den vorangegangenen Untersuchungen bleibt, sollte ein direkter

Vergleich mit den bisherigen Verläufen der FRET-Dynamik weitere Aufschlüsse über die Ursache der schnellen FRET-Fluktuationen ermöglichen.

Mit der Punktmutation in der TATA-Box des AdML-Promotors kann zusätzlich überprüft werden, ob das in der FRET-Verteilung vor NC2-Zugabe häufig beobachtete Nebenmaximum bei $\sim 20\%$ FRET (z. B. in Abb. 6.6) eventuell dadurch entsteht, dass sich TBP auch zwei Basen stromabwärts verschoben an die TATA-Box binden kann (also an *TAAAA...*, statt an *TATAA...*). Sollte diese Annahme stimmen, dann wird erwartet, dass die Verteilung der zeitlich konstanten FRET-Verläufe mit der AdMLP-Punktmutante vor der NC2-Zugabe nur noch ein, statt zwei Maxima aufweist. Aufgrund der geänderten DNA-Beugung durch die Punktmutation kann jedoch nicht vorausgesagt werden, bei welcher FRET-Effizienz ein solches Maximum liegen sollte.

Die Datenauswertungen zu dieser Arbeit beschränkten sich bisher nur auf qualitative Betrachtungen der aufgenommenen FRET-Verläufe. Um die Kinetik der hochdynamischen Zeitspuren nach der NC2-Bindung genauer zu untersuchen, ist eine Analyse der Daten mit Hilfe des *Hidden-Markov-Modells* (HMM) [147] geplant. Dieses statistische Verfahren kann zum Fitten von Daten angewendet werden, die diskreten Sprünge zwischen verschiedenen Zuständen aufweisen. Mit der HMM-Analyse können neben der Identifizierung der Zustandsstufen auch die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den einzelnen Stufen sowie die mittlere Verweildauer der jeweiligen Zustände ermittelt werden. Erst kürzlich veröffentlichte Publikationen zeigen, dass die HMM-Analyse erfolgreich für die Auswertung von Einzelmolekül-Untersuchungen angewandt werden kann [147, 148]. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Börsch und seinen Mitarbeitern sind bereits Voruntersuchungen an dynamischen spFRET-Verläufen durchgeführt worden.

Mit Hilfe des entwickelten Analyseprogramms von Dipl.-Phys. Nawid Zarrabi wurde eine vorläufige Untersuchung der FRET-Kinetik an 59 einzelnen FRET-Verläufen der dynamischen TBP-DNA-NC2-Probe mit hoher zeitlicher Auflösung (30 ms/Bild, vgl. Abschnitt 6.1.7) durchgeführt. Die Abbildung 8.1 zeigt die ermittelten Stufenlängen eines HMM-Fits (rot) für einen individuellen FRET-Verlauf (schwarz). Die zugrundeliegenden Stufenhöhen für diesen Fit basieren auf den globalen Analyseergebnissen aller 59 Verläufe, die zu drei FRET-Zuständen bei

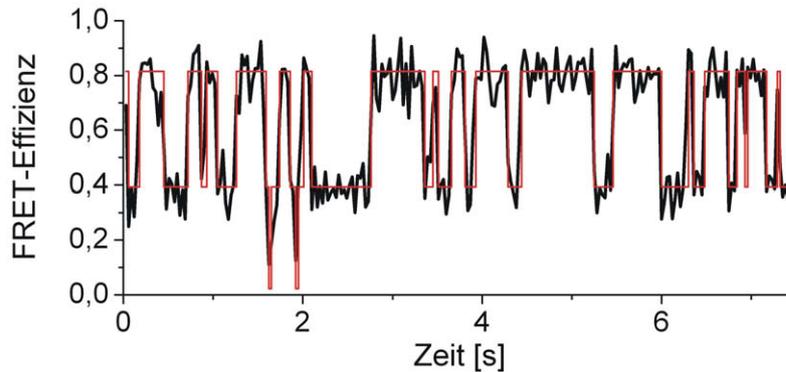


Abbildung 8.1.: Exemplarischer spFRET-Verlauf (schwarz, 30 ms/Bild) mit überlagertem Fit (rot) der HMM-Analyse.

$E = 0,02, 0,39$ und $0,81$ führten. Die dominierenden Zustände bei $\sim 40\%$ und $\sim 80\%$ konnten also auch durch die HMM-Analyse bestätigt werden. Probleme hingegen zeigten sich bei der korrekten Bestimmung der niedrigsten Stufe von $\sim 20\%$. Wie im überlagerten Verlauf der FRET-Effizienz zu sehen ist, liegt die vom HMM ermittelte Stufe zu tief, was unter Umständen auf eine zu geringe Anzahl der in der Analyse integrierten FRET-Verläufe zurückzuführen ist. Außerdem wurde bereits die Notwendigkeit von weiteren Anpassungen der verwendeten HMM-Fitroutine erkannt, die noch zuverlässigere Ergebnisse der Auswertungstechnik bringen soll. Die mittlere Verweilzeiten τ für die unterschiedlichen Stufen wurden durch das Auswertungsprogramm zu $\tau_{0,02} = 96$ ms, $\tau_{0,39} = 139$ ms und $\tau_{0,81} = 224$ ms bestimmt.

Die Voruntersuchungen für die Anwendung der HMM-Analyse zur Datenauswertung der spFRET-Verläufe zeigt somit bereits vielversprechende Ansätze. Mit diesem speziellen Analyse-Verfahren soll untersucht werden, ob sich die Kinetik der TBP-NC2-Dynamik an den verschiedenen Promotoren (unterschiedlich in Länge oder Sequenz) unterscheidet, um so noch detailliertere Aussagen über die Wirkung von NC2 treffen zu können.

Im Laufe dieser Arbeit wurden auch spFRET-Messungen durchgeführt, bei denen die TBP-Bindungsvorgänge auf der DNA beobachtet wurden. Wie in Abschnitt 2.4.2 erläutert, konnte bereits durch Einzelmolekül-Untersuchungen mit der *Optical Tweezer*-Technik gezeigt werden, dass TBP in mehreren diskreten Schritten an die TATA-Box bindet (Abb. 2.7) [69]. Die vorläufigen Ergebnisse der spFRET-

Messungen, bei denen ohne eine Vorinkubation die DNA auf der Oberfläche immobilisiert und anschließend die TBP-Zugabe aufgenommen wurde, zeigten ebenfalls diskrete Schritte im Bindungsverhalten von TBP (Abb. 8.2). Der Übergang zwischen den einzelnen FRET-Zuständen geschieht in diskreten Sprüngen, sodass die verschiedenen Stufen gut zu erkennen sind.

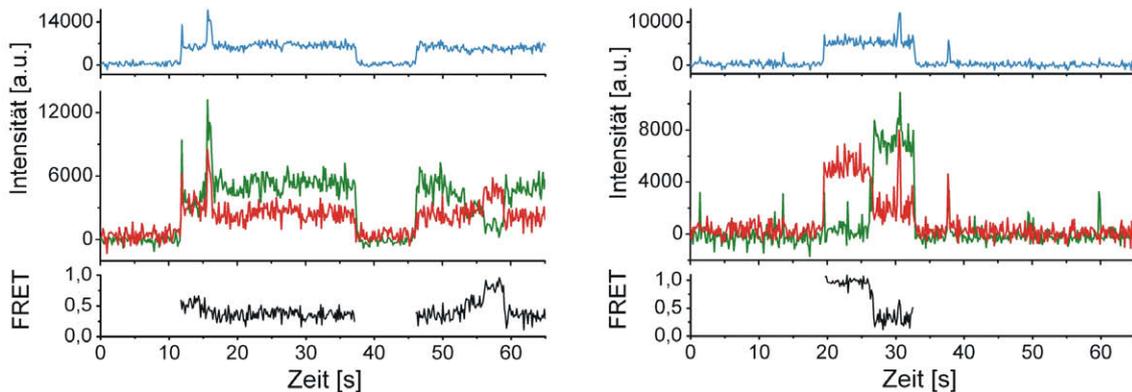


Abbildung 8.2.: Typische FRET-Verläufe bei Messungen während der TBP-Zugabe (150 ms/Bild). Der Bindungsvorgang von TBP auf der DNA geschieht in zeitlich diskreten Schritten, mit unterschiedlichen FRET-Zuständen. Die zu erkennenden Ausreißer der Intensitätssignale entstehen durch TBP-Moleküle, die nur kurzfristig an DNA-Moleküle in unmittelbarer Nähe zum beobachteten spFRET-Komplex binden.

Für eine vorläufige Auswertung der FRET-Zeitspuren wurden die FRET-Mittelwerte der Stufen, die mindestens über einen Zeitraum von 1,5 s (10 Bilder) konstant waren und eine maximale Standardabweichung des FRET-Signals von $\sigma_E \leq 0,1$ aufwiesen, in einem Histogramm zusammengefasst (Abb. 8.3). Das Ergebnis zeigt vier deutlich getrennte FRET-Zustände, die während des TBP-Bindungsvorganges an der DNA auftreten. Durch weitere spFRET-Messungen an unterschiedlichen DNA-Proben sollen die erkannten intermediären Zustände ausführlicher untersucht werden. Auch für diese Untersuchungen ist eine Datenauswertung mittels HMM-Analyse geplant, um die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen bestimmen zu können. Auf diese Weise sollte es möglich sein, den Mechanismus des Bindungsvorganges auf der Basis einzelner Komplexe zeitlich aufgelöst zu beschreiben. Dabei bietet die spFRET-Technik gegenüber den *Optical Tweezer*-Messungen den Vorteil, dass eine Vielzahl von einzelnen Molekülen simultan beobachtet werden können, wodurch bessere Statistiken entstehen. Außerdem können Artefakte durch

die Verwendung einer vergleichsweise riesigen Kugel, die bei der *Optical Tweezer*-Technik am Biomolekül angebracht werden muss, bei spFRET-Untersuchungen nicht auftreten.

