

Einzelmolekül-FRET-Analyse der biomolekularen Dynamik des SAM-I-Riboschalters

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Physik
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Phys. Christoph Manz
aus Rastatt

Datum der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2021
Referent: Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus
Korreferent: Prof. Dr. Alexander Schug

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Ribonukleinsäuren	5
2.2	Riboschalter	9
2.2.1	S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) Riboschalter	11
2.2.2	RNS-Struktur	14
2.2.3	RNS-Faltung	16
2.2.4	Strukturelle Modelle zur Abschätzung von Molekülstrukturen	20
2.3	Absorption und Emission elektromagnetischer Strahlung durch Materie	24
2.3.1	Franck-Condon-Prinzip	25
2.3.2	Fluoreszenz	27
2.3.3	Stokes-Verschiebung	28
2.3.4	Fluoreszenzquantenausbeute	29
2.3.5	Fluoreszenzbleichen und Quenchen	31
2.4	Försterresonanzenergietransfer (FRET)	32
2.4.1	Die FRET-Effizienz	36
2.5	Fluoreszenzmikroskopie	37
2.5.1	Konfokalmikroskopie	38
2.5.2	Interne Totalreflexionsmikroskopie	40
2.6	Hidden-Markov-Modell (HMM)	42
2.6.1	Markov-Ketten	42
2.6.2	HMM für Einzelmolekül-FRET-Daten	43
2.6.3	Maximum-Likelihood-Schätzer	45
2.6.4	Übergangspfadtheorie	46
3	Materialien und Methoden	47
3.1	Mikroskopaufbauten	47
3.1.1	Das Konfokalmikroskop	47
3.1.2	Das Prisma-TIRF-Mikroskop	50
3.2	Pufferlösungen und Stammlösungen	52
3.2.1	Redox- und sauerstoffzehrende Systeme	52
3.2.2	SAM und S-Adenosylhomocystein (SAH)	53
3.3	Probenpräparation für Einzelmolekülexperimente	53
3.3.1	Probenvorbereitung für Einzelmolekülexperimente	55
3.4	Einzelmolekülspektroskopie	57
3.4.1	Die Messung der FRET-Effizienz	58
3.4.2	Messung an frei diffundierenden Molekülen	59

3.4.3	Alternierende Anregung	60
3.4.4	Berechnung des γ -Faktors mit Hilfe eines ES-Plots	62
3.4.5	Messung an immobilisierten Molekülen	64
3.5	Auswertung mit einem Hidden-Markov-Modell	69
3.5.1	Auf Photonenemission basierte Maximum-Likelihood-Schätzer	69
3.5.2	Korrektur der FRET-Effizienzen des HMM	70
3.5.3	Auswertung und Validierung des HMM	70
3.5.4	Kinetische Verknüpfung der versteckten Zustände	73
3.5.5	Berechnung der Differenzen der Gibbsschen freien Energie aus den HMM	73
3.6	Das empirische Hill-Modell	75
4	Ergebnisse und Diskussion	77
4.1	Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters	77
4.1.1	Ausschluss von Oberflächeneffekten	79
4.1.2	Magnesiumionenabhängige Faltung des Konstrukts \mathbf{RS}_{AA}	81
4.1.3	Magnesiumionenabhängige Faltung des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA1}	83
4.1.4	Magnesiumionenabhängige Faltung des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA2}	85
4.2	SAM-abhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters	86
4.2.1	SAM-Titrationsexperimente des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA1}	87
4.2.2	SAM-Titrationsexperimente des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA2}	88
4.3	Die Faltungsdynamik des SAM-I-Riboschalters	89
4.3.1	Ergebnisdiskussion der Datenbasis von Einzelmolekültrajektorien für die HMM-Analyse	94
4.4	Quantitative Analyse der FRET-Histogramme mit vier Zuständen	95
4.4.1	Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA1}	95
4.4.2	Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts \mathbf{RS}_{AA}	100
4.4.3	Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA1} in Anwesenheit des Liganden SAM	102
4.4.4	Strukturbasierte Abstandsschätzungen	104
4.4.5	Interpretation und Diskussion der strukturellen und dynamischen Eigenschaften der SAM-I-Konformationen	110
4.4.6	Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts \mathbf{RS}_{EA2}	113
4.5	Globaler Fit mit dem Fünf-Zustandsmodell	115
4.6	Triangulierung zur Lokalisierung der Expressionsplattform	120
4.6.1	Diskussion	125
4.7	RS-Faltung unter Einfluss von SAH	127
4.8	Die Faltungsdynamik unter Einfluss von SAH	130
4.9	Diskussion und Ausblick	136
5	Zusammenfassung und Ausblick	139

Anhang	143
A Protokolle: Probenpräparation	145
A.1 Synthese der SAM-I-Riboschalter per Ligation	145
A.2 Fertigung der Probenhalter	147
A.3 Präparation der Objektträger zur Immobilisation der Moleküle	150
B Quantitative Statistik der Messdaten	153
B.1 Datenbasis der Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente	153
B.2 Datenbasis der Histogramme der SAM-Titrationsexperimente in Anwesenheit von 20 mM Magnesiumionen	154
C Akustooptischer Strahlteiler	155
Publikationsliste	177
Danksagung	179

1 Einleitung

Riboschalter (RS) sind in der Natur omnipräsent und regulieren eine Vielzahl von fundamentalen biochemischen Prozessen. Sie stellen eine faszinierende Untergruppe von Ribonukleinsäure-Molekülen dar. Ihre Eigenschaften erlauben eine hohe strukturelle Dynamik. Sie binden spezifische Botenstoffe mit hoher Selektivität und Sensitivität und regulieren die Vervielfältigung von Genen als Antwort auf die Bindung der spezifischen Botenstoffe. Ribonukleinsäuren (RNS) sind Biopolymere, bestehend aus einer langen Sequenz, die aus vier verschiedenen Nukleotiden aufgebaut ist. Bislang waren RNS-Moleküle in Organismen vor allem durch ihre passive Rolle als Blaupause einer Desoxyribonukleinsäure-Sequenz (DNS-Sequenz) in der Synthese von Proteinen bekannt. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden jedoch RNS-Moleküle entdeckt, die auch aktive Eigenschaften besitzen [1, 2]. Dazu gehört zum Beispiel die Gruppe der enzymalen RNS, sogenannte Ribozyme. Diese katalysieren chemische Reaktionen in Bakterien [3–5].

In ihrer natürlichen Umgebung in Zellen bilden RNS-Moleküle innerhalb einer wässrigen Lösung mit spezifischen Ionenkonzentrationen dreidimensionale Strukturen, welche die Funktion des Moleküls bestimmen. Diese funktionalen Strukturen werden als native Konformation bezeichnet. Den Prozess, bei dem das lineare Biopolymer in seine native Konformation übergeht, nennt man Faltung. Ein Hauptinteresse der heutigen Erforschung von Biopolymeren ist es, zu verstehen, welche Molekülstrukturen welche Funktionalitäten übernehmen können. Aus dem tieferen Verständnis der katalytischen und regulatorischen Fähigkeiten von RNS-Molekülen erhoffen sich Wissenschaftler vielfältige Anwendungspotentiale in der synthetischen Biologie oder der Gentechnik. Riboschalter im Speziellen sind für therapeutische Anwendungen auf dem Gebiet der Krebsforschung [6] oder der Antibiotika-Entwicklung vorstellbar [7–9].

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Molekülstruktur und Funktion wurden zusammen mit der Proteinforschung immer leistungsfähigere Methoden entwickelt. Dazu gehört beispielsweise Simulationssoftware, welche die Faltung von Biomolekülen auf immer längeren Zeitskalen berechnen kann. Ebenso wurden die experimentellen Techniken sukzessive verbessert. So konnten die Syntheseverfahren zur Herstellung immer größerer und komplexerer Biomoleküle optimiert werden. Messaufbauten mit leistungsfähigeren Mikroskopen ermöglichen auch Untersuchungen von lichtschwachen Proben auf immer kürzeren Zeitskalen. Dies ebnete den Weg für Untersuchungen einzelner, fluoreszenzmarkierter Biomoleküle, wie sie in dieser Arbeit an Riboschaltern durchgeführt wurden. Solche Einzelmolekülexperimente bieten gegenüber den üblichen Ensemblemessungen an einer Vielzahl von Molekülen, den Vorteil, dass Mittelungen der Messdaten vermieden werden. Durch Zuhilfenahme des Försterresonanzenergietransfers (FRET) können die Struktur und die Dynamik einzelner Moleküle bis in den Nanometerbereich vermessen werden. In Kombination mit einer hohen Zeitauflösung der Messung ist es so möglich, mit Einzelmolekülexperimenten selbst seltene Subpopulationen von Molekülzuständen nachzu-

1 Einleitung

weisen. Im Gegensatz zu invasiven Methoden, wie der Einzelmolekülkraftspektroskopie, machen Einzelmolekül-FRET-Experimente auch nicht invasive, *in-vivo* Untersuchungen möglich. Biomoleküle wie Riboschalter besitzen eine komplexe Struktur und Faltungsdynamik, sodass einfache Analysemethoden oft nicht ausreichen, genügend Rückschlüsse aus den Messdaten zu ziehen. Um ein detaillierteres Ergebnis zu erhalten, bedarf es einer ausgeklügelten Analysesoftware, zum Beispiel einer Hidden-Markov-Modellanalyse (HMM), wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Durch die Verwertung sowohl spektroskopischer als auch zeitlicher Informationen aus den Messdaten können nämlich Faltungszustände identifiziert werden, welche bei konventionellen Analyseverfahren nicht sichtbar geworden wären. Dadurch kann ein besseres Wissen über die Funktion der Riboschalter erlangt werden.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie und der Anwendung einer HMM-Analyse der sogenannte SAM-I-Riboschalter untersucht. Er gehört zu einer Gruppe von Riboschaltern, die den Botenstoff S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) binden und damit die Genregulierung auf transkriptioneller Ebene beeinflussen. Sie sind Bestandteil der fundamentalen Biosynthese von Cystein, Methionin und SAM-Metaboliten [10, 11]. Bislang ist wenig über Konformationen und Faltungsdynamik eines vollständigen SAM-I-Riboschalters bekannt, sodass der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Erforschung der Energielandschaft des vollständigen *Bacillus subtilis yitJ* SAM-I-Riboschalters gelegt wurde.

Gliederung der Arbeit

Kapitel 2 bildet die Basis zum Verständnis dieser Arbeit. Neben den biochemischen Grundlagen über Ribonukleinsäuren und Riboschalter werden auch die Grundlagen der Struktur und Faltung von RNS-Molekülen beschrieben. Im Weiteren wird auf die für diese Arbeit wichtigen Begriffe Fluoreszenz, Försterresonanzenergietransfer sowie Fluoreszenzmikroskopie eingegangen. Schließlich wird noch die Theorie eines HMM beschrieben, da es einen zentralen Anteil in der Auswertung der gemessenen Einzelmolekültrajektorien spielt.

In Kapitel 3 werden detailliert die verwendeten Messmittel und Methoden erläutert. Angefangen mit den Beschreibungen des Konfokalmikroskops und des Internen Totalreflektionsmikroskops wird auch auf die Vorbereitung der verwendeten Pufferlösungen und der Probenpräparation eingegangen. Anschließend wird die Datenerfassung sowie die Auswertung und Korrektur der Messdaten behandelt. Hierbei wird gezielt zwischen den Messungen an frei diffundierenden und an immobilisierten Molekülen unterschieden. Da zur Auswertung eine speziell für Einzelmolekül-FRET-Daten entwickelte HMM-Analysemethode verwendet wurde, wird das konkrete Vorgehen der Anwendung beschrieben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in Kapitel 4 aufgeführt. Hier werden zuerst wichtige Voruntersuchungen beschrieben, welche sicherstellen, dass funktionsfähige Riboschaltermoleküle vermessen wurden. Anschließend werden die Ergebnisse der Messungen von verschiedenen Konstrukten des Riboschalters in Abhängigkeit von Liganden- und Ionenkonzentration präsentiert und die grundlegenden Eigenschaften des Riboschalters herausgearbeitet und diskutiert. Im nächsten Schritt werden dann die Daten der Einzelmolekültrajektorien eines Konstruktes sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit des Liganden

SAM dargestellt, und die daraus erhaltene Faltungsdynamik diskutiert. Weiterhin wird beschrieben, wie das daraus erhaltene Vierzustandsmodell durch eine quantitative Histogrammanalyse und durch Hinzunahme struktureller Abschätzungen auf alle Messdaten zweier Konstrukte angepasst werden konnte. Danach folgt, wie durch die Erweiterung der Messdaten eines dritten Konstrukts das Vier- in ein Fünfstanzmodell erweitert werden konnte. Anschließend wird ein weiterer Datensatz diskutiert, welcher das Verhalten des Riboschalters in Anwesenheit von S-Adenosylhomocystein (SAH), einem Abbauprodukt von SAM, zeigt. Schließlich werden die Ergebnisse in Kapitel 5 zusammengefasst. Zusätzlich finden sich im Anhang detaillierte Präparationsprotokolle, statistische Informationen der Messdaten sowie weitere Informationen über Funktion und Justage des akustooptischen Strahlteilers.