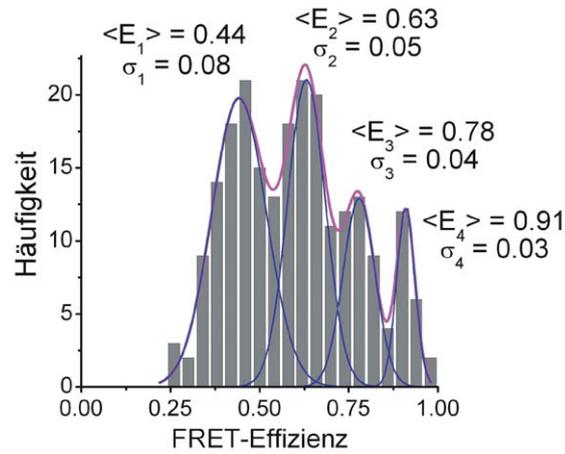


Abbildung 8.3.: Histogramm der mittleren FRET-Effizienzen von 223 Stufen, die während des TBP-Bindungsvorganges beobachtet wurden.

Literaturverzeichnis

- [1] WATSON, J. D. ; CRICK, F. H.: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature* 171 (1953), Nr. 4356, S. 737–8
- [2] MEISTERERNST, M. ; ROEDER, R. G.: Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. In: *Cell* 67 (1991), Nr. 3, S. 557–67
- [3] KAMADA, K. ; SHU, F. ; CHEN, H. ; MALIK, S. ; STELZER, G. ; ROEDER, R. G. ; MEISTERERNST, M. ; BURLEY, S. K.: Crystal structure of Negative Cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. In: *Cell* 106 (2001), Nr. 1, S. 71–81
- [4] SCHLUESCHE, P. ; STELZER, G. ; PIAIA, E. ; LAMB, D. C. ; MEISTERERNST, M.: A dynamic model for class II gene promoter targeting involving mobile TBP-NC2 complexes. In: *Nature Structural & Molecular Biology* (2007). – under revision
- [5] AXELROD, D.: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. In: TAYLOR, D. (Hrsg.) ; WANG, Y. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology, Vol. 30*. New York : Academic Press, 1989, Kapitel 9, S. 245–270
- [6] CLEGG, R. M.: Fluorescence Resonance Energy Transfer. In: WANG, X. F. (Hrsg.) ; HERMAN, B. (Hrsg.): *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1996. – ISBN 0–471–01527–X, Kapitel 7, S. 179–252
- [7] SCHULER, B. ; LIPMAN, E. A. ; STEINBACH, P. J. ; KUMKE, M. ; EATON, W. A.: Polyproline and the „spectroscopic ruler“ revisited with single-molecule fluorescence. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Nr. 8, S. 2754–9

- [8] BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L.: *Biochemie*. 5. Aufl. Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2003. – ISBN 3–8274–1303–6
- [9] ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WALTER, P.: *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. New York : Garland Science, 2002. – ISBN 0–8153–3218–1
- [10] WATSON, J. D. ; CRICK, F. H.: Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. In: *Nature* 171 (1953), Nr. 4361, S. 964–7
- [11] CRAMER, P. ; BUSHNELL, D. A. ; KORNBERG, R. D.: Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. In: *Science* 292 (2001), Nr. 5523, S. 1863–76
- [12] GNATT, A. L. ; CRAMER, P. ; FU, J. ; BUSHNELL, D. A. ; KORNBERG, R. D.: Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. In: *Science* 292 (2001), Nr. 5523, S. 1876–82
- [13] VOET, D. ; VOET, J. G. ; PRATT, C. W.: *Fundamentals of Biochemistry*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1999. – ISBN 0–471–58650–1
- [14] LODISH, H. ; BERK, A. J. ; MATSUDAIRA, P. ; KAISER, C. ; KRIEGER, M. ; SCOTT, M. ; ZIPURSKY, L. ; DARNELL, E. J.: *Molecular Cell Biology*. 5. ed. New York : Scientific American Press, 2004. – ISBN 0–7167–4366–3
- [15] DORIT, R. L. ; SCHOENBACH, L. ; GILBERT, W.: How big is the universe of exons? In: *Science* 250 (1990), Nr. 4986, S. 1377–82
- [16] CRICK, F. H. ; BARNETT, L. ; BRENNER, S. ; WATTS-TOBIN, R. J.: General nature of the genetic code for proteins. In: *Nature* 192 (1961), S. 1227–32
- [17] NIKOLOV, D. B. ; BURLEY, S. K.: RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 1, S. 15–22
- [18] TRINKLEIN, N. D. ; ALDRED, S. J. ; SALDANHA, A. J. ; MYERS, R. M.: Identification and functional analysis of human transcriptional promoters. In: *Genome Res* 13 (2003), Nr. 2, S. 308–12

-
- [19] KIM, T. H. ; BARRERA, L. O. ; ZHENG, M. ; QU, C. ; SINGER, M. A. ; RICHMOND, T. A. ; WU, Y. ; GREEN, R. D. ; REN, B.: A high-resolution map of active promoters in the human genome. In: *Nature* 436 (2005), Nr. 7052, S. 876–80
- [20] SMALE, S. T. ; KADONAGA, J. T.: The RNA polymerase II core promoter. In: *Annu Rev Biochem* 72 (2003), S. 449–79
- [21] LAGRANGE, T. ; KAPANIDIS, A. N. ; TANG, H. ; REINBERG, D. ; EBRIGHT, R. H.: New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. In: *Genes Dev* 12 (1998), Nr. 1, S. 34–44
- [22] JUO, Z. S. ; CHIU, T. K. ; LEIBERMAN, P. M. ; BAIKALOV, I. ; BERK, A. J. ; DICKERSON, R. E.: How proteins recognize the TATA box. In: *J Mol Biol* 261 (1996), Nr. 2, S. 239–54
- [23] KUTACH, A. K. ; KADONAGA, J. T.: The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 13, S. 4754–64
- [24] KOLESKE, A. J. ; YOUNG, R. A.: The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. In: *Trends Biochem Sci* 20 (1995), Nr. 3, S. 113–6
- [25] REINBERG, D. ; ORPHANIDES, G. ; EBRIGHT, R. ; AKOULITCHEV, S. ; CARAMO, J. ; CHO, H. ; CORTES, P. ; DRAPKIN, R. ; FLORES, O. ; HA, I. ; INOSTROZA, J. A. ; KIM, S. ; KIM, T. K. ; KUMAR, P. ; LAGRANGE, T. ; LEROY, G. ; LU, H. ; MA, D. M. ; MALDONADO, E. ; MERINO, A. ; MERMELSTEIN, F. ; OLAVE, I. ; SHELDON, M. ; SHIEKHATTAR, R. ; ZAWEL, L. ; AL. et: The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63 (1998), S. 83–103
- [26] ORPHANIDES, G. ; LAGRANGE, T. ; REINBERG, D.: The general transcription factors of RNA polymerase II. In: *Genes Dev* 10 (1996), Nr. 21, S. 2657–83
- [27] ROEDER, R. G.: The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. In: *Trends in Biochemical Sciences* 21 (1996), Nr. 9, S. 327–335

- [28] MULLER, C. W.: Transcription factors: global and detailed views. In: *Curr Opin Struct Biol* 11 (2001), Nr. 1, S. 26–32
- [29] KAISER, K. ; MEISTERERNST, M.: The human general co-factors. In: *Trends in Biochemical Sciences* 21 (1996), Nr. 9, S. 342–345
- [30] ROEDER, R. G.: Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. In: *FEBS Lett* 579 (2005), Nr. 4, S. 909–15
- [31] BURLEY, S. K.: The TATA box binding protein. In: *Curr Opin Struct Biol* 6 (1996), Nr. 1, S. 69–75
- [32] HORIKOSHI, M. ; BERTUCCIOLI, C. ; TAKADA, R. ; WANG, J. ; YAMAMOTO, T. ; ROEDER, R. G.: Transcription Factor TFIID Induces DNA Bending Upon Binding to the Tata Element. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992), Nr. 3, S. 1060–1064
- [33] WRIGHT, K. J. ; MARR, 2nd M. T. M. T. ; TJIAN, R.: TAF4 nucleates a core subcomplex of TFIID and mediates activated transcription from a TATA-less promoter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Nr. 33, S. 12347–52
- [34] ALBRIGHT, S. R. ; TJIAN, R.: TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. In: *Gene* 242 (2000), Nr. 1-2, S. 1–13
- [35] LEE, T. I. ; YOUNG, R. A.: Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. In: *Genes & Development* 12 (1998), Nr. 10, S. 1398–1408
- [36] VERRIJZER, C. P. ; TJIAN, R.: TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Nr. 9, S. 338–42
- [37] MOQTADERI, Z. ; BAI, Y. ; POON, D. ; WEIL, P. A. ; STRUHL, K.: TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. In: *Nature* 383 (1996), Nr. 6596, S. 188–91
- [38] TAN, S. ; HUNZIKER, Y. ; SARGENT, D. F. ; RICHMOND, T. J.: Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. In: *Nature* 381 (1996), Nr. 6578, S. 127–51