2 Theoretische Grundlagen

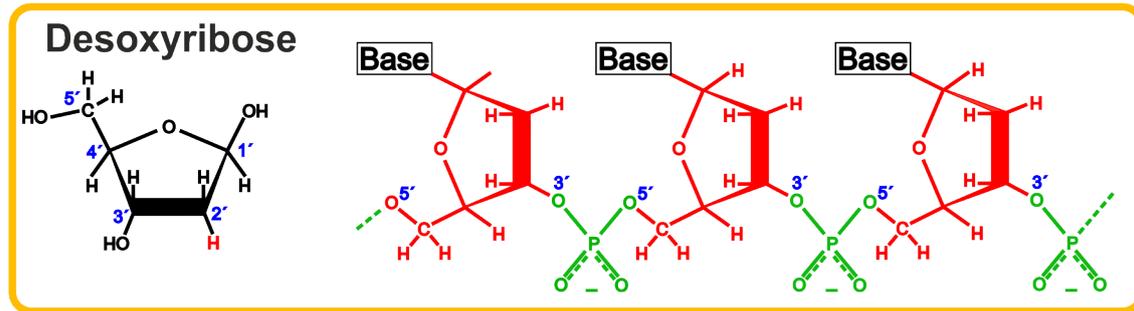
2.1 Ribonukleinsäuren

Die Biomoleküle Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS) dienen als Träger genetischer Informationen. Diese Makromoleküle sind lange lineare Polymere und bestehen aus einer Aneinanderreihung vieler Monomere, den Nukleotiden. Jedes Nukleotid ist aus drei Teilen zusammengesetzt: einem Zucker, einer Phosphatgruppe sowie einer von vier verschiedenen Basen. Dabei ist in einem Nukleotid die Phosphatgruppe an das 5'-Kohlenstoffatom des Zuckers gebunden und eine der vier Basen an das 1'-Kohlenstoffatom (**Abb. 2.1.1**). Die Verkettung der Nukleotide zu einem Polymer entsteht dadurch, dass das 3'-Kohlenstoffatoms des Zuckers eines Nukleotids mit dem 5'-Kohlenstoffatoms des Zuckers des nachfolgenden Nukleotids über eine Phosphodiesterbrücke verbunden ist. Die Kette der Phosphat- und der Zuckergruppen bilden das sogenannte Rückgrat. Die Sequenz der Basen entlang des Rückgrates bildet eine Kodierung, welche der eigentliche Träger genetischer Information ist, die von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden kann.

DNS und RNS unterscheiden sich in zweierlei Hinsicht: Erstens ist der Zucker der RNS die Ribose, dagegen ist die Desoxyribose der Zucker der DNS (**Abb. 2.1.1**). Im Gegensatz zur Ribose fehlt der Desoxyribose ein Sauerstoffatom am 2'-Kohlenstoffatom des Zuckers. Dies macht die DNS im Vergleich zur RNS weniger anfällig für eine Hydrolyse, und ist mutmaßlich der Grund, warum sich im Laufe der Evolution die DNS als stabilerer Datenträger des Gencodes durchgesetzt hat. Zweitens setzen sich DNS und RNS aus nur den drei gemeinsamen Basen Guanin (G), Cytosin (C) und Adenin (A) zusammen. Die vierte Base der DNS ist Thymin (T), die vierte Base der RNS ist hingegen Uracil (U) (**Abb. 2.1.2**) [12].

In der Natur sind zwei komplementäre Einzelstränge über sogenannte Watson-Crick-Basenpaare zu einem Doppelstrang miteinander verbunden. Dies sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen G und C sowie zwischen A und T beziehungsweise U für jeweils DNS und RNS. Die Doppelstränge winden sich in einer regelmäßigen helikalen Struktur zur sogenannten Helix. Bis heute wurden drei verschiedene Helix-Typen nämlich der A-, B- und Z-Typ, entdeckt, welche sich in ihrer Gestalt unterscheiden. Die Strukturen der A- und B-Helix sind natürlicherweise in Organismen zu finden und zeichnen sich durch ihren rechtshändigen Drehsinn der Helix aus. Bedingt durch den Unterschied der Zucker von RNS und DNS finden sich RNS-Helices vor allem in einer A-Typ-Struktur und DNS-Helices meist als B-Typ (**Abb. 2.1.2**). Der Z-Typ besitzt eine linkshändige Helix. Für diese Arbeit ist nur der A-Typ relevant, und wird in einem späteren Kapitel näher betrachtet.

DNS - Rückgrat



RNS - Rückgrat

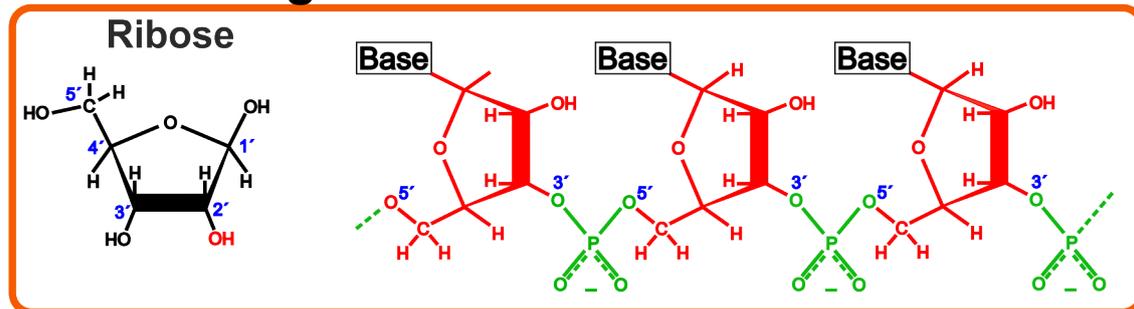


Abbildung 2.1.1: Die Zucker und das Rückgrat der DNS und RNS. Der Zucker der DNS ist die Desoxyribose. Im Gegensatz zur Ribose, dem Zucker der RNS, ist nur ein Wasserstoffatom und keine OH-Gruppe an das 2'-Kohlenstoffatom des Zuckers gebunden. Das Rückgrat beider Polymere entsteht durch die 3'-5'-Phosphodiesterbrücke zwischen zwei Zuckern. Die Zucker sind rot, die Phosphatgruppen sind grün markiert. Die Basen sind jeweils an das 1'-Kohlenstoffatom des Zuckers gebunden [12].

Während die DNS fast ausschließlich als Datenspeicher genutzt wird, übernehmen RNS-Moleküle eine Vielzahl von Aufgaben in fast jedem Organismus. Vor allem haben RNS-Moleküle eine Schlüsselfunktion in der Genexpression; dem Schritt in einem Organismus, in dem die genetische Information nutzbar gemacht wird, wie zum Beispiel bei der Herstellung jeglichen Proteins. Die Synthese von RNS-Molekülen aus einem DNS-Strang wird Transkription genannt. Dabei wird die RNS-Synthese von einem großen Enzym, der RNS-Polymerase, katalysiert und kann in drei Schritte unterteilt werden: Initiierung, Elongation und Termination.

Zunächst sucht die RNS-Polymerase die DNS-Doppelhelix nach einem sogenannten Promotor ab, dem Teil der Sequenz, welcher als Startsignal gilt und die Transkription initiiert. Darauf bricht die RNS-Polymerase ungefähr 17 Watson-Crick-Basenpaare auf und kann dann die DNS-Doppelhelix abwickeln, wobei davon ein Einzelstrang als Schablone für das Schreiben der RNS-Sequenz (*engl. messenger RNS*, mRNA) dient. Der Ausleseprozess und damit die Bewegung der RNS-Polymerase entlang der DNS besitzt dabei die Richtung vom 3'-Ende zum 5'-Ende des DNS-Rückgrates. Die Elongation der komplementären mRNA beginnt am 5'-Ende in Richtung des 3'-Endes des RNS-Rückgrates. Die RNS-Polymerase erreicht dabei Auslesegeschwindigkeiten von 40 bis 90 Nukleotiden pro Sekunde [13]. Das Abbruchsignal, das die Transkription terminiert, befindet sich

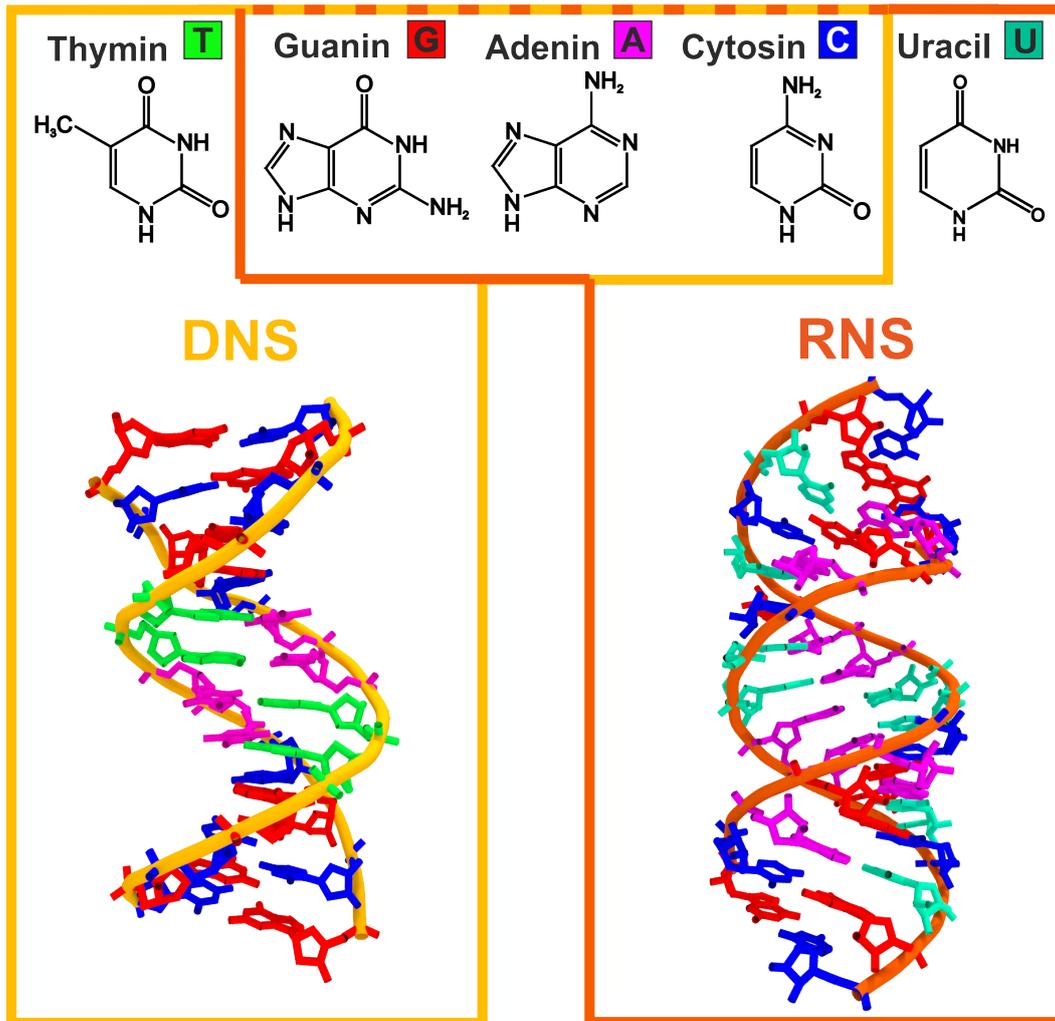


Abbildung 2.1.2: Unterschied zwischen DNS und RNS. Die drei Basen Guanin (rot), Cytosin (blau) und Adenin (magenta) sind sowohl Bestandteile von DNS als auch von RNS. Unterschiedlich bei beiden Polymeren ist Thymin (hellgrün) bei DNS und Uracil (cyan) bei RNS. Weiterhin unterscheiden sich beide in ihrem Zucker, eingebaut im Rückgrat – Desoxyribose beim DNS-Rückgrat (gelb) und Ribose bei RNS-Rückgrat (orange). Die linke 12mer Doppelhelix zeigt die Kristallstruktur einer B-DNS-Struktur (PDB-ID: 1BNA [14]). Die rechte Struktur zeigt die Kristallstruktur einer 16mer RNS-Doppelhelix in der A-DNS-Struktur (PDB-ID: 5KVJ [15]).