-
- [39] NIKOLOV, D. B. ; CHEN, H. ; HALAY, E. D. ; USHEVA, A. A. ; HISATAKE, K. ; LEE, D. K. ; ROEDER, R. G. ; BURLEY, S. K.: Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. In: *Nature* 377 (1995), Nr. 6545, S. 119–28
- [40] REINES, D. ; CONAWAY, J. W. ; CONAWAY, R. C.: The RNA polymerase II general elongation factors. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Nr. 9, S. 351–5
- [41] SVEJSTRUP, J. Q. ; VICHI, P. ; EGLY, J. M.: The multiple roles of transcription/repair factor TFIH. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Nr. 9, S. 346–50
- [42] WHITE, R. J. ; JACKSON, S. P.: The TATA-binding protein: a central role in transcription by RNA polymerases I, II and III. In: *Trends Genet* 8 (1992), Nr. 8, S. 284–8
- [43] HERNANDEZ, N.: TBP, a universal eukaryotic transcription factor? In: *Genes Dev* 7 (1993), Nr. 7B, S. 1291–308
- [44] BURLEY, S. K. ; ROEDER, R. G.: Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). In: *Annu Rev Biochem* 65 (1996), S. 769–99
- [45] NIKOLOV, D. B. ; HU, S. H. ; LIN, J. ; GASCH, A. ; HOFFMANN, A. ; HORIKOSHI, M. ; CHUA, N. H. ; ROEDER, R. G. ; BURLEY, S. K.: Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. In: *Nature* 360 (1992), Nr. 6399, S. 40–6
- [46] HORIKOSHI, M. ; WANG, C. K. ; FUJII, H. ; CROMLISH, J. A. ; WEIL, P. A. ; ROEDER, R. G.: Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. In: *Nature* 341 (1989), Nr. 6240, S. 299–303
- [47] PETERSON, M. G. ; TANESE, N. ; PUGH, B. F. ; TJIAN, R.: Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. In: *Science* 248 (1990), Nr. 4963, S. 1625–30
- [48] KUDDUS, R. ; SCHMIDT, M. C.: Effect of the non-conserved N-terminus on the DNA binding activity of the yeast TATA binding protein. In: *Nucleic Acids Res* 21 (1993), Nr. 8, S. 1789–96

- [49] ZIFF, E. B. ; EVANS, R. M.: Coincidence of the promoter and capped 5' terminus of RNA from the adenovirus 2 major late transcription unit. In: *Cell* 15 (1978), Nr. 4, S. 1463–75
- [50] CORDEN, J. ; WASYLYK, B. ; BUCHWALDER, A. ; SASSONE-CORSI, P. ; KEDINGER, C. ; CHAMBON, P.: Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. In: *Science* 209 (1980), Nr. 4463, S. 1406–14
- [51] NIKOLOV, D. B. ; CHEN, H. ; HALAY, E. D. ; HOFFMAN, A. ; ROEDER, R. G. ; BURLEY, S. K.: Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nr. 10, S. 4862–7
- [52] WERNER, M. H. ; GRONENBORN, A. M. ; CLORE, G. M.: Intercalation, DNA kinking, and the control of transcription. In: *Science* 271 (1996), Nr. 5250, S. 778–84
- [53] PARDO, L. ; CAMPILLO, M. ; BOSCH, D. ; PASTOR, N. ; WEINSTEIN, H.: Binding mechanisms of TATA box-binding proteins: DNA kinking is stabilized by specific hydrogen bonds. In: *Biophys J* 78 (2000), Nr. 4, S. 1988–96
- [54] KIM, J. L. ; NIKOLOV, D. B. ; BURLEY, S. K.: Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. In: *Nature* 365 (1993), Nr. 6446, S. 520–7
- [55] KIM, J. L. ; BURLEY, S. K.: 1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. In: *Nat Struct Biol* 1 (1994), Nr. 9, S. 638–53
- [56] KIM, Y. ; GEIGER, J. H. ; HAHN, S. ; SIGLER, P. B.: Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. In: *Nature* 365 (1993), Nr. 6446, S. 512–20
- [57] PEREZ-HOWARD, G. M. ; WEIL, P. A. ; BEECHEM, J. M.: Yeast TATA binding protein interaction with DNA: fluorescence determination of oligomeric state, equilibrium binding, on-rate, and dissociation kinetics. In: *Biochemistry* 34 (1995), Nr. 25, S. 8005–17

-
- [58] FAIGER, H. ; IVANCHENKO, M. ; COHEN, I. ; HARAN, T. E.: TBP flanking sequences: asymmetry of binding, long-range effects and consensus sequences. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Nr. 1, S. 104–19
- [59] BAREKET-SAMISH, A. ; COHEN, I. ; HARAN, T. E.: Signals for TBP/TATA box recognition. In: *Journal of Molecular Biology* 299 (2000), Nr. 4, S. 965–977
- [60] WOLNER, B. S. ; GRALLA, J. D.: TATA-flanking sequences influence the rate and stability of TATA-binding protein and TFIIB binding. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 9, S. 6260–6
- [61] WOLNER, B. S. ; GRALLA, J. D.: Roles for non-TATA core promoter sequences in transcription and factor binding. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 10, S. 3608–15
- [62] PATIKOGLU, G. A. ; KIM, J. L. ; SUN, L. ; YANG, S. H. ; KODADEK, T. ; BURLEY, S. K.: TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. In: *Genes Dev* 13 (1999), Nr. 24, S. 3217–30
- [63] MASTERS, K. M. ; PARKHURST, K. M. ; DAUGHERTY, M. A. ; PARKHURST, L. J.: Native human TATA-binding protein simultaneously binds and bends promoter DNA without a slow isomerization step or TFIIB requirement. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 34, S. 31685–31690
- [64] PARKHURST, K. M. ; BRENOWITZ, M. ; PARKHURST, L. J.: Simultaneous binding and bending of promoter DNA by the TATA binding protein: real time kinetic measurements. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 23, S. 7459–65
- [65] PARKHURST, K. M. ; RICHARDS, R. M. ; BRENOWITZ, M. ; PARKHURST, L. J.: Intermediate species possessing bent DNA are present along the pathway to formation of a final TBP-TATA complex. In: *Journal of Molecular Biology* 289 (1999), Nr. 5, S. 1327–1341
- [66] PARKHURST, L. J. ; PARKHURST, K. M. ; POWELL, R. ; WU, J. ; WILLIAMS, S.: Time-resolved fluorescence resonance energy transfer studies of DNA bending in double-stranded oligonucleotides and in DNA-protein complexes. In: *Biopolymers* 61 (2001), Nr. 3, S. 180–200

- [67] POWELL, R. M. ; PARKHURST, K. M. ; BRENOWITZ, M. ; PARKHURST, L. J.: Marked stepwise differences within a common kinetic mechanism characterize TATA-binding protein interactions with two consensus promoters. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 32, S. 29782–29791
- [68] POWELL, R. M. ; PARKHURST, K. M. ; PARKHURST, L. J.: Comparison of TATA-binding protein recognition of a variant and consensus DNA promoters. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 10, S. 7776–7784
- [69] TOLIC-NORRELYKKE, S. F. ; RASMUSSEN, M. B. ; PAVONE, F. S. ; BERG-SORENSEN, K. ; ODDERSHEDE, L. B.: Stepwise bending of DNA by a single TATA-box binding protein. In: *Biophysical Journal* 90 (2006), Nr. 10, S. 3694–3703
- [70] ZHAO, X. ; HERR, W.: A regulated two-step mechanism of TBP binding to DNA: a solvent-exposed surface of TBP inhibits TATA box recognition. In: *Cell* 108 (2002), Nr. 5, S. 615–27
- [71] WANG, Y. ; STUMPH, W. E.: RNA polymerase II/III transcription specificity determined by TATA box orientation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 19, S. 8606–10
- [72] KAYS, A. R. ; SCHEPARTZ, A.: Virtually unidirectional binding of TBP to the AdMLP TATA box within the quaternary complex with TFIIA and TFIIB. In: *Chemistry & Biology* 7 (2000), Nr. 8, S. 601–610
- [73] COX, J. M. ; HAYWARD, M. M. ; SANCHEZ, J. F. ; GEGNAS, L. D. ; VANDERZEE, S. ; DENNIS, J. H. ; SIGLER, P. B. ; SCHEPARTZ, A.: Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997), Nr. 25, S. 13475–13480
- [74] LIU, Y. C. ; SCHEPARTZ, A.: Kinetic preference for oriented DNA binding by the yeast TATA-binding protein TBP. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 21, S. 6257–6266

-
- [75] SIMS, 3rd R. J. R. J. ; MANDAL, S. S. ; REINBERG, D.: Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. In: *Curr Opin Cell Biol* 16 (2004), Nr. 3, S. 263–71
- [76] CHEN, L.: Combinatorial gene regulation by eukaryotic transcription factors. In: *Curr Opin Struct Biol* 9 (1999), Nr. 1, S. 48–55
- [77] BLACKWOOD, E. M. ; KADONAGA, J. T.: Going the distance: a current view of enhancer action. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5373, S. 60–3
- [78] MERIKA, M. ; THANOS, D.: Enhanceosomes. In: *Curr Opin Genet Dev* 11 (2001), Nr. 2, S. 205–8
- [79] TJIAN, R. ; MANIATIS, T.: Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. In: *Cell* 77 (1994), Nr. 1, S. 5–8
- [80] MALIK, S. ; ROEDER, R. G.: Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. In: *Trends Biochem Sci* 25 (2000), Nr. 6, S. 277–83
- [81] BJORKLUND, S. ; KIM, Y. J.: Mediator of transcriptional regulation. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Nr. 9, S. 335–7
- [82] MALDONADO, E. ; HAMPSEY, M. ; REINBERG, D.: Repression: targeting the heart of the matter. In: *Cell* 99 (1999), Nr. 5, S. 455–8
- [83] GOPPELT, A. ; STELZER, G. ; LOTTSPEICH, F. ; MEISTERERNST, M.: A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. In: *Embo J* 15 (1996), Nr. 12, S. 3105–16
- [84] INOSTROZA, J. A. ; MERMELSTEIN, F. H. ; HA, I. ; LANE, W. S. ; REINBERG, D.: Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. In: *Cell* 70 (1992), Nr. 3, S. 477–89
- [85] KIM, S. ; NA, J. G. ; HAMPSEY, M. ; REINBERG, D.: The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nr. 3, S. 820–5

- [86] XIE, J. ; COLLART, M. ; LEMAIRE, M. ; STELZER, G. ; MEISTERERNST, M.: A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement in vivo. In: *Embo Journal* 19 (2000), Nr. 4, S. 672–682
- [87] GILFILLAN, S. ; STELZER, G. ; PIAIA, E. ; HOFMANN, M. G. ; MEISTERERNST, M.: Efficient binding of NC2 center dot TATA-binding protein to DNA in the absence of TATA. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr. 7, S. 6222–6230
- [88] TSAI, F. T. ; SIGLER, P. B.: Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. In: *Embo J* 19 (2000), Nr. 1, S. 25–36
- [89] WILLY, P. J. ; KOBAYASHI, R. ; KADONAGA, J. T.: A basal transcription factor that activates or represses transcription. In: *Science* 290 (2000), Nr. 5493, S. 982–5
- [90] CASTANO, E. ; GROSS, P. ; WANG, Z. ; ROEDER, R. G. ; OELGESCHLAGER, T.: The C-terminal domain-phosphorylated HIO form of RNA polymerase II is associated with the transcription repressor NC2 (Dr1/DRAP1) and is required for transcription activation in human nuclear extracts. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 13, S. 7184–9
- [91] XIE, X. S.: Single-molecule spectroscopy and dynamics at room temperature. In: *Accounts of Chemical Research* 29 (1996), Nr. 12, S. 598–606
- [92] NIE, S. ; ZARE, R. N.: Optical detection of single molecules. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26 (1997), S. 567–96
- [93] WEISS, S.: Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. In: *Science* 283 (1999), Nr. 5408, S. 1676–83
- [94] MOERNER, W. E. ; FROMM, D. P.: Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. In: *Review of Scientific Instruments* 74 (2003), Nr. 8, S. 3597–3619
- [95] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2. ed. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. – ISBN 0–306–46093–9

-
- [96] STRICKLER, S. J. ; BERG, R. A.: Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. In: *Journal of Chemical Physics* 37 (1962), Aug 13, Nr. 4, S. 814–822
- [97] SELÉNYI, P.: Wide-Angle Interferences and the Nature of the Elementary Light Sources. In: *Physical Review* 56 (1939), Sep 1, S. 477–479
- [98] JABLONSKI, A.: On the notion of emission anisotropy. In: *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Ser. A* 8 (1960), S. 259–264
- [99] JUNG, G.: *Zweifarbigen-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie am Grün Fluoreszierenden Protein und seinen Mutanten*. Dissertationsschrift. München, 2001. – ISBN 3–89791–231–7
- [100] HA, T.: Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. In: *Methods* 25 (2001), Nr. 1, S. 78–86
- [101] HARADA, Y. ; SAKURADA, K. ; AOKI, T. ; THOMAS, D. D. ; YANAGIDA, T.: Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. In: *J Mol Biol* 216 (1990), Nr. 1, S. 49–68
- [102] BENESCH, R. E. ; BENESCH, R.: Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods. In: *Science* 118 (1953), Nr. 3068, S. 447–8
- [103] RASNIK, I. ; MCKINNEY, S. A. ; HA, T.: Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. In: *Nat Methods* 3 (2006), Nr. 11, S. 891–3
- [104] HA, T. ; TING, A. Y. ; LIANG, J. ; DENIZ, A. A. ; CHEMLA, D. S. ; SCHULTZ, P. G. ; WEISS, S.: Temporal fluctuations of fluorescence resonance energy transfer between two dyes conjugated to a single protein. In: *Chemical Physics* 247 (1999), S. 107–18
- [105] FORSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. In: *Annalen Der Physik* 2 (1948), Nr. 1-2, S. 55–75
- [106] CLEGG, R. M.: Fluorescence Resonance Energy-Transfer and Nucleic-Acids. In: *Methods in Enzymology* 211 (1992), S. 353–388

- [107] STRYER, L. ; HAUGLAND, R. P.: Energy transfer: a spectroscopic ruler. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 58 (1967), Nr. 2, S. 719–26
- [108] MEER, B. W. d.: Kappa-squared: from nuisance to new sense. In: *J Biotechnol* 82 (2002), Nr. 3, S. 181–96
- [109] DALE, R. E. ; EISINGER, J. ; BLUMBERG, W. E.: The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. In: *Biophys J* 26 (1979), Nr. 2, S. 161–93
- [110] MAJUMDAR, Z. K. ; HICKERSON, R. ; NOLLER, H. F. ; CLEGG, R. M.: Measurements of internal distance changes of the 30S ribosome using FRET with multiple donor-acceptor pairs: quantitative spectroscopic methods. In: *J Mol Biol* 351 (2005), Nr. 5, S. 1123–45
- [111] HA, T. ; ENDERLE, T. ; OGLETREE, D. F. ; CHEMLA, D. S. ; SELVIN, P. R. ; WEISS, S.: Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Nr. 13, S. 6264–6268
- [112] KUZMENKINA, E. V. ; HEYES, C. D. ; NIENHAUS, G. U.: Single-molecule Forster resonance energy transfer study of protein dynamics under denaturing conditions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Nr. 43, S. 15471–15476
- [113] HA, T. ; RASNIK, I. ; CHENG, W. ; BABCOCK, H. P. ; GAUSS, G. H. ; LOHMAN, T. M. ; CHU, S.: Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase. In: *Nature* 419 (2002), Nr. 6907, S. 638–41
- [114] HA, T. ; TING, A. Y. ; LIANG, J. ; CALDWELL, W. B. ; DENIZ, A. A. ; CHEMLA, D. S. ; SCHULTZ, P. G. ; WEISS, S.: Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 3, S. 893–8
- [115] LEE, N. K. ; KAPANIDIS, A. N. ; WANG, Y. ; MICHALET, X. ; MUKHOPADHYAY, J. ; EBRIGHT, R. H. ; WEISS, S.: Accurate FRET measurements within

- single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. In: *Biophys J* 88 (2005), Nr. 4, S. 2939–53
- [116] FUNATSU, T. ; HARADA, Y. ; TOKUNAGA, M. ; SAITO, K. ; YANAGIDA, T.: Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. In: *Nature* 374 (1995), Nr. 6522, S. 555–9
- [117] ISHIJIMA, A. ; YANAGIDA, T.: Single molecule nanobioscience. In: *Trends Biochem Sci* 26 (2001), Nr. 7, S. 438–44
- [118] HECHT, E.: *Optik*. 3. Aufl. München : Oldenbourg, 2001. – ISBN 3–486–24917–7
- [119] WAZAWA, T. ; UEDA, M.: Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95 (2005), S. 77–106
- [120] RUCKSTUHL, T. ; SEEGER, S.: Attoliter detection volumes by confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy. In: *Optics Letters* 29 (2004), Nr. 6, S. 569–571
- [121] MYONG, S. ; RASNIK, I. ; JOO, C. ; LOHMAN, T. M. ; HA, T.: Repetitive shuttling of a motor protein on DNA. In: *Nature* 437 (2005), Nr. 7063, S. 1321–1325
- [122] ROHRBACH, A.: Observing secretory granules with a multiangle evanescent wave microscope. In: *Biophys J* 78 (2000), Nr. 5, S. 2641–54
- [123] BLUMBERG, S. ; GAJRAJ, A. ; PENNINGTON, M. W. ; MEINERS, J. C.: Three-dimensional characterization of tethered microspheres by total internal reflection fluorescence microscopy. In: *Biophys J* 89 (2005), Nr. 2, S. 1272–81
- [124] AJO-FRANKLIN, C. M. ; KAM, L. ; BOXER, S. G.: High refractive index substrates for fluorescence microscopy of biological interfaces with high z contrast. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), Nr. 24, S. 13643–8

- [125] FORKEY, J. N. ; QUINLAN, M. E. ; GOLDMAN, Y. E.: Measurement of single macromolecule orientation by total internal reflection fluorescence polarization microscopy. In: *Biophys J* 89 (2005), Nr. 2, S. 1261–71
- [126] QUINLAN, M. E. ; FORKEY, J. N. ; GOLDMAN, Y. E.: Orientation of the myosin light chain region by single molecule total internal reflection fluorescence polarization microscopy. In: *Biophys J* 89 (2005), Nr. 2, S. 1132–42
- [127] AXELROD, D.: Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. In: *Traffic* 2 (2001), Nr. 11, S. 764–774
- [128] AXELROD, D.: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. In: MARIOTT, G. (Hrsg.) ; PARKER, I. (Hrsg.): *Methods in Enzymology, Vol 361, Biophotonics, Part B*. New York : Academic Press, 2003. – ISBN 0–12–182264–8, S. 1–33
- [129] AMBROSE, W. P. ; GOODWIN, P. M. ; NOLAN, J. P.: Single-molecule detection with total internal reflection excitation: comparing signal-to-background and total signals in different geometries. In: *Cytometry* 36 (1999), Nr. 3, S. 224–31
- [130] MCCAIN, K. S. ; SCHLUESCHE, P. ; HARRIS, J. M.: Poly(amidoamine) dendrimers as nanoscale diffusion probes in sol-gel films investigated by total internal reflection fluorescence spectroscopy. In: *Anal Chem* 76 (2004), Nr. 4, S. 939–46
- [131] MCCAIN, K. S. ; SCHLUESCHE, P. ; HARRIS, J. M.: Modifying the adsorption behavior of polyamidoamine dendrimers at silica surfaces investigated by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. In: *Anal Chem* 76 (2004), Nr. 4, S. 930–8
- [132] MASHANOV, G. I. ; TACON, D. ; KNIGHT, A. E. ; PECKHAM, M. ; MOLLOY, J. E.: Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy. In: *Methods* 29 (2003), Nr. 2, S. 142–52
- [133] SAKO, Y. ; UYEMURA, T.: Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. In: *Cell Struct Funct* 27 (2002), Nr. 5, S. 357–65