im neu synthetisierten mRNA-Strang anstatt in einer Teilsequenz der DNS-Schablone. Die Terminierung der Transkription kann sowohl durch proteinabhängige als auch durch proteinunabhängige Varianten erfolgen:

- Eine Variante ist eine Terminierung durch das sogenannte *rho*-Protein. Erkennt das *rho*-Protein cytosinreiche RNS-Sequenzen der neu synthetisierten mRNA, bindet es so an den RNS-Strang, dass dieser durch das Zentrum des *rho*-Proteins gefaltet wird. Dann wandert es entlang des mRNA-Stranges hin zur RNS-Polymerase. Schließlich trennt das *rho*-Protein die DNS-RNS-Hybridhelix auf.

2 Theoretische Grundlagen

- Eine weitere Variante eines Abbruchsignals ist die Bildung einer Haarnadelschleufe aus einer GC-reichen Teilsequenz der neu synthetisierten mRNS (**Abb. 2.1.3**). Eine solche Haarnadelschleufe bildet eine stabile Struktur. Ihre Watson-Crick-Basenpaarung ist durch drei Wasserstoffbrückenbindungen stärker als die zwischen A und T, welche aus nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen besteht. Der stabilen Haarnadelschleufe folgt eine Sequenz von fünf U-Nukleotiden. Man nimmt an, dass bei der Ausbildung einer Haarnadelschleufe eine Auslesepause der RNS-Polymerase erzeugt wird. Da die Bindung von U und A durch nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen die schwächere Watson-Crick-Basenpaarung ist, bekommt man durch die fünf U-Nukleotiden eine instabile Bindung. Letztlich bewirkt die Kombination aus der Transkriptionspause, erzeugt durch die Haarnadelschleufe, und die schwach gebundene Uracil-Adenin DNS-RNS-Hybridhelix einen Abbruch der Transkription. Die DNS-Schablone löst sich von der Polymerase ab und bildet wieder seinen DNS-Doppelstrang. Daher nennt man eine solche Haarnadelschleufenstruktur gefolgt von fünf U-Nukleotiden auch Terminator.

RNS-Moleküle, die abhängig vom Bindungsstatus zwischen zwei Strukturen falten, wobei eine davon den Abbruch eines Prozesses zur Folge hat (Terminator-Struktur, T) und die andere den laufenden Prozess nicht beeinflusst (Anti-Terminator-Struktur, AT), nennt man Riboschalter (RS).

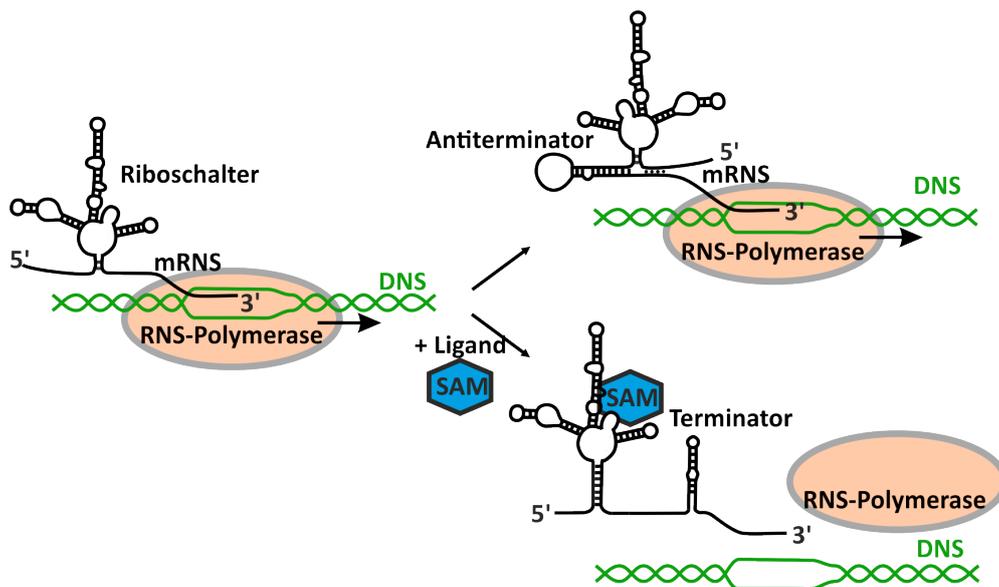


Abbildung 2.1.3: Transkription des SAM-I-Riboschalters. Schematische Darstellung des Ablaufs des Transkriptionsprozesses anhand des SAM-I-Riboschaltermoleküls. Die schwarze mRNS Struktur hat bereits das Aptamer ausgebildet und ist in der katalytischen Tasche der RNS-Polymerase (als Ellipse vereinfacht dargestellt) an die Schablone des DNS-Strangs gebunden. Im Falle der Abwesenheit des Liganden wird der obere Weg eingenommen, in welchem die Transkription nicht abgebrochen wird, da sich die AT-Struktur ausgebildet hat. Ist jedoch eine genügend hohe Konzentration an SAM vorhanden, bindet SAM am Aptamer, formt die T-Haarnadelschleufe und bricht die Transkription ab.

2.2 Riboschalter

Die Bildung einer Haarnadelschleife kann auch durch das Vorhandensein gewisser Botenstoff beeinflusst werden. Einer dieser Kontrollmechanismen beruht darauf, dass manche mRNS-Sequenzen die Fähigkeit besitzen, komplexe Strukturen einzunehmen, welche durch die Bindung gewisser Botenstoffmoleküle (Metaboliten oder Liganden) die RNS-Struktur ändern. Moleküle mit dieser Eigenschaft werden Riboschalter genannt. Riboschalter gehören zum nicht-kodierenden Teil eines mRNS-Strangs und sind sogenannte *cis*-wirkende Elemente in der Genregulierung. Dies bedeutet, dass sie ein Teil genau der Erbsequenz eines bestimmten Gens sind, dessen Transkription oder Translation sie selbst regulieren [16].

Abhängig vom Bindungszustand bestimmter Botenstoffe ändern die Riboschalter ihre strukturelle Konformation und können daher zwischen einem „AN“- und einem „AUS“-Zustand schalten. Riboschalter, die auf transkriptioneller Ebene wirken, nehmen unter Bindung eines Liganden bevorzugt den Terminatorzustand ein (siehe **Abb. 2.2.1**).

Diejenigen Riboschalter, welche die Translation, also die Synthese von Proteinen, beeinflussen, können durch die Bindung eines Liganden, die Synthese von Proteinen verhindern. Bindet ein RS einen Liganden, wird durch die Umorientierung der RNS-Struktur eine sogenannte Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) innerhalb einer Terminatorstruktur eingebaut und bleibt somit vor dem Ribosom verborgen [17–20]. Die SD-Sequenz ist eine adenin- und guaninreiche Teilsequenz der mRNS, die sich noch vor der Startsequenz der Translation, dem Start-Codon, befindet. Die SD-Sequenz bindet an einen komplementären Strang der ribosomalen RNS (rRNS) und gilt als einer von zwei Teilen, welche den Beginn der Proteinsynthese bestimmen [12, 21].

In dieser Arbeit werden nur Riboschalter untersucht, die auf transkriptioneller Ebene wirken. Eine RNS-Sequenz am 5'-Ende einer nicht kodierenden mRNS, welche eine regulierende Wirkung auf transkriptioneller Ebene besitzt, wurde zuerst von Nahvi et al. [22] 2002 beschrieben. Dort wurde beobachtet, dass die Bindung des Koenzyms B12 an den mRNS-Strang eine Umorientierung der RNS-Struktur hervorruft. Die Bindung des mRNS-Strangs an das Ribosom wird gehemmt und schließlich die Reduktion der Synthese eines bestimmten Proteins herbeigeführt.

Im Laufe der Jahre wurden immer mehr solcher Riboschalter entdeckt, sodass man heute 14 verschiedene Arten unterscheidet: Neben den beiden Unterarten der Vitamin B12-RS [22, 23], wurden Glycin- [24] und Lysin-RS entdeckt [25–27]. Ebenso wurden purinbindende Riboschalter, zu denen der Adenin-RS [24, 28] und der Guanin-RS zählen, gefunden [28, 29]. Weitere Riboschalter sind der Thiaminpyrophosphat-RS (TPP-RS) [30, 31], der Flavinmononukleotid-RS (FMN-RS) [18, 30], der preQ₁-RS [32], der Glucosamin-6-Phosphat-RS [18] und der Magnesium-RS [33]. Daneben wurden auch S-adenosyl-L-methionin (SAM)-bindende Riboschalter entdeckt, wovon sechs Untergruppen existieren [7, 10, 34–39].

Die Struktur der Riboschalter lässt sich in drei verschiedene funktionale Gruppen unterteilen: Aptamer, Expressionsplattform und Schaltsequenz. Das Aptamer ist der Biosensor eines Riboschalters. Er besitzt die Fähigkeit, den spezifischen Liganden mit hoher Sensitivität zu binden, denn die Affinität der Riboschalter gegenüber ihren Liganden liegt im niedrigen Nanomolarbereich [40]. Zusätzlich besitzt das Aptamer eine hohe Selektivität

gegenüber Molekülen die dem Liganden ähnlich sind. Diese Selektivität zeichnet sich durch die meist $> 100\times$ Differenz zwischen den Bindungsaffinitäten von riboschalterei- genem und -ähnlichem Liganden aus [38].

Die Expressionsplattform ist die signalgebende Struktur, die abhängig vom Bindungs- zustand des Liganden am Aptamer, unter der Annahme eines vereinfachten Zwei-Zustands- modells, zwischen zwei sich gegenseitig ausschließenden Haarnadelschlaufenstrukturen hin- und herschaltet. In der Abwesenheit des Metaboliten nimmt die Expressionsplattform die sogenannte Antiterminatorstruktur (AT) ein, den „AN-Zustand“ und die Transkription wird fortgeführt. In Anwesenheit des Metaboliten bindet dieser an die Aptamerdomäne, wodurch die Expressionsplattform eine Sekundärstrukturänderung vollzieht und in die Terminatorstruktur (T) faltet, den „AUS-Zustand“ [17–20]. Somit wird die Transkription vorzeitig abgebrochen [9, 18, 37]. Das Bindeglied zwischen der Aptamerdomäne und der Expressionsplattform ist die Schaltsequenz. Sie ist je nach Faltungszustand entweder Teil der AT- oder der T-Struktur und ermöglicht so das Schalten des RS zwischen den beiden sich gegenseitig ausschließenden Strukturen. Daher verhindert die Bildung eines Zustan- des die des anderen [17, 41]. Als ein Teil der Aptamerdomäne können, wie im Fall des SAM-I-Riboschalters, einige Nukleotide der Schaltsequenz Teil der Bindungstasche sein. Somit hat die Bindung des Liganden an die Bindungstasche des Aptamers direkt Ein- fluss auf eine Umstrukturierung der Expressionsplattform. Sie kann als kommunikative Verbindung zwischen beiden Domänen angesehen werden [16].