- [134] TOOMRE, D. ; MANSTEIN, D. J.: Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. In: *Trends Cell Biol* 11 (2001), Nr. 7, S. 298–303
- [135] SAKO, Y. ; MINOGHCHI, S. ; YANAGIDA, T.: Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. In: *Nat Cell Biol* 2 (2000), Nr. 3, S. 168–72
- [136] KIRSTEIN, J. ; PLATSCHEK, B. ; JUNG, C. ; BROWN, R. ; BEIN, T. ; BRAUCHLE, C.: Exploration of nanostructured channel systems with single-molecule probes. In: *Nat Mater* 6 (2007), Nr. 4, S. 303–10
- [137] PAWLEY, J. B.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3. ed. New York : Springer, 2006. – ISBN 0–387–25921–X
- [138] SCHWERTNER, M. ; BOOTH, M. J. ; WILSON, T.: Simple optimization procedure for objective lens correction collar setting. In: *J Microsc* 217 (2005), Nr. Pt 3, S. 184–7
- [139] INOUÉ, S. ; SPRING, K. R.: *Video Microscopy*. 2. ed. New York : Plenum Press, 1997. – ISBN 0–306–45531–5
- [140] KAPANIDIS, A. N. ; LAURENCE, T. A. ; LEE, N. K. ; MARGEAT, E. ; KONG, X. X. ; WEISS, S.: Alternating-laser excitation of single molecules. In: *Accounts of Chemical Research* 38 (2005), Nr. 7, S. 523–533
- [141] MULLER, B. K. ; ZAYCHIKOV, E. ; BRAUCHLE, C. ; LAMB, D. C.: Pulsed interleaved excitation. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), Nr. 5, S. 3508–3522
- [142] MÜLLER, B.: *Die gepulste alternierende Anregung in der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006
- [143] BLEICHENBACHER, M. ; TAN, S. ; RICHMOND, T. J.: Novel interactions between the components of human and yeast TFIIA/TBP/DNA complexes. In: *J Mol Biol* 332 (2003), Nr. 4, S. 783–93
- [144] BANIK, U. ; BEECHEM, J. M. ; KLEBANOW, E. ; SCHROEDER, S. ; WEIL, P. A.: Fluorescence-based analyses of the effects of full-length recombinant

- TAF130p on the interaction of TATA box-binding protein with TATA box DNA. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 52, S. 49100–49109
- [145] GUMBS, O. H. ; CAMPBELL, A. M. ; WEIL, P. A.: High-affinity DNA binding by a Mot1p-TBP complex: implications for TAF-independent transcription. In: *Embo Journal* 22 (2003), Nr. 12, S. 3131–3141
- [146] DENIZ, A. A. ; DAHAN, M. ; GRUNWELL, J. R. ; HA, T. ; FAULHABER, A. E. ; CHEMLA, D. S. ; WEISS, S. ; SCHULTZ, P. G.: Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Forster distance dependence and subpopulations. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 7, S. 3670–5
- [147] MCKINNEY, S. A. ; JOO, C. ; HA, T.: Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. In: *Biophys J* 91 (2006), Nr. 5, S. 1941–51
- [148] ZARRABI, N. ; DÜSER, M. G. ; REUTER, R. ; DUNN, S. D. ; WRACHTRUP, J. ; BÖRSCH, M.: Detecting substeps in the rotary motors of FoF1-ATP synthase by Hidden Markov Models. In: *Prog. Biomed. Optics Imag. - Proc. SPIE* 6444 (2007), 64440E

A. Herstellung von Flusskammern mit PEG-modifizierter Prismaoberfläche

In diesem Anhang wird die Herstellung der angewendeten Flusskammern mit silanierter und PEG-beschichteter Prismaoberfläche beschrieben. Für die Durchführung der beschriebenen Einzelmolekül-Messungen standen sechs Quarzprismen (Suprasil 2, Zell Quarzglas und Technische Keramik GmbH) zur Verfügung, die immer zusammen gereinigt und zu neuen Flusskammern verbaut wurden. Auf diese Weise konnten also sechs verschiedene Messreihen durchgeführt werden, bevor ein Labor-tag zur Herstellung neuer Flusskammer verwendet wurde.

A.1. Reinigung der TIRFM-Prismen

Direkt nach der Beendigung einer Messreihe wurden die Flusskammern per Hand auseinandergelöst, indem die überstehenden Deckgläser durch kontrollierte Gewaltanwendung zusammen mit dem Nescofilm von den Prismen getrennt wurden. Dies wurde stets mit äußerster Vorsicht durchgeführt, um ein Zerkratzen der Prismaoberfläche durch splitterndes Deckglas zu vermeiden. Anschließend wurden die Prismen mit technisch reinem Aceton, Ethanol und Millipore-Wasser gewaschen bevor sie in Falcon-Röhrchen unter Millipore-Wasser bis zur nächsten Reinigung zwischengelagert wurden.

Zur Reinigung wurden die gebrauchten Prismen zunächst in einem speziell angefertigten Teflon-Behälter in einer Lösung aus 1 % (v/v) Hellmanex eingelegt, um Nescofilm-Rückstände auf den Prismen zu entfernen. Die Lösung wurde mit den Prismen in der Mikrowelle aufgeköcht und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde

die Hellmanex-Lösung abgegossen, die Prismen wurden unter fließendem Millipore-Wasser ergiebig gespült und dann in Millipore-Wasser aufgeköcht, für 5 min inkubiert und abermals gewaschen.

Zur Desilanisierung wurden die Prismen im Teflon-Behälter unter einem Abzug (im stark ziehenden „Notfallbetrieb“) mit einer Lösung aus HCl (37 %) und H₂O₂ (30 %) (1 : 2) übergossen. Die Lösung wurde für 1 - 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abklingen der Chlorgas-Entwicklung wurden die Prismen erneut mit ausreichend (400 mL) Millipore-Wasser gewaschen, in 1 % Hellmanex aufgeköcht, 5 min inkubiert und abschließend zwei Mal in Millipore-Wasser aufgeköcht und wieder ergiebig gewaschen. Dabei wurde das letzte Aufkochen zur Separierung der Prismen in getrennten Falcon-Röhrchen durchgeführt.

Abgeschlossen wurde die Reinigung durch Trocknen der Prismen im Stickstoffstrom und kurzem (!) Abflammen der Primaunterseiten mit einem Mirco-Blazer (reduzierende Flamme, 1200 °C). Kontrollmessungen ergaben, dass der Schritt des Abflammens zur endgültigen Reinigung der Quarzoberflächen unverzichtbar war. Flusskammern ohne abgeflamnte Glaskomponenten zeigten eine deutlich schmutzige Oberfläche.

A.2. Herstellung neuer Flusskammern

Direkt im Anschluss an die Reinigung wurde die Silanisierung der Prismen durchgeführt. Hierzu wurden die Prismen (nachdem sie vom Abflammen wieder erkaltet waren) für 40 min in eine 2 %-ige (v/v) Aminosilan-Lösung aus „Vectabond“ (Vector Labs) und Aceton (Sigma-Aldrich, Spectranal) gelegt. Die Prismen wurden nach der Inkubation wieder unter fließendem Millipore-Wasser (400 mL) gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Die eingesetzte Vectabond-Lösung konnte leider nicht in Einzelmolekül-reiner Form bezogen werden. Die gewählte Inkubationszeit von 40 min stellte somit einen Kompromiss zwischen zunehmender Verschmutzung¹ und genügender Silanisierung² dar.

Die PEG-Beschichtung der Prismen wurde mit einer Lösung aus 45 % (m/v) PEG

¹Nach 60 min Silanisierung war die Flusskammeroberfläche deutlich schmutziger.

²Nach 20 min Silanisierung zeigten die Prismen beim Waschen keine guten Abperleffekt von Wasser

und Carbonatpuffer (NaHCO_3 , pH 9,0) durchgeführt. Das eingesetzte PEG war mit N-Hydroxysuccinimidylester-Gruppen aktiviert (M-PEG-SPA, $M_r = 5000$, Nektar Therapeutics) und 2% (m/m) des PEG trugen außerdem ein Biotin-Molekül am Polymerende (biotin-PEG-NHS, $M_r = 3400$, Nektar Therapeutics)³. Um die hohe Konzentration an PEG in Lösung zu bekommen, wurde das Gemisch aus PEG und Carbonatpuffer kurz mit einer Pipette vermennt und anschließend für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die entstandene zähflüssige Lösung auf alle Prismen verteilt⁴.

Mit Millipore-Wasser gesäuberte und abgeflamnte Deckgläser wurden auf die PEG-Lösung gelegt. Die Inkubationszeit betrug 1,5 h. Die Prismen wurden während dieser Zeit in zweckentfremdete Boxen für Pipettenspitzen gelagert, in denen unter dem Stecknetz Wasser eingefüllt wurde, sodass ein Austrocknen der PEG-Lösung durch die entstehende Wasserdampfatosphäre verhindert wurde. Nach beendeter Inkubation wurden die Prismen wieder unter fließendem Millipore-Wasser (800 mL) gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Flusskammern wurden als Sandwich aus Prisma, Nescofilm (Bando Chemical Ind. Ltd) und Deckglas (Stärke #1, Marienfeld GmbH & Co. KG) zusammengesetzt. In der Mitte des Nescofilm-Streifens wurde eine Fläche von $20 \times 3 \text{ mm}^2$ für den späteren Probenraum ausgespart (vgl. Abb. 4.3). Die Deckgläser wurden mit Millipore-Wasser gewaschen und direkt vor der Anwendung abgeflammt.

Verbunden wurden die einzelnen Komponenten der Flusskammer durch Erhitzen des Sandwiches auf 150°C . Hierzu wurde das Sandwich zwischen zwei Objektträgern zunächst per Hand auf eine Heizplatte gedrückt bis der Nescofilm durchsichtig wurde. Anschließend wurde das Sandwich auf der Heizplatte für 30 - 60 s mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Dabei war es von entscheidender Bedeutung, dass ein gleichmäßiges Beschweren des Sandwiches durchgeführt wurde, um Höhenunterschiede in der entstandenen Flusskammer zu vermeiden. Diese Unterschiede hätten sonst dazu geführt, dass die Prismaunterseite bei den TIRFM-

³Mittlerweile stellt Nektar Therapeutics die verwendeten PEG-Komponenten nicht mehr her. Entsprechende Reagenzien in vergleichbarer Qualität können aber von Laysan Bio Inc. bezogen werden.

⁴Da die Succinimidyl-Aktivierungen der PEG-Moleküle schnell hydrolysieren, musste vom Zeitpunkt der Pufferzugabe zum PEG bis zur Anwendung an den Prismen auf eine zügige Arbeitsweise geachtet werden.

A. Herstellung von Flusskammern mit PEG-modifizierter Prismaoberfläche

Messungen nicht über eine lange Strecke im Fokus der Detektion geblieben wäre. Bis zur Anwendung wurden die Öffnungen der Flusskammern (Bohrungen in den Prismen) mit Nescofilm abgedeckt.

B. Übersicht der verwendeten EMCCD-Kameraeinstellungen

Im Folgenden sind die verwendeten Kameraeinstellungen für die beschriebenen Einzelmolekül-Untersuchungen aufgelistet. Die Reihenfolge der Liste wurde den Einträgen im Computerprogramm zur Kamerasteuerung (Andor iXon X-1710, Version: 4.1.0.0) nachempfunden.

Aquisition Mode:	Kinetic
Triggering:	Internal
Exposure time:	30, 75 oder 80 ms
Kinetic Series Length:	1
Number of Prescans:	0
Frame transfer:	eingeschaltet
Vertical shift speed:	0,6 μ s
Vertical clock voltage amplitude:	„normal“
Readout rate:	10 MHz bei 14 bit
Pre-amplifier gain:	2,4 \times
Electron multiplier gain:	230
Image size:	512 \times 512 (full chip)
Binning:	1 \times 1
Spooling:	aktiviert (SIF-Datenformat)

B. Übersicht der verwendeten EMCCD-Kameraeinstellungen

C. Alternativer Filtersatz für die Messapparatur

Die Abbildung C.1 zeigt die Spektren der gemessenen Filter für die Anwendung bei eGFP- und mRFP-markierten Proben (oder bei Proben, die spektral ähnlich markiert wurden). Ebenfalls eingezeichnet wurden die Laserlinien bei 488 nm (eGFP-Anregung) und 568 nm (mRFP-Anregung).

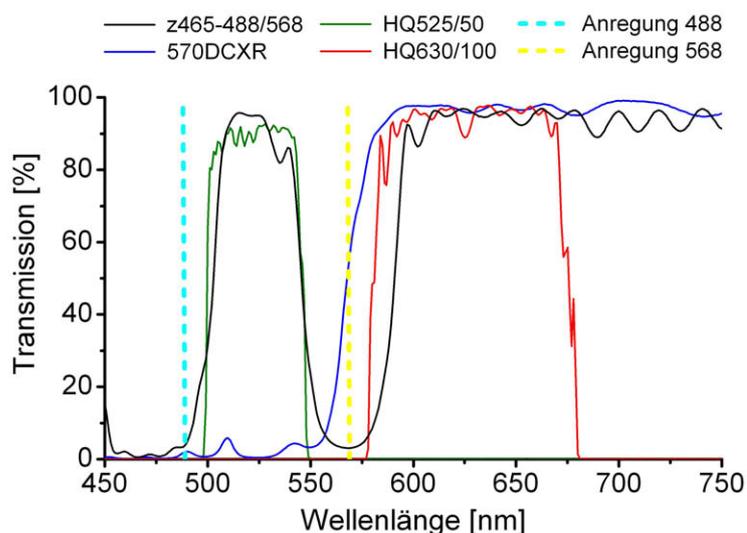


Abbildung C.1.: Spektrale Übersicht des Filtersatzes zur Detektion von eGFP und mRFP: Dichroitischer Spiegel 570DCXR (blau) zur Farbtrennung, Bandpassfilter HQ525/50 (grün) und HQ630/100 (rot), Dualbandfilter z465-488/568 (schwarz) für Objektiv-TIRFM/Weitfeld-Beleuchtung und Anregungswellenlängen 488 nm bzw. 568 nm (cyan bzw. gelb gestrichelt).

D. Markieren von TBP mit Atto532-Maleimid

Die *single cysteine*-Mutante von γ TBP wurde spezifisch über die Thiolgruppe des einzig enthaltenen Cysteins mit Maleimid-aktiviertem Atto532 (Atto-Tec, AD 532-41) markiert.

Bevor der Markierungsreaktion begonnen werden konnte, musste das im TBP-Lagerungspuffer (BC400: 400 mM KCl und BC-Puffer (20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20 mM Tris-HCl pH 7,3)) enthaltene DDT entfernt werden, da es ebenfalls mit der Maleimid-Gruppe reagieren würde. Hierzu wurde eine Dialyse mit einer schwimmenden Membrane (*floating membrane*) (Millipore GmbH, type VS, Porengröße 0,025 μ m) durchgeführt. Die Membran wurde vorsichtig in eine auf Eis gelagerte Petrischale gelegt, die mit DTT-freien BC400-Puffer gefüllt war. Um eine Oxidation der Cystein-Thiolgruppen zu verhindern, enthielt der Dialysepuffer 1 mM TCEP. Es wurden 200 μ L TBP-Lösung (715 ng/ μ L bzw. 26,5 μ M) auf der Membranzentrale platziert und für 1 h dialysiert. Nach der Dialyse konnten 110 μ L TBP-Lösung von der Membran zurückgewonnen werden.

Unmittelbar vor der Markierungsreaktion wurde der pH-Wert der TBP-Lösung mit Hepes-Puffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,2, 20 μ M TCEP) auf 7,5 eingestellt, um die Reaktivität der Maleimid-Cystein-Kopplung zu erhöhen. Anschließend wurden 15 μ L Farbstofflösung (1 mg Atto532 in 30 μ L H₂O) zu 132 μ L TBP-Lösung gegeben (sechsfacher Überschuss an Farbstoff) und bei Raumtemperatur für 1,5 h inkubiert.

Die Aufreinigung wurde mit losem Heparin-Säulenmaterial (Amersham Biosciences, Heparin Sepharose 6 Fast Flow) durchgeführt, an das TBP bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet. Das Säulenmaterial wurde in 0,05 M NaAc und 20 % EtOH aufgeschwemmt, vor der Anwendung mit Wasser gewaschen und mit BC200-Puffer (BC-Puffer mit 200 mM KCl) äquilibriert. Die KCl-Konzentration

der Markierungs-Lösung wurde durch Zugabe von BC-Puffer (ohne KCl) auf 150 nM KCl eingestellt und mit BC150-Puffer (BC-Puffer mit 150 nM KCl) auf 1 mL verdünnt. Anschließend wurden 100 μ L des Heparin-Säulengemisches (Säulenmaterial : Säulenpuffer = 1 : 1) auf die Markierungs-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde 1 h bei 4 °C langsam rotiert. Danach wurde das Säulenmaterial mit dem gebundenen TBP mit 3.000 rpm für 4 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde erneut mit 1 mL BC200-Puffer (BC-Puffer mit 200 mM KCl) aufgeschwemmt. Auf diese Weise wurde das Säulenmaterial sechs mal gewaschen, wobei die Inkubationszeit zwischen den weiteren Waschvorgängen nur noch 2 min betrug.

Eluiert wurde das markierte TBP durch die Zugabe von 150 μ L BC600-Puffer (BC-Puffer mit 600 mM KCl). Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand eines zweiten Eluierungsschrittes mit 50 μ L BC600-Puffer wurde mit dem ersten Überstand vereint, wodurch sich ein Eluat-Gesamtvolumen von 175 μ L ergab. Das Eluat wurde mit 110 μ L BC100-Puffer (BC-Puffer mit 100 mM KCl und zusätzlich 1 mM PMSF, 5 mM DTT und 2,5 mg/mL BSA) auf 400 mM KCl verdünnt und bis zur späteren Anwendung bei -80 °C gelagert.

Die aktive TBP-Konzentration wurde nach der Markierungsreaktion durch biochemische Untersuchungen auf 0,4 μ M bestimmt. Aufgrund der geringen TBP-Konzentration konnte die Effizienz der Markierungsreaktion nicht exakt bestimmt werden. Aufgrund von Colokalisations-Betrachtungen während der msALEX-Messungen an der TBP-DNA-Probe wurde (unter der Annahme, dass die DNA zu 100 % markiert worden ist) die Markierungseffizienz von TBP jedoch nur zwischen 10 und 20 % geschätzt.

E. DNA-Sequenzen und Akzeptor-Markierungspositionen

In Abbildung E.1 sind die verwendeten DNA-Sequenzen des *Adenovirus Major Late* Promotors aufgeführt.