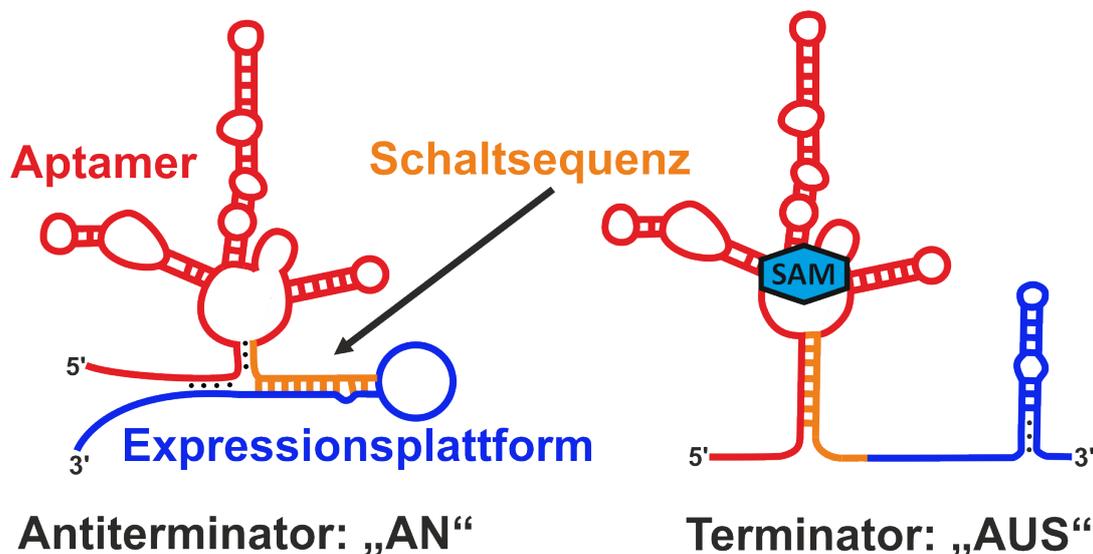


Abbildung 2.2.1: Funktionale Gruppen eines Riboschaltermoleküls. Die Struktur des Riboschalters besteht vereinfacht gesagt aus drei Teilen. Das Aptamer (rote Struktur) ist der Biosensor des Moleküls. Es bildet die Teilstruktur der Bindungstasche aus. Die Expressionsplattform (blaue Struktur) ist der Signalgeber, da dieser Teil je nach Status der Ligandenbindung das „AN“-Signal (Antiterminatorstruktur) oder das „AUS“-Signal (Terminatorstruktur) an das Ribosom übermittelt. Die Schaltsequenz verbindet beide Domänen miteinander und ermöglicht die regulierende Wirkung, da sie je nach Zustand Basenpaarungen mit der Aptamerdomäne oder der Expressionsplattform eingeht [16, 42].

Riboschalter lassen sich bezüglich des Aufbaus ihrer Bindungstasche und der Art und Weise ihrer Faltung als Reaktion auf Ligandenbindung in zwei Typen unterteilen [16]: Sogenannte Typ-I-Riboschalter besitzen eine vorgeformte Tertiärstruktur, die eine einzelne vorgeformte Bindungstasche ausbildet. Die strukturelle Umordnung, als Reaktion auf die Ligandenbindung, beschränkt sich auf die Bindungstasche und deren angrenzende Strukturen, wie zum Beispiel bei den Purin-Riboschaltern [43–45]. Bei Typ-II-Riboschaltern hingegen setzt sich die Bindungstasche aus mehreren Teilstücken des Aptamers zusammen. Die Bindungstasche wird erst durch die Ligandenbindung komplett ausgebildet und stabilisiert. Typ-II-Riboschalter erfahren daher, neben kleineren lokalen Umstrukturierungen, größere strukturelle Konformationsänderungen. Beispiele hierfür sind der TTP-Riboschalter [46] und der SAM-I-Riboschalter [47].

2.2.1 S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) Riboschalter

Die Familie der SAM-bindenden Riboschalter steuert die Expression von Genen. Diese Gene sind sowohl in der Biosynthese von lebensnotwendigen Aminosäuren, wie Cystein und Methionin, als auch in der Biosynthese von SAM selbst beteiligt [48]. Die Relevanz dieser Riboschalter bei der Regulierung der intrazellulären Methionin- und SAM-Konzentration wird durch die Tatsache unterstrichen, dass bis heute bereits sechs Untergruppen der SAM-Riboschalterfamilie entdeckt wurden: SAM-I-RS bis SAM-V-RS und SAM-I/IV-RS [10, 38, 39]. Dabei tritt die Klasse des SAM-I-Riboschalters am häufigsten in Bakterien auf [49]. Während der SAM-III-RS die Translation der SAM-Synthase reguliert, wirken die anderen SAM-RS-Klassen rein auf transkriptioneller Ebene (Synthasen sind Enzyme, welche die Synthese bestimmter Stoffe katalysieren) [10, 11, 38].

SAM ist ein häufig auftretendes Enzymsubstrat und einer der bedeutendsten Methyllieferanten in Methylierungsreaktionen [50, 51]. In der Zelle wird SAM innerhalb des Methylzyklus gebildet. Dabei wird die Reaktion von Methionin und Adenosintriphosphat (ATP) durch die SAM-Synthase katalysiert. Überträgt SAM seine Methylgruppe (CH_3) an einen Methylgruppenakzeptor, entsteht SAH. Im weiteren Verlauf wird SAH durch die SAH-Hydrolase zu Adenosin und Homocystein hydrolysiert. Schließlich wird mit Hilfe der Methioninsynthase aus Homocystein und einer Methylgruppe wieder Methionin katalysiert [52, 53]. Eine Vielzahl von Methylierungsprozessen spielt im Organismus eine zentrale Rolle und wären in Abwesenheit von SAM nicht möglich [54]. Die Moleküle SAM und SAH treten beide innerhalb des Methylzyklus auf. SAM unterscheidet sich von SAH nur durch seine an das Schwefelatom gebundene CH_3 -Gruppe. Diese Methylgruppe wird durch die positive Ladung des Schwefelatoms aktiviert. Somit wird SAM zu einer reaktionsfähigen Verbindung, welche seine CH_3 -Gruppe innerhalb einer Reaktion abgibt [38]. In **Abb. 2.2.2** sind die chemischen Strukturen von SAM und SAH dargestellt. Die zusätzliche Methylgruppe des SAM verleiht dem Schwefelatom eine positive Ladung. SAH besitzt hingegen ein neutrales Schwefelatom.

Ein Schlüsselaspekt der Genregulierung durch den SAM-RS ist seine Fähigkeit zwischen den ähnlichen Molekülen SAM und SAH zu unterscheiden. Man geht davon aus, dass die elektrostatische Komponente des positiv geladenen Schwefelatoms des SAM-Moleküls die hohe Selektivität der SAM-RS gegenüber SAH ermöglicht [55].

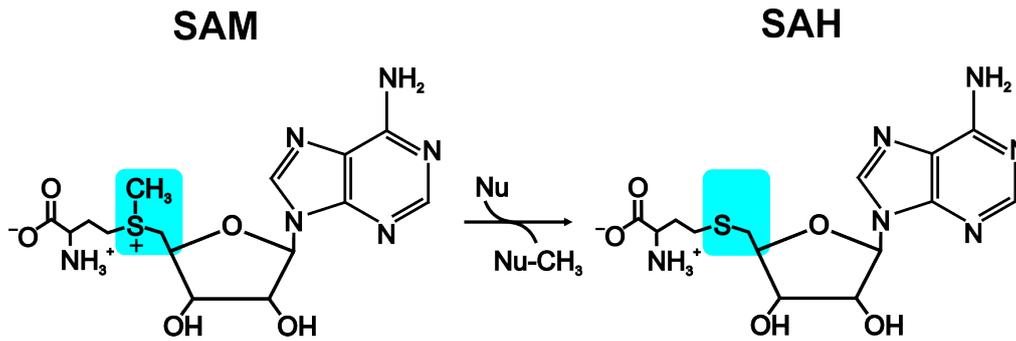


Abbildung 2.2.2: Chemische Strukturen von SAM und SAH. Die Methionin-Adenosyl-Transferase katalysiert die Reaktion mit SAM und einem nukleophilen Substrat **Nu** zu SAH. Beide Moleküle unterscheiden sich lediglich nur in einer Methylgruppe. Durch die katalysierte Reaktion von Methionin und der Adenosylgruppe des ATP zu SAM wird die Methylgruppe durch die positive Ladung des Schwefelatoms aktiviert. SAM wird dadurch zu einer reaktionsfähigen Verbindung.

2.2.1.1 Der SAM-I-Riboschalter

Der SAM-I-Riboschalter des *Bacillus subtilis yitJ* besitzt mit einer Dissoziationskonstante von $K_d \approx 20$ nM eine sehr hohe Bindungsaffinität [56]. Die Affinität von SAM ist $> 100\times$ höher als die seines Abbauproduktes SAH [18]. Um zu verstehen wie der SAM-I-RS den Liganden SAM mit hoher Affinität und großer Selektivität bindet, wurde die Molekülstruktur intensiv untersucht.

Bislang wurden nur detaillierte strukturelle sowie funktionelle Untersuchungen mit dem Aptamer ohne Expressionsplattform durchgeführt (Abb. 2.2.3). Dazu gehören die Vermessung der Kristallstruktur mit und ohne Ligand [47,57], sowie die Aptamer-Liganden-Wechselwirkung [11, 18, 56, 58–63]. Die gefaltete Aptamerstruktur besteht dabei aus vier Helices (P1 – P4, Abb. 2.2.4), welche sich in einem Vierstrang-Holliday-Komplex anordnen. Da der SAM-I-RS ein Typ-II-RS ist, bildet sich die Bindungstasche der Aptamerdomäne erst durch die Bindung des Liganden SAM vollständig aus. Dabei spielen mehrere funktionelle Tertiärstrukturelemente der P1- und der P3-Helix sowie der P1/P2-Einzelstrangsequenz eine Rolle. In Abb. 2.2.3 sind die für die Funktion des Riboschalters wichtigsten Sequenzteile farblich markiert. Im Folgenden werden sie erläutert:

- Die P1- und P4- sowie die P2- und P3-Helix sind aufeinander gestapelt.
- Die Spitzkehre (engl. *kink-turn*, KT) in der P2-Helix ermöglicht die Bildung eines Pseudoknotens (engl. *pseudoknot*, PK). Der PK entsteht durch die Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren zwischen den Nukleotiden 32 bis 35 (CUGG) der P2-Helix und den Nukleotiden 94 bis 97 (CCAG) der P3/P4-Einzelstrangsequenz [47,56]. In Mutationsexperimenten, in denen die RNS-Sequenzen des KT verändert wurden, beobachtete man sowohl einen Verlust der Fähigkeit vom Aptamer, den Liganden SAM zu binden, [59] als auch eine Abnahme der regulierenden Wirkung

des RS [62]. Ebenso konnten McDaniel et al. [64] mit vergleichbaren Mutationsexperimenten zeigen, dass auch eine Zerstörung der Pseudoknotensequenz zu einem Verlust der SAM-bindenden und der regulatorischen Funktion des RS führt.

- Ein Adenosintripel A90 – A92 formt ein Basentripel mit zwei Watson-Crick-Basenpaare der P2-Helix (G29 – C37 sowie G30 – C36). Es unterstützt somit die Bildung des PK.

Während sich die Haarnadelstrukturen (*engl. hairpin structures*) der Helices P2 – P4 jeweils aus benachbarten Sequenzteilen bilden, entsteht die P1-Helix erst durch die Watson-Crick-Basenpaarung weit auseinander liegender Einzelstrangelemente. Im Fall des SAM-I-RS des *Bacillus subtilis yitJ* besteht die P1-Helix aus Watson-Crick-Basenpaaren der RNS-Sequenz U9 – C15 und G118 – A124.

Überraschenderweise sind sich die Kristallstrukturen des SAM-I-Aptamers mit gebundenem und ungebundenem SAM ähnlich. Dies konnte auch bei der Bestimmung der Kristallstruktur anderer Riboschalterfamilien, wie zum Beispiel dem Lysinriboschalter, beobachtet werden [57]. Möglicherweise hat die Kristallisation des Riboschalters dessen Struktur in eine ligandengebundene Form gezwungen. Die Aptamerkristallstruktur des SAM-I-RS ist in **Abb. 2.2.3** zu sehen. Auf die Ausbildung der RS-Struktur nehmen wei-

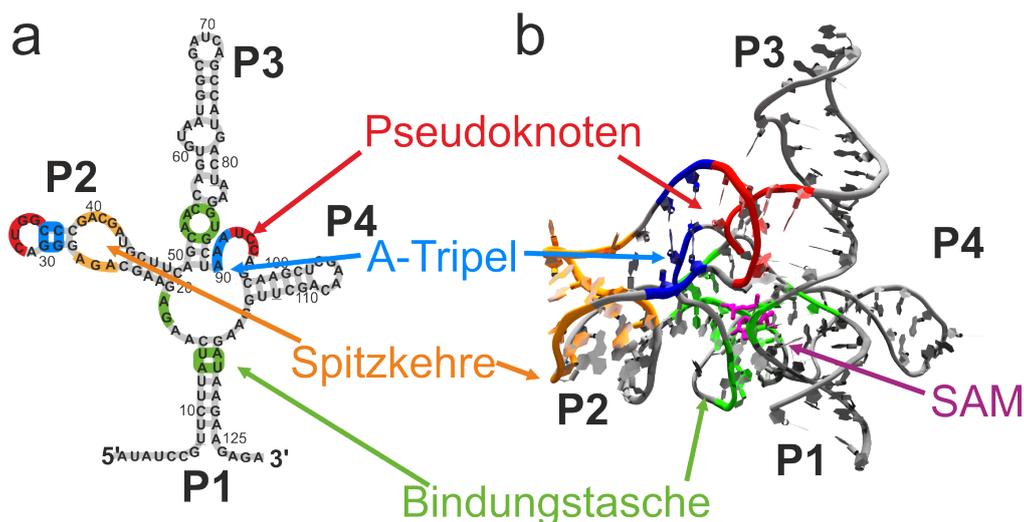


Abbildung 2.2.3: Sekundär- und Tertiärstruktur der SAM-I-Aptamerdomäne. Die farblich hervorgehobenen Strukturen der Sekundärstruktur (a) und der Tertiärstruktur (PDB-ID: 4KQY [56]) (b) heben jeweils dieselben Nukleotide hervor. Sie sind maßgeblich für die Ligandenbindung. Diese strukturellen Merkmale sind stammesgeschichtlich zu > 97% erhalten geblieben. Dazu gehören die Spitzkehre (orange), der Pseudoknoten (rot), Nukleotide, die direkt für die SAM-Bindung verantwortlich sind (grün), und ein Adenosin-Tripel (A-Tripel, blau) [38]. Die grün markierten Watson-Crick-Basenpaare A13 – U120 und U14 – A119 dienen vor allem zur Unterscheidung zwischen SAM und SAH. Die restlichen grün markierten Nukleotide können nicht zwischen SAM und SAH unterscheiden und haben dieselbe ligandenbindende Funktion [58]. (b) Die ausgebildete Bindungstasche, deren Kern aus den grünmarkierten Nukleotiden besteht, bindet den Liganden SAM (magenta) [38].

tere Faktoren Einfluss. So zeigten in-vitro-Experimente, dass der SAM-I-Riboschalter in Anwesenheit von Magnesiumionen eine kompaktere Struktur einnimmt als in deren Abwesenheit, denn die positiv geladenen divalenten Ionen reduzieren die Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen des RNS-Rückgrates. Im Fall des SAM-I-RS sorgen die Magnesiumionen für eine Stabilisierung der Tertiärstruktur. SAM und Magnesiumionen zusammen sorgen für eine vollständige Stabilisierung der Tertiärstruktur des Aptamers. In Anwesenheit von SAM und Magnesiumionen nimmt der SAM-I-RS eine Struktur ein, welche zu jener der gemessenen Kristallstruktur vergleichbar ist [57, 65]. Die strukturelle Anordnung der gestapelten Helices zum Vierstrang-Holliday-Komplex bildet zusammen mit dem KT und dem PK im Zentrum der SAM-I-RS-Struktur die Bindungstasche aus. Da die Bindungsstellen des Liganden SAM aus Teilsequenzen der P1- und der P3-Helix bestehen, spricht man auch von einer zweigeteilten Bindungstasche. Der Adeninteil des SAM-Moleküls bildet ein Basentripel mit den Nukleotiden A53 und U86 der P3-Helix. Der Methioninteil des SAM-Moleküls bildet Wasserstoffbrücken mit den Nukleotiden C52 und G87 der P3-Helix sowie der G18 Nukleinsäure der P1/P2-Einzelstrangsequenz. Das positiv geladene Schwefelatom des SAM-Moleküls wechselwirkt elektrostatisch mit den Riboseteilen der A13 – U120 und der U14 – A119 Basenpaare der P1-Helix [47]. Die SAM-bindenden Teile der Bindungstasche sind in **Abb. 2.2.3** grün markiert. Die positive Ladung des Schwefelatoms, welche SAH fehlt, begünstigt bei SAM die Bildung der P1-Helix. Die Teilsequenz U121 – C130 am 3'-Ende des Aptamers entspricht der Schaltsequenz des SAM-I-RS, da sie sowohl Teil der T- als auch der AT-Struktur ist. Folglich wird durch die Bindung des Liganden SAM an den RS die Ausbildung der P1-Helix initiiert. Die Schaltsequenz wird somit aus der AT- in die T-Struktur überführt und spielt daher für die Stabilisierung der P1-Helix eine entscheidende Rolle für den SAM-I-Riboschalter [66].

Bis heute sind tiefergehende Untersuchungen der allosterischen Strukturen von Aptamer und Expressionsplattform, sowie der Faltung zwischen AT- und T-Zuständen von kompletten Riboschaltern, selten [67, 68]. Eine Kristallstruktur des vollständigen SAM-I-RS existiert nach wie vor nicht. In **Abb. 2.2.4 a, b** sind die Sekundärstrukturen des T- und AT-Zustands des SAM-I-RS abgebildet. Für ein besseres Verständnis der dreidimensionalen Strukturbildung sind in **Abb. 2.2.4 c, d** die Helices als Zylinder schematisch dargestellt. In dieser Arbeit wurde die Energielandschaft des vollständigen SAM-I-Riboschalters (169 nt, *Bacillus subtilis yitJ*) in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen und der SAM-Liganden-Konzentration untersucht. Dazu wurde die Methode des Einzelmolekül-Försterresonanzenergietransfers (smFRET) mit spezifisch fluoreszenzmarkierten Konstrukten angewandt.

2.2.2 RNS-Struktur

Die Funktion eines Biomoleküls steht in direktem Zusammenhang zu seiner Struktur. Der Prozess, in welchem Proteine, DNS und RNS aus ihrem Zustand als elongierte Polymerkette in ihre dreidimensionale, funktionale Struktur finden, bezeichnet man allgemein als Faltung. Obwohl die Faltung von Biomolekülen willkürlich erscheint, beobachtet man bei vielen eine hierarchische Faltung. Dabei unterscheidet man verschiedene Strukturen: die Primär-, die Sekundär- und die Tertiärstruktur. In der Regel läuft die Faltung in dieser Reihenfolge ab, weswegen sie auch als hierarchische Faltung bezeichnet wird [69, 70].

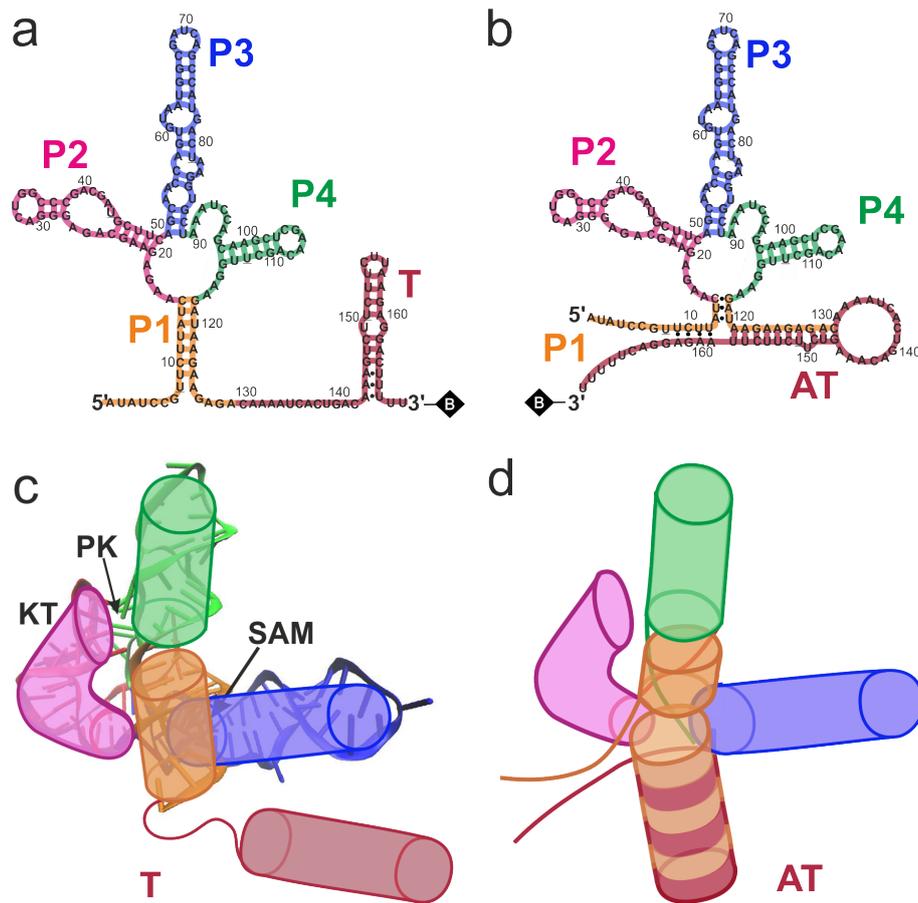


Abbildung 2.2.4: Sekundär- und Tertiärstruktur des SAM-I-Riboschalters. Sekundär- und Tertiärstruktur des *B. subtilis* *yitJ* SAM-I-Riboschalters, bestehend aus 169 Nucleotiden in der Terminator- (a) und Anti-Terminatorstruktur (b). Die Helices des Aptamers sind P1 (orange), P2 (magenta), P3 (blau) und P4 (grün); die Expressionsplattform ist in dunkelrot dargestellt. Das 3'-Ende des SAM-I-Riboschalters ist mit einem Biotin (schwarze Raute) funktionalisiert. (c) Schematische Darstellung der Terminatorstruktur. Das Aptamer überlagert hier die von Lu et al. [56] gemessene Kristallstruktur (PDB-ID: 4KQY). Die Helices P1 – P4 sowie der Terminator T sind als Zylinder dargestellt, entsprechend dem Farbcode der Sekundärstrukturen. PK und KT beschreiben jeweils den Pseudoknoten und den Kink-Turn. Die SAM-Bindungstasche wird durch den schwarzen Pfeil markiert. (d) Schematische Darstellung der AT-Struktur mit P2, P3 und P4 in der Anordnung wie in der Kristallstruktur. P1 und P4 sind in der gestapelten Struktur, wie von Boyapati et al. [68] vorgeschlagen wurde, angeordnet.

Die Primärstruktur von RNS und DNS ist die Sequenz der miteinander verbundenen Nucleinsäuren. Mit der Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren faltet diese Kette auf sich selbst und bildet die Sekundärstruktur. Damit einher geht bei DNS und RNS die Ausbildung von Helices, Haarnadelschleifen sowie von inneren Schleifen und Ausbuchtungen. Im weiteren Verlauf können einzelne Elemente der Sekundärstruktur miteinander wechselwirken und bilden damit eine komplexe dreidimensionale Struktur: die Tertiärstruktur. Zu den Tertiärstrukturelementen gehören Pseudoknoten, Haarnadelschleifen und aufeinander

ander gestapelte Helices. Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und weitere ionische Wechselwirkungen tragen ebenso zur Ausbildung der Tertiärstruktur bei [71].