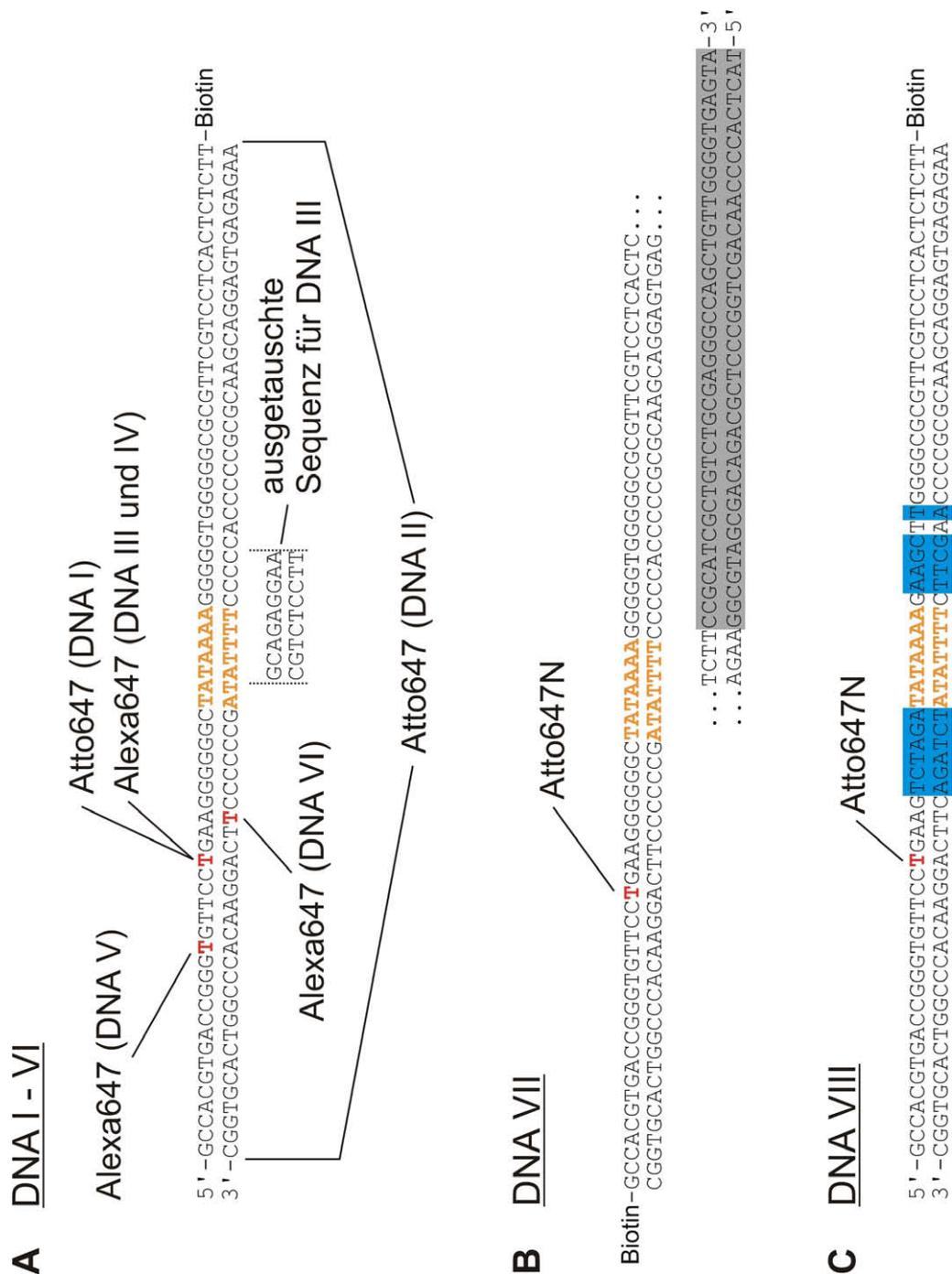


Abbildung E.1.: Verwendete AdMLP-Sequenzen. (A - C) Die TATA-Box ist in orange eingetragen. Die unterschiedlichen Markierungspositionen für die verschiedenen Akzeptor-Fluorophore sind rot eingetragen. (A) Zusammenfassung aller Proben-DNAs, die eine 70 bp lange, nicht mutierte AdML-Promotorsequenz aufwiesen. (B) AdML-Promotorsequenz, die um 40 bp verlängert wurde. Die Verlängerung ist in grau hinterlegt. (C) AdMLP-Sequenz (70 bp) mit mutierter G-Flankierung. Die veränderten Sequenzen sind in blau hinterlegt.

F. Effekt von κ^2 auf den möglichen Bereich der FRET-Effizienz

Aus den gemessenen Anisotropiewerten des TBP-DNA-NC2-Probenkomplexes (Tab. 6.1) können die Grenzen bestimmt werden, mit der sich die Donor- und Akzeptor-Übergangsdipolmomente zueinander orientieren können. Unter der Annahme, dass die freie Rotierbarkeit der Fluorophore aufgehoben ist, legen die Grenzwerte des ermittelten Orientierungsfaktors dann die möglichen Extremwerte einer FRET-Dynamik fest, die nur auf der räumlichen Reorientierung der Fluorophore basiert.

Die Werte des Orientierungsfaktors κ^2 können nicht berechnet werden, aber mit Hilfe der folgenden Gleichungen können die im Extremfall erreichbaren Grenzen, κ_{\min}^2 und κ_{\max}^2 , angegeben werden [95]:

$$\kappa_{\min}^2 = \frac{2}{3} \left(1 - \frac{d_D + d_A}{2} \right) \quad (\text{F.1})$$

und

$$\kappa_{\max}^2 = \frac{2}{3} (1 + d_D + d_A + 3d_D d_A) , \quad (\text{F.2})$$

wobei der Dipolarisierungsfaktor d_D bzw. d_A für Donor bzw. Akzeptor aus Gleichung 3.12 hergeleitet werden kann:

$$d_i = \sqrt{r_i \cdot \frac{1 + \frac{\tau}{\xi}}{r_{0,i}}} \quad (\text{F.3})$$

Der jeweilige Depolarisierungsfaktor ergibt sich somit aus den gemessenen Anisotropiewerten (r_i , Tab. 6.1) und den berechneten Werten der Anisotropie, bei der eine mögliche Fluorophor-Rotation nicht berücksichtigt wurde ($\left[\left(1 + \frac{\tau}{\xi} \right) / r_{0,i} \right]$, Tab. 6.2). Im Falle des TBP-DNA-NC2-Komplexes beträgt der Depolarisierungsfaktor mit den im Abschnitt 6.2.5 erläuterten Angaben für den Donor $d_D = 0,63$ und für

den Akzeptor $d_A = 0,66$. Die Grenzwerte für den Orientierungsfaktor ergeben sich daraus zu $\kappa_{\min}^2 = 0,23$ und $\kappa_{\max}^2 = 2,37$.

Durch den proportionalen Zusammenhang des Orientierungsfaktors mit dem Förster-Radius ($(\kappa^2)^{\frac{1}{6}} \sim R_0$) kann aus den κ^2 -Grenzwerten der dynamische FRET-Bereich bestimmt werden, der allein durch die Reorientierung der Fluorophore möglich ist.

Für den hier diskutierten Fall der FRET-Dynamik, der nach der Bindung von NC2 eintritt, soll überprüft werden, ob die beobachteten Sprünge der FRET-Werte zwischen $\sim 40\%$ und $\sim 80\%$ allein durch Orientierungsbewegungen der Übergangsdipolmomente erklärbar sind. Dafür wird der niedrigere FRET-Wert dieser Dynamik als Minimum des gesuchten FRET-Bereiches festgelegt (nach Abb. 6.10: $E_{\min} = 0,43$). Aus der besagten Proportionalität ergibt sich dann

$$R_{0,\max} = \left(\frac{\kappa_{\max}^2}{\kappa_{\min}^2} \right)^{\frac{1}{6}} R_{0,\min} . \quad (\text{F.4})$$

Für die maximale FRET-Effizienz E_{\max} folgt nach Gleichung 3.20

$$E_{\max} = \left[1 + \left(\frac{R}{R_{0,\max}} \right)^6 \right]^{-1} = \left[1 + \left(\frac{R}{R_{0,\min}} \right)^6 \frac{\kappa_{\min}^2}{\kappa_{\max}^2} \right]^{-1} . \quad (\text{F.5})$$

Ebenfalls durch Gleichung 3.20 ergibt sich

$$\left(\frac{R}{R_{0,\min}} \right)^6 = \frac{1}{E_{\min}} - 1 , \quad (\text{F.6})$$

sodass sich Gleichung F.5 umformen lässt zu

$$E_{\max} = \left[1 + \left(\frac{1}{E_{\min} - 1} \right) \frac{\kappa_{\min}^2}{\kappa_{\max}^2} \right]^{-1} . \quad (\text{F.7})$$

Aus dieser Gleichung resultiert ein maximaler Grenzwert des FRET-Bereiches von $E_{\max} = 89\%$.

Da sich die bisher berechneten Abstände zwischen Donor und Akzeptor auf Förster-Radien bezogen, die eine freie Rotierbarkeit der Fluorophore voraussetzten ($\kappa^2 = \frac{2}{3}$), muss für die Annahme, dass diese freie Rotation im Probenkomplex aufgehoben ist, der Abstand mit einem angepassten Förster-Radius bestimmt werden.