2.2.3 RNS-Faltung

Sobald ein RNS-Molekül durch die Transkription synthetisiert wird, beginnt es zu falten. Durch die Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren entstehen innerhalb weniger Mikrosekunden lokale Haarnadelschlaufen. Nach Bildung solcher Sekundärstrukturen werden diese in ihrer gegenseitigen Position und Orientierung zueinander strukturell eingeschränkt. Zum einen beschränken die einzelsträngigen Verbindungssequenzen der Sekundärstrukturen diese in ihrer räumlichen Ausrichtung. Zum anderen bilden sich Tertiärstrukturen, welche die Sekundärstrukturelemente miteinander verknüpfen [72]. Typischerweise findet die schnelle und stabile Faltung von Sekundärstrukturen auf kleineren Zeitskalen als bei der Tertiärstrukturbildung statt. Der RNS-Faltungsprozess wird oft als hierarchisch bezeichnet, da sich Tertiärstrukturen erst nach der Ausbildung von Sekundärstrukturen ausbilden können [73]. Als Biopolymere, bestehend aus vier unterschiedlichen Bausteinen, übernehmen RNS-Moleküle eine Vielzahl von Aufgaben. Erst wenn sie eine bestimmte Tertiärstruktur einnehmen, erhält ihre dreidimensionale Architektur eine spezifische Schlüsselfunktion in Zellen. Dazu gehört die Fähigkeit, spezifische Botenstoffe mit hoher Selektivität und Affinität durch das Ausbilden einer Bindungstasche zu binden, als Katalysator zu wirken, oder signalgebende Strukturen, wie im Fall eines Riboschalters, auszubilden. Mit dem Wissen dieser zentralen und wichtigen Rolle der RNS-Moleküle ist es wichtig zu verstehen, wie aus einem linearen Polymer eine 3D-Struktur wird, die genau die gewollte Aufgabe erfüllt [74]. Dieses Phänomen ist als RNS-Faltungsproblem bekannt.

Im Gegensatz zur Proteinfaltung ist die RNS-Faltung noch wenig untersucht. Zudem wird die Interpretation der RNS-Faltung durch folgende Gegebenheiten erschwert:

- Die Basen der vier RNS-Nukleotide sind sich chemisch ähnlich und interagieren durch Wasserstoffbrückenbindungen (WCB-Paare) sowie durch Stapeln der Basen aufeinander. Ebenso stellt ihre polyelektrolytische Natur, die durch die geladenen Phosphatgruppen entsteht, eine Schwierigkeit dar.
- Das gleichmäßige hydrophile Rückgrat macht zusammen mit der geringen Vielfalt der Nucleinsäuren die RNS eher zu einem Homopolymer als zu einer Polypeptidkette [75]. Das bedeutet, dass die RNS viele alternative Konformationen einnehmen kann, welche ähnlich zu den funktionalen nativen Konformationen sind. Die Energielücke zwischen den fehlgefalteten und den gefalteten Konformationen, die Stabilitätslücke, ist meist gering. Somit ergibt sich für die Faltung von RNS eine raue Energielandschaft mit vielen metastabilen Zuständen. Die funktionale Zuordnung der Konformationen ist daher nicht immer eindeutig.
- Nicht alle Nucleotide gehen WCB-Paarungen ein. Das erschwert die Vorhersage, welche Sekundärstrukturen ausgebildet werden. Statt der WCB-Paarungen bilden

sich dann Strukturen wie zum Beispiel Ausbuchtungen oder Schleifen. Diese dienen als wichtige Strukturelemente, welche unabhängige Helices miteinander verbinden.

- Die Faltung von RNS ist stark abhängig von der Anwesenheit von Kationen. Dabei spielt die Größe und die Ladung sowie die Form der Kationen eine entscheidende Rolle, da diese die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur beeinflussen. Die variierende Flexibilität unterschiedlicher RNS-Strukturen und der Einfluss der Ionen auf die Faltung ist schwer vorhersehbar [74].

In reinem Wasser existieren RNS-Moleküle in einem entfalteten Zustand, ihrem Einzelstrangzustand. Denn durch die negativ geladenen Phosphatgruppen des Rückgrats ist die elektrostatische Abstoßung so groß, dass eine Faltung der RNS-Moleküle nicht möglich ist. Erst indem man Salzionen wie zum Beispiel Na^+ , K^+ oder Mg^{2+} hinzufügt, wird die Faltung in kompaktere Strukturen ermöglicht, indem sich die Salzionen am Rückgrat anlagern und die negativen Ladungen abschirmen. Schon bei niedrigen Salzkonzentrationen wird die Ausbildung von WCB-Paarungen ermöglicht, sodass sich die Sekundärstrukturelemente des RNS-Moleküls ausbilden können. Die Zugabe von divalenten Ionen wie Mg^{2+} stabilisiert die Tertiärstruktur der RNS, die in Anwesenheit von nur monovalenten Ionen wie Na^+ oder K^+ sehr viel weniger stabil ist. Dabei erzeugen divalente Kationen eine stärkere Verdichtung der RNS-Struktur. Magnesiumionen, welche ein viel höheres Volumen-zu-Dichte-Verhältnis als monovalente Ionen besitzen, erzeugen schon bei viel geringeren Konzentrationen einen strukturellen Kollaps (**Abb. 2.2.5**). Mg^{2+} -Ionen sind vor allem zur Ausbildung von Tertiärstrukturen wichtig, da diese Strukturen oft Bindungstaschen für Magnesiumionen ausbilden und diese spezifisch binden [76, 77].

Während also monovalente Ionen vor allem zur Ausbildung von Sekundärstrukturen und zu einer gewissen strukturellen Verdichtung beitragen, erzeugen divalente Ionen wie Magnesium die Faltung der nativen, funktionalen Konformationen von RNS-Molekülen [78]. Unter physiologischen Bedingungen findet man in Zellen Na^+ -Konzentrationen im Bereich von ≈ 150 mM und Mg^{2+} -Konzentrationen im Bereich von ≈ 1 mM [79]. Jedoch benötigt man für in-vitro-Experimente oft höhere Mg^{2+} -Konzentrationen. Dies kann mehrere Gründe haben:

- Ausgleich der Strukturstabilisation durch andere Stoffe, wie zum Beispiel Proteine und andere zelluläre Stoffe
- Erforschung von künstlichen RNS-Strukturen, bei welchen physiologische Bedingungen keine Rolle spielen
- Erforschung von Konstrukten, deren Aktivität erst bei höheren Konzentrationen erreicht wird
- Erzeugung von thermodynamischen und kinetischen Bedingungen, welche die Aufnahme der Daten begünstigen

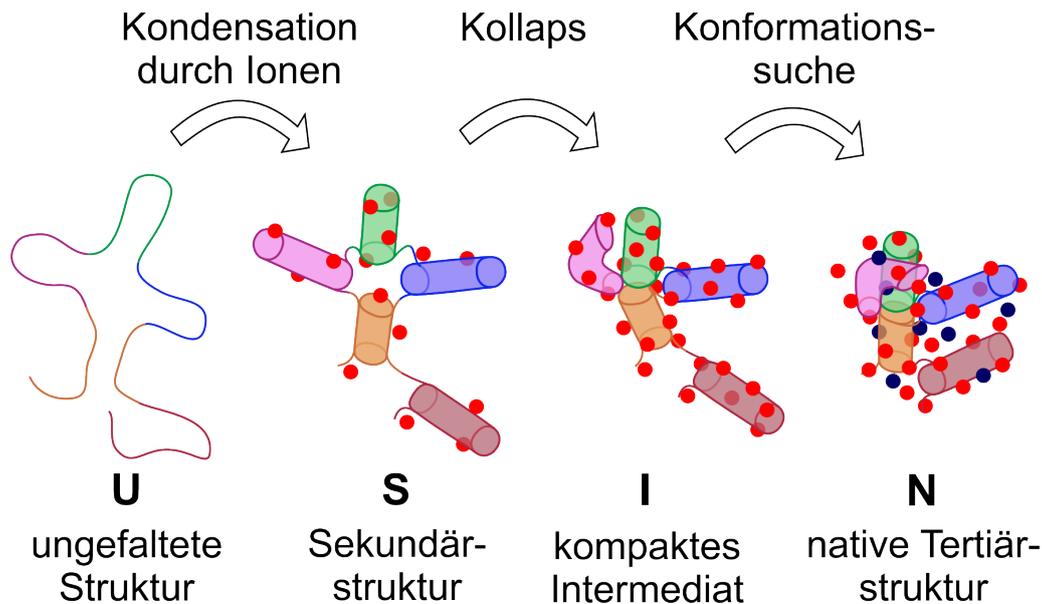


Abbildung 2.2.5: Ioneninduzierte hierarchische Faltung von RNS-Molekülen. Nach Zugabe von monovalenten Salzionen (rote Punkte) kondensieren diese am negativ geladenen Rückgrat des ungefalteten RNS-Polymers (**U**). Sind > 90 % der Phosphatladungen des Rückgrates durch Ionen neutralisiert, so ist die abschirmende Wirkung groß genug, sodass die RNS auf sich selbst falten kann. Mit WCB-Paarungen wird die Sekundärstruktur (**S**) ausgebildet. Durch die weitere Erhöhung der Ionenkonzentration tritt eine starke strukturelle Verkleinerung ein, der sogenannte Kollaps. Durch die Anordnung der Helices untereinander falten die Moleküle entweder in die zu ihrer nativen Konformation ähnliche Struktur oder es bilden sich metastabile Zwischenzustände (**I**) aus. Durch Zugabe divalenter Ionen (dunkelblaue Punkte) wie zum Beispiel Mg^{2+} induziert man die Stabilisierung der Tertiärstruktur und erreicht somit den Übergang zum nativen Zustand (**N**) des RNS-Moleküls [77].

Titrationsexperimente mit Salzionen decken eine hierarchische Faltung der Strukturen auf. Dabei erkennt man, dass sich zunächst die stabileren Sekundärstrukturen bilden, bevor sich die Tertiärstrukturelemente ausbilden [80].

Eine physikalische Beschreibung des Faltungsmechanismus findet sich in der Berechnung einer Energielandschaft [81,82]. Die Faltung von Biopolymeren, wie Proteinen, DNS oder RNS, kann als eine gerichtete stochastischen Suche interpretiert werden, wobei der Gradient der potentiellen Energie so ausgerichtet ist, dass das Molekül in den niedrigsten energetischen Zustand, den gefalteten, nativen Zustand gelangt. Die Form einer solchen Energielandschaft lässt sich als Trichter beschreiben [83]. Dabei repräsentiert jeder Punkt in einem solchen Trichter einen Zustand mit der Gibbsschen freien Energie G [84]:

$$G = H - TS. \quad (2.1)$$

Die Gibbssche freie Energie (freie Enthalpie) setzt sich zusammen aus der Enthalpie H und der mit der Temperatur T gewichteten Entropie S . Mit der Enthalpie gehen die Beiträge der Bindungen der Polymerkette in die **Gl. 2.1** ein. Dabei sind die Beiträge der kovalenten Bindungen zwischen den Nukleinsäuren zu vernachlässigen, da sie unter phy-

siologischen Bedingungen von Druck und Temperatur stabil sind. Wesentlich wichtiger ist die Betrachtung von Bindungen, deren Energie nur wenig größer ist als die thermische Energie kT . Dazu gehören van-der-Waals-Bindungen, welche durch Ladungsfluktuationen in den Elektronenhüllen polare Bindungen erzeugen oder Wasserstoffbrückenbindungen wie sie in Watson-Crick-Basenpaarungen zu finden sind. Die vielen Freiheitsgrade einer Polymerkette können innerhalb der Konfigurationsentropie zusammengefasst werden. Sie ist selbst für kleine RNS-Moleküle eine hochdimensionale Funktion und wird als Energielandschaft bezeichnet [85, 86].

Komplexe RNS-Moleküle können im thermischen Gleichgewicht zwischen vielen unterschiedlichen Strukturen fluktuieren. Durch die Messung der Übergänge zwischen den Zuständen lassen sich die Eigenschaften der Energielandschaft von Molekülen untersuchen [87]. Im einfachsten Fall betrachtet man zwei Zustände A und B , zwischen denen ein Molekül fluktuiert:



Die relativen Anteile der gemessenen Zustände von A und B sind N_A und N_B . Dabei gilt

$$N_A + N_B = 1. \quad (2.3)$$

Die Übergänge zwischen den Zuständen werden durch die Ratenkoeffizienten k_{AB} und k_{BA} charakterisiert. Die Energiedifferenz der beiden Zustandsenergieniveaus ist durch die Differenz der freien Enthalpie $\Delta G = \Delta E_{AB} = E_A - E_B$ bestimmt. Im Gleichgewicht der beiden Zustände gilt

$$N_A \cdot k_{AB} = N_B \cdot k_{BA}. \quad (2.4)$$

Durch Umstellen erhält man den Gleichgewichtskoeffizient K , mit

$$\frac{k_{AB}}{k_{BA}} = \frac{N_B}{N_A} \equiv K. \quad (2.5)$$

Die Besetzungswahrscheinlichkeit eines Faltungszustands N_i ist durch die Boltzmann-Verteilung gegeben:

$$N_i = \frac{1}{Z} e^{-\frac{1}{kT} E_i}. \quad (2.6)$$

Dabei geht mit E_i die Energie des i -ten Zustands, mit T die Temperatur und mit k die Boltzmann-Konstante in die **Gl. 2.6** ein. Die Boltzmann-Verteilung wird durch die kanonische Zustandssumme normiert. Die kanonische Zustandssumme summiert dabei über alle möglichen Mikrozustände, welche zu einem makroskopischen Ensemble beitragen. Somit kann K mit **Gl. 2.6** geschrieben werden als

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{kT}}. \quad (2.7)$$

2.2.4 Strukturelle Modelle zur Abschätzung von Molekülstrukturen

Die ideale Kette

Das einfachste Modell, mit welchem sich ein Polymer, bestehend aus einer Anzahl von n Monomeren mit einer Bindungslänge l , beschreiben lässt, ist die ideale Kette. Dabei werden anziehende und abstoßende Wechselwirkungen der einzelnen Kettenglieder untereinander vernachlässigt. Summiert man nun über die Anzahl von n Gliedern der Länge l auf, erhält man eine charakteristische Länge des Polymers – die Konturlänge l_c [88]:

$$l_c = \sum_{i=1}^n l_i = nl. \quad (2.8)$$

Die frei bewegliche Kette

Nimmt man nun weiterhin an, dass die Bindungen der Monomere mit gleicher Wahrscheinlichkeit alle möglichen Bindungswinkel θ und Rotationswinkel ϕ zueinander annehmen können, $0 \leq \theta \leq \pi, 0 \leq \phi \leq 2\pi$, sind alle benachbarten Bindungen in ihrer Ausrichtung unabhängig voneinander [89] (siehe **Abb. 2.2.6**). Somit bekommt man für den mittleren quadratischen Abstandsvektor beider Polymer-Enden, $\langle r^2 \rangle_0$,

$$\langle r^2 \rangle_0 = \left\langle \left(\sum_{i=1}^n \vec{l}_i \right) \cdot \left(\sum_{j=1}^n \vec{l}_j \right) \right\rangle_0 = nl^2. \quad (2.9)$$

Dabei gilt für Zufallsbewegungen der frei beweglichen Kette, dass

$$\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle = 0 \forall i \neq j. \quad (2.10)$$

Diese frei bewegliche Kette besitzt für die Abstandsverteilung der Endpunktvektoren eine exakte analytische Lösung, mit dem Ansatz der Wahrscheinlichkeit, dass eine Polymerkette mit n Gliedern einen Abstandsvektor \vec{r} besitzt.

$$P(\vec{r}, n) = \int d\vec{l}_1 \dots d\vec{l}_n \delta \left[\left(\sum_{i=1}^n \vec{l}_i \right) - \vec{r} \right] \prod_{j=1}^n e^{-\frac{U(\vec{l}_j)}{kT}}, \quad (2.11)$$

wobei k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und $U(\vec{l}_j)$ die potentielle Energie zweier Glieder an der j -ten Bindungsstelle der Bindung \vec{l}_j sind. Geht die Anzahl der Glieder $n \rightarrow \infty$, nähert sich diese Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Gauß-Funktion an:

$$P(\vec{r}, n) = \left(\frac{3}{2\pi nl^2} \right)^{\frac{3}{2}} e^{-\frac{3r^2}{2nl^2}}. \quad (2.12)$$

Integriert man nun das Abstandsquadrat $\langle r^2 \rangle_0$ der Endpunkte wiederum für $n \rightarrow \infty$, ergibt sich

$$\langle r^2 \rangle_0 = \int_0^\infty P(r,n) r^2 dr = nl^2. \quad (2.13)$$

Daher nennt man die frei bewegliche Kette auch Gauß-Kette.

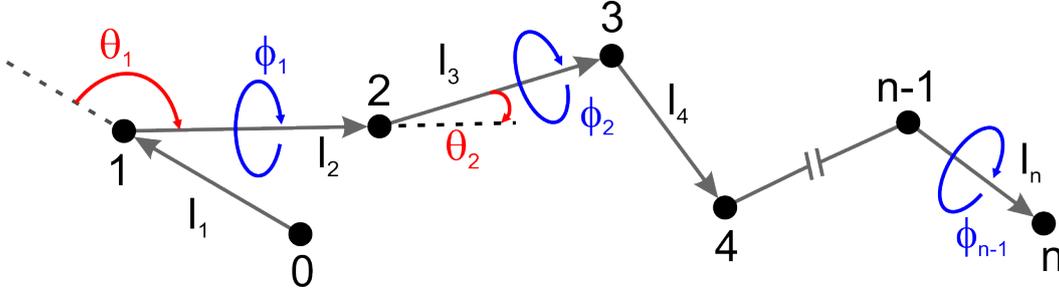


Abbildung 2.2.6: Modell einer Polymerkette. Modell einer Kette mit n Bindungen mit Bindungslängen von l_1 bis l_n , Bindungswinkeln $\theta_{1\dots n-1}$ und Rotationswinkeln $\phi_{1\dots n}$. Nach [89].

Frei rotierende Kette

Schränkt man die Beweglichkeit der frei beweglichen Kette ein, indem man alle Bindungswinkel fest und gleich hält, so bekommt man das Modell der frei rotierenden Kette [89]. Dabei bleiben die Bindungslängen gleich. Daraus ergibt sich

$$\langle \vec{l}_{i+1} \vec{l}_j \rangle = l^2 \cos \theta. \quad (2.14)$$

Weiterhin folgt, dass sich der mittlere quadratische Abstand zwischen den Bindungen i und $k+i$ zu

$$\langle \vec{l}_{i+k} \vec{l}_i \rangle = l^2 (\cos \theta)^k \quad (2.15)$$

ergibt. Für den mittleren quadratischen Abstandsvektor zwischen beiden Enden der frei rotierenden Kette gilt

$$\langle r^2 \rangle = \sum_{i=1}^n \langle \vec{l}_i \rangle^2 + 2 \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^{n-i} \langle \vec{l}_i \vec{l}_{i+k} \rangle \quad (2.16)$$

und

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 \left[\frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} - \frac{2 \cos \theta (1 - (\cos \theta)^n)}{n (1 - \cos \theta)^2} \right]. \quad (2.17)$$

Bei einer unendlich langen Kette kann man den zweiten Term vernachlässigen [89].

Wurmartige Kette

Projiziert man den Abstandsvektor \vec{r} auf die Richtung des ersten Bindungsvektors \vec{l}_1 , so bekommt man im Falle der frei rotierenden Kette [89]:

$$\left\langle \frac{\vec{r} \cdot \vec{l}_1}{l} \right\rangle = \frac{1}{l} \sum_{i=1}^n \langle \vec{l}_1 \cdot \vec{l}_i \rangle = l \sum_{i=0}^n -1 (\cos\theta)^i = l \frac{1 - (\cos\theta)^{n+1}}{1 - \cos\theta}. \quad (2.18)$$

Betrachtet man den Fall $n \rightarrow \infty$ konvergiert letztere Gleichung zu

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \left\langle \frac{\vec{r} \cdot \vec{l}_1}{l} \right\rangle = \frac{1}{1 - \cos\theta} \equiv l_p. \quad (2.19)$$

Mit der Größe l_p findet man die sogenannte Persistenzlänge, welche ein Maß für die Steifigkeit der Polymerkette ist. Sie ist somit definiert als Summe aller Projektionen der Bindungsvektoren aller Konformationen auf den ersten Vektor \vec{l}_1 :

$$\left\langle \frac{\vec{r} \cdot \vec{l}_1}{l} \right\rangle = l_p \left(1 - e^{-\frac{l_c}{l_p}} \right). \quad (2.20)$$

Für steife Ketten wird nun das Modell der sogenannten wurmartigen Kette benutzt. Dabei werden die Bindungswinkel relativ klein und die Anzahl der Kettenglieder groß. Die Persistenzlänge l_p und die Konturlänge $l_c = nl$ werden konstant gehalten. In dieser Näherung bekommt man als Projektion:

$$\frac{\langle r^2 \rangle_0}{l_c} = 2l_p \left[1 - \frac{l_p}{l_c} \left(1 - e^{-\frac{l_c}{l_p}} \right) \right]. \quad (2.21)$$

Geht man nun noch davon aus, dass die Konturlänge viel größer ist als die Persistenzlänge, wird der Effekt der Kettensteifigkeit vernachlässigbar klein [89]. Damit ergibt sich dann

$$\frac{\langle r^2 \rangle_0}{l_c} = 2l_p. \quad (2.22)$$

Durch Einsetzen von **Gl. 2.8** in **Gl. 2.22** kann die mittlere RNS-Kettenlänge $r_c(n)$ von einzelstrangigen Sequenzen, bestehend aus einer Anzahl von n Nukleotiden, berechnet werden:

$$r_c(n) = \sqrt{2l_p l_c} = \sqrt{2l_p n l}. \quad (2.23)$$

Helixmodelle

Weitaus komplexer wird die Abschätzung von Abständen innerhalb der RNS-Struktur im Fall einer Helix-Bildung. Hierzu greift man auf die gemessenen Kristallstrukturen von RNS-Molekülen zurück. Aus diesen gemessenen Strukturen entwickelten Watson und Crick ein allgemeines Helixmodell für DNS-Moleküle und leiteten Folgendes ab:

- Zwei antiparallele helikale Einzelstränge winden sich rechtshändig umeinander.
- Das Rückgrat liegt an der Außenseite und die Basen an der Innenseite der Helix.

- Die Basen sind annähernd senkrecht zur Helixachse ausgerichtet.