Analog zu Gleichung F.4 gilt für den Förster-Radius des minimalen Grenzwertes

$$R_{0,\min} = \left(\frac{\kappa_{\max}^2}{\frac{2}{3}} \right)^{\frac{1}{6}} R_{0,\frac{2}{3}} . \quad (\text{F.8})$$

Zusammen mit Gleichung 3.20 ergibt sich

$$R_{E_{\min}} = \left(\frac{1}{E_{\min}} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} R_{0,\min} = \left(\frac{1}{E_{\min}} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \left(\frac{\kappa_{\max}^2}{\frac{2}{3}} \right)^{\frac{1}{6}} R_{0,\frac{2}{3}} . \quad (\text{F.9})$$

Mit der Angabe von $R_{0,\frac{2}{3}} = 60 \text{ \AA}$ gilt für die gesuchte Distanz zwischen Donor und Akzeptor $R_{E_{\min}} = 54 \text{ \AA}$.

Somit scheint die behandelte Reorientierung der Fluorophore eine theoretische Möglichkeit zur Erklärung der FRET-Dynamik darzustellen, aber der ermittelte Abstand zwischen den FRET-Fluorophoren für die getroffenen Annahmen fällt dabei zu klein aus. Außerdem würde ein so starker anisotropischer Effekt, der die beobachtete Dynamik erklären könnte, einen perfekten optischen Schalter darstellen. Zur Unwahrscheinlichkeit eines solchen Schalters sei an dieser Stelle auf die Ausführungen im Abschnitt 6.2.1 verwiesen.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Bräuchle für die Aufnahme in einen Arbeitskreis mit exzellenter Ausstattung und der Förderung meiner Person durch die Integration in das Elitenetzwerk Bayern sowie durch Ermöglichung zahlreicher Fortbildungsmaßnahmen wie z. B. dem Sommerkurs der BASF oder der Strategy School der BCG.

Mein Dank gilt im Besonderen PD Dr. Don C. Lamb für seine vorbildliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Er gab mir die wichtige Freiheit meine eigenen Ideen umzusetzen und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Michael Meisterernst danke ich für eine langjährige und sehr fruchtbare Kooperation bei einem Forschungsprojekt, das Mensch und Maschine in jeder Hinsicht an neue Grenzen brachte.

Bei Gertraud Stelzer und Christine Göbel bedanke ich mich herzlich für die Einführung in das Arbeiten mit den empfindlichen Transkriptionsfaktoren und der Herstellung der vielen biologischen Proben, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Dem Elitenetzwerk Bayern danke ich für die zweijährige Förderung durch das vom CeNS geleitete Internationale Doktorandenkolleg Nano-Bio-Technologie, den hervorragenden Fortbildungsseminaren und der umfangreichen finanziellen Unterstützung für Tagungsreisen und Literaturanschaffungen.

Ich bedanke mich bei Robert Lewis für den Aufbau und der hervorragenden Betreuung des Biolabors, für die häufige Hilfe bei biochemischen Arbeiten sowie für die so erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Oberflächenbehandlung für biologisch-aktive Proben in der TIRF-Mikroskopie.

Herrn Prof. Dr. Jens Michael gilt mein Dank für viele anregende Diskussionen während der Mittagspause, die am Ende immer auf die Frage nach der emittierten Photonenzahl einzelner Fluorophore hinauslief. Besonders bedanke ich mich für die grundlegende Entwicklung des MatLab-Programms zur automatischen Auswer-

tung der spFRET-Datensätze.

Ich bedanke mich bei Moritz Ehrl für das Essen meiner Kekse, sodass sich mein Promotionsring in Grenzen hielt. Seine unermüdliche Unterstützung im Kampf durch den administrativen Dschungel der Universitätsverwaltung war einmalig.

Ralf Hiermaier, Robert Leeb und Peter Straube aus der Feinmechanikwerkstatt danke ich für die ausgezeichnete Arbeit, ohne die praktisch die Hälfte meiner experimentellen Apparatur nicht existieren würde.

Axel Gersdorf und Stejpan Skrtic aus der Elektronikwerkstatt danke ich für die Entwicklung des umfangreichen Shutter-Systems meiner Apparatur.

Ich danke Ralf Bausinger für die praxisorientierte Einführung in die Optik der Laser-Mikroskopie und für die Begleitung zahlreicher Nachtschichten. Vor allem aber danke ich ihm für unvergessene Erlebnisse jenseits des Campus, die einen unverzichtbaren Kontrast zum Laboralltag darstellten.

Stephan Wörmke und Peter Schwaderer danke ich für die nicht endenden Versuche mich zurück in das Leben außerhalb des Labors zu locken. Macht weiter so!

Meinen Zellengenossen Monika Franke und Matthias Höller sowie dem gesamten Arbeitskreis Bräuchle danke ich herzlich für ein außergewöhnlich tolles Arbeitsklima, das im Besonderen die Kaffeeküche mit einem Esprit erfüllte, der so manchen Forschungsrückschlag erträglich werden ließ.

Ich danke meiner Familie für die langjährige finanzielle, organisatorische und vor allem moralische Unterstützung während meines Studiums. Ihr ward und seid stets der feste Orientierungspunkt in meinem Leben.

Der größte Dank jedoch gebührt meinem Sonnenschein Wiebke Lindemann. Ohne Deine Großherzigkeit, Deine Toleranz und Deinen bedingungslosen Glauben an mich und an eine gemeinsame Zukunft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke Dir von ganzem Herzen, dass Du immer für mich da gewesen bist.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

- ZARRABI, N.; SCHLUESCHE, P.; MEISTERERNST, M.; LAMB, D. C.; BÖRSCH, M. Analyzing the Dynamics of Single TBP-DNA-NC2 complexes by Hidden Markov Models. *Manuskript in Vorbereitung.*
- SCHLUESCHE, P.; STELZER, G.; PIAIA, E.; LAMB, D. C.; MEISTERERNST, M. A dynamic model for class II gene promoter targeting through mobile TBP-NC2 complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, in revision.
- NIESNER, R.; PEKER, B.; SCHLÜSCHE, P.; GERICKE, K.-H.; HOFFMANN, C.; HAHNE, D.; MÜLLER-GOYMANN, C. 3D-Resolved Investigation of the pH Gradient in Artificial Skin Constructs by Means of Fluorescence Lifetime Imaging. *Pharmaceutical Research*, **22** (2005), 1079-1087.
- NIESNER, R.; PEKER, B.; SCHLÜSCHE, P.; GERICKE, K.-H. Non-Iterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging in the Investigation of Cellular Metabolism by Means of NAD(P)H Autofluorescence. *ChemPhysChem*, **5** (2004), 1141-1149.
- MCCAIN, K.; SCHLUESCHE, P.; HARRIS, J. M. Poly(amidoamine) Dendrimers as Nanoscale Diffusion Probes in Sol-Gel Films Investigated by Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy. *Anal. Chem.*, **76** (2004), 939-946.
- MCCAIN, K.; SCHLUESCHE, P.; HARRIS, J. M. Modifying the Adsorption Behavior of Polyamidoamine Dendrimers at Silica Surfaces Investigated by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Anal. Chem.*, **76** (2004), 930-938.

Tagungsberichte

- Niesner, R.; Peker, B.; Schlüsche, P.; Gericke, K.-H. 3D-Resolved pH-Measurements in Artificial Skin Constructs by means of Fluorescence Lifetime Imaging FLIM *Proceedings of International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology* 2004, 115-116.

Eigene Tagungsbeiträge

- SCHLUESCHE, P.; STELZER, G.; BRAEUCHLE, C.; MEISTERERNST, M.; LAMB, D. C. The Mechanism of Gene Repression Revealed by spFRET Investigations of TBP-NC2 Complexes. *71. Jahrestagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft*, 26.-30. März 2007, Regensburg, **Vortrag**.
- SCHLUESCHE, P.; STELZER, G.; BRAEUCHLE, C.; MEISTERERNST, M.; LAMB, D. C. The Mechanism of Gene Repression Revealed by spFRET Investigations of TBP-NC2 Complexes. *12th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences*, 20.-22. September 2006, Berlin-Adlershof, **Vortrag**.
- SCHLUESCHE, P.; STELZER, G.; BRAEUCHLE, C.; MEISTERERNST, M.; LAMB, D. C. Investigating the Dynamics of TBP-NC2 Complexes on DNA upon Binding of NC2 by spFRET studies. *50th Annual Meeting of the Biophysical Society*, 18.-22. Februar 2006, Salt Lake City, Utah (USA), **Poster**.
- SCHLUESCHE, P.; STELZER, G.; BRAEUCHLE, C.; MEISTERERNST, M.; LAMB, D. C. Investigating the Dynamics of TBP-NC2 Complexes on DNA upon Binding of NC2 by spFRET studies. *Bunsentagung*, 05.-07. Mai 2005, Frankfurt, **Poster**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Peter Schlüsche
Geburtsdatum	19. Mai 1976
Geburtsort	Wittingen

Schulabschluss

06/1996	Allgemeine Hochschulreife Gymnasium Hanksbüttel
---------	--

Studium an der TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

10/1997 - 09/1998	Biotechnologie (Diplom)
10/1998 - 09/2002	Chemie (Diplom)
10/2002 - 09/2003	Chemie (Master)
09/2003	Masterarbeit „Subzelluläre Untersuchungen von Hautkonstrukten durch die Visualisierung von Fluoreszenzlebensdauern mittels Zweiphotonenmikroskopie“

Auslandsstudium

08/2001 - 06/2002	University of Utah, Salt Lake City (USA)
-------------------	--

Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München

seit 01/2004	wissenschaftlicher Mitarbeiter am LS Prof. Dr. Ch. Bräuchle, Institut für Physikalische Chemie, Bearbeitung des vorliegenden Themas
--------------	---

Stipendien

09/2001 - 05/2002	DAAD-Auslandaufenthaltsstipendium
seit 10/2004	Mitglied im Internationalen Doktorandenkolleg Nano-Bio-Technology
10/2004 - 09/2006	Förderung durch das Elitenetzwerk Bayern