Ihr Modell entspricht heutzutage der B-DNS Helix. Wie in **Kapitel 2.1** bereits dargelegt, konnten drei verschiedene Helixarten entdeckt werden: A-, B- und Z-DNS. Diese drei Arten unterscheiden sich dadurch, dass sich die beiden komplementären Einzelstränge entweder rechtshändig (A-DNS und B-DNS) oder linkshändig (Z-DNS) gegeneinander aufwinden. A- und B-DNS unterscheiden sich letztlich in der jeweils unterschiedliche Anordnung des C-3'-Atoms und des C-2'-Atomes der Ribose bzw. der Desoxyribose. Die Z-DNS besitzt zudem im „zick-zack“ ausgerichtete Phosphatgruppen (Z-förmig). RNS-Helices entsprechen am ehesten der A-DNS Struktur, welche deshalb hier näher betrachtet wird. Um die Größen einer Helixstruktur zu definieren, benötigt man die Anzahl der Nukleotide eines Einzelstrangs n , um zusammen mit dem Steigungswinkel θ_{ilt} die Steigung zwischen zwei Nukleotiden d_{pb} zu berechnen [90]. Weiterhin unterscheiden sich die Modelle in ihrem Helixdurchmesser D_{DNS} und im Öffnungswinkel zweier aufeinander folgender Nukleotide θ_{pb} . Zur Berechnung der Längen der RNS-Helices setzt man ein A-Helixmodell der DNS an, dessen Größen in **Tab. 2.1** aufgelistet sind. Daraus kann der Abstand zwischen zwei beliebigen Basenpaaren $r_{hs}(n)$, die sich auf demselben Helixstrang befinden, berechnet werden zu

$$r_{hs}(n) = \sqrt{(nd_{pb})^2 + \left(D_{DNS} \sin\left(\frac{n\theta_{pb}}{2}\right)\right)^2}. \quad (2.24)$$

Für Nukleotide, welche sich auf gegenüberliegenden RNS-Strängen befinden, gilt folgende Abstandsberechnung:

$$r_{hc}(n) = \sqrt{(nd_{pb})^2 + (D_{DNS} \sin(\theta_{ilt}))^2 + \left(D_{DNS} \sin\left(\frac{n\theta_{pb} + \pi}{2}\right)\right)^2}. \quad (2.25)$$

Dabei entspricht der zweite Teilterm dem Neigungswinkel mit $\theta_{ilt} = 19^\circ$. Die Winkel und Abstände sind zum besseren Verständnis in **Abb. 2.2.7** skizziert.

Tabelle 2.1: Charakteristische Werte der A-DNS [12].

A-DNS			
Größe	Symbol	Wert	
Steigungswinkel	θ_{ilt}	19°	
Helixdurchmesser	D_{DNS}	25,5 Å	
Basenpaare pro Drehung	n	11	
Öffnungswinkel	θ_{pb}	32,7°	
Steigung pro Base	d_{pb}	2,3 Å	

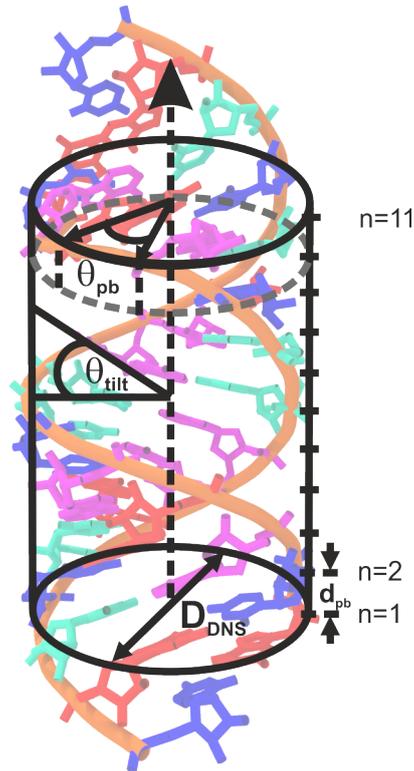


Abbildung 2.2.7: Schematische Darstellung eines DNS-Doppelstrangs und seiner Größen. Zwölf Watson-Crick-Basenpaare bilden eine DNS-Doppelhelix mit den Nukleotiden C (blau), G (rot), A (magenta), T (grün) und das Rückgrat (orange-farbene Struktur). Der schwarze Zylinder stellt eine vereinfachte Darstellung der Helix dar mit den Größen für den Winkel zwischen zwei benachbarten Basenpaaren θ_{pb} , dem effektiven Abstand zweier Basenpaare d_{pb} , der Anzahl der Nukleotide n und dem Helixdurchmesser D_{DNS} .

2.3 Absorption und Emission elektromagnetischer Strahlung durch Materie

Setzt man ein atomares Elektron mit der Ladung $q = -e$ einem klassischen Strahlungsfeld $\vec{A}(\vec{r}, t)$ aus, so lautet der Hamiltonoperator \hat{H} für das Gesamtsystem [91–93]:

$$\hat{H} = \frac{1}{2m_0} \left(\hat{P} - e\vec{A}(\vec{r}, t) \right)^2 + \frac{e}{m_0} \vec{S} \cdot \vec{B}(\vec{r}, t) + \hat{V}(\vec{r}). \quad (2.26)$$

Dabei steht m_0 für die effektive Masse des Elektrons, \vec{S} für den Spin des Elektrons und $\vec{B}(\vec{r}, t)$ für das Magnetfeld. Mit \hat{P} findet man den Impulsoperator und mit $\hat{V}(\vec{r})$ den Operator der potentiellen Energie. Durch die Wahl der Coulombbeziehung $\text{div}\vec{A}(\vec{r}, t) = 0$

kommutieren \hat{P} und $\vec{A}(\vec{r}, t)$. Somit erhalten wir die Gleichung:

$$\hat{H} = \underbrace{\frac{1}{2m_0}\hat{P}^2 + \hat{V}(\vec{r})}_{\hat{H}_0} - \underbrace{\frac{e}{m_0}\vec{A}(\vec{r}, t) \cdot \hat{P}}_{\hat{H}_1} + \underbrace{\frac{e^2}{2m_0}\vec{A}(\vec{r}, t)^2}_{\hat{H}_2} - \underbrace{\frac{e}{m_0}\vec{S} \cdot \vec{B}(\vec{r}, t)}_{\hat{H}_3}. \quad (2.27)$$

Die ersten beiden Terme aus **Gl. 2.27** ergeben den Hamiltonoperator des ungestörten Systems \hat{H}_0 mit der kinetischen und der potentiellen Energie. Für den Fall, dass die Intensität der Strahlung nicht zu groß ist, kann der quadratische Term des Vektorfeldes in \hat{H}_2 vernachlässigt werden. Der Beitrag der Spin-Bahnkopplung des Elektrons mit sich selbst aus \hat{H}_3 muss nicht berücksichtigt werden, wenn die Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung größer ist als das betrachtete Molekül, also das Feld am Ort des Moleküls als konstant angesehen werden kann. Mit einem stark vereinfachten Ansatz reduziert sich der Störoperator auf \hat{H}_1 . Setzt man das Vektorfeld $\vec{A}(\vec{r}, t)$ als monochromatisches Feld einer ebenen Welle abhängig vom Ortsvektor \vec{r} und der Zeit t an, so bekommt man:

$$\vec{A} = A_0 \vec{\epsilon} \left[e^{i\frac{\omega}{c}\vec{n} \cdot \vec{x} - i\omega t} + e^{-i\frac{\omega}{c}\vec{n} \cdot \vec{x} + i\omega t} \right]. \quad (2.28)$$

Die Kreisfrequenz, die Polarisation sowie die Ausbreitungsrichtung der Welle gehen jeweils durch ω , $\vec{\epsilon}$ und \vec{n} ein. Dabei beschreibt in **Gl. 2.28** der $e^{+i\omega t}$ -Term den Beitrag der stimulierten Emission, wobei der $e^{-i\omega t}$ -Term für die Absorption verantwortlich ist. Für das Thema dieser Arbeit ist nur der Absorptionsterm wichtig, weswegen weiterhin nur dieser Term weiter verfolgt wird (\hat{H}_1). Die Wirkung von \hat{H} auf eine Wellenfunktion $\Psi(t)$ ist

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\Psi(t)\rangle = (\hat{H}_0 + \hat{H}_1(t)) |\Psi(t)\rangle, \quad (2.29)$$

und kann mit Hilfe der zeitabhängigen Störungstheorie weiter untersucht werden. \hbar entspricht dem Planckschem Wirkungsquantum.

2.3.1 Franck-Condon-Prinzip

Um eine vollständige Beschreibung der Wellenfunktion eines Moleküls zu erhalten, müssen auch die Kerne einbezogen werden [91, 94–96]. Die gesamte molekulare Wellenfunktion kann mit der elektronischen Wellenfunktion $\psi_i(r, R)$, in Abhängigkeit von den Elektronenkoordinaten \vec{r} sowie der Kernkoordinate \vec{R} und der Kernwellenfunktion $\chi_{n(i)}(\vec{R})$ für jedes i -te Elektron als Linearkombination der Produkte der Partialwellenfunktionen geschrieben werden als

$$\psi(\vec{r}, \vec{R}) = \sum_i \sum_n \psi_i(\vec{r}, \vec{R}) \chi_{n(i)}(\vec{R}). \quad (2.30)$$

Wegen des großen Massenunterschieds zwischen den Elektronen und den Kernen ist die Trägheit der Kerne viel größer als die der Elektronen. Daher findet die Bewegung der Elektronen auf viel kleineren Zeitskalen statt als die Bewegung der Kerne. Deshalb kann

man in erster Näherung die Elektron- und die Kernbewegung getrennt voneinander betrachten. Somit vereinfacht sich **Gl. 2.30** zu einem einfachen Produkt der elektronischen und nuklearen Wellenfunktion:

$$\psi(\vec{r}, \vec{R}) \approx \psi_i(\vec{r}, \vec{R}) \chi_{n(i)}(\vec{R}). \quad (2.31)$$

Diese Vereinfachung ist bekannt als die Born-Oppenheimer-Näherung. Aus **Gl. 2.31** kann man als Kombination aus Schwingungswellenfunktion der Kerne und elektronischen Wellenfunktionen sogenannte vibronische Zustände definieren. Übergänge zwischen einem niedrigeren vibronischen Zustand $\psi_{a,n} = \psi_a(r, R) \chi_n(R)$ und einem höheren vibronischen Zustand $\psi_{b,m} = \psi_b(r, R) \chi_m(R)$ können durch Anregung der elektronischen Wellenfunktionen ($\psi_a \rightarrow \psi_b$) oder durch Anregung der Schwingungswellenfunktionen ($\chi_n \rightarrow \chi_m$) verursacht werden (siehe **Abb. 2.3.1**).

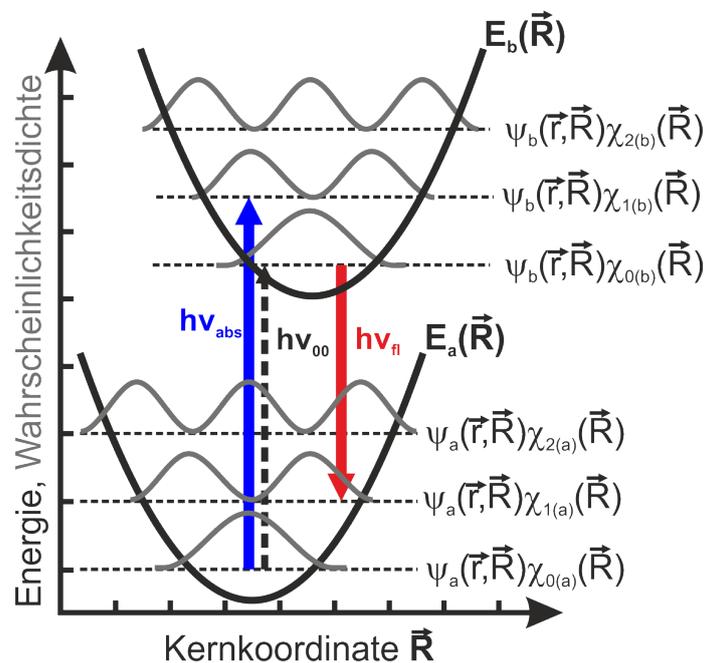


Abbildung 2.3.1: Absorption und Fluoreszenz nach dem Franck-Condon-Prinzip. Aufgetragen sind die potentiellen Energien (schwarze Parabeln) eines Grundzustandes $E_a(\vec{R})$ und eines angeregten Zustandes $E_b(\vec{R})$ mit den Eigenniveaus der vibronischen Wellenfunktionen $\psi_i(\vec{r}, \vec{R}) \chi_{n(i)}(\vec{R})$ (schwarze gestrichelte Linien) über der Kernkoordinate \vec{R} . Die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitsdichten des Elektrons sind als graue Linien skizziert. Gemäß des Franck-Condon-Faktors ist bei Absorption (Pfeile in schwarzgestrichelt und blau mit ihrer Energie $h\nu_{00}$, $h\nu_{abs}$) ein Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand in einen Schwingungszustand eines höheren elektronischen Zustandes besonders wahrscheinlich (Dicke der Pfeile), wenn die Maxima ihrer Wellenfunktionen senkrecht übereinander liegen. Gleiches gilt im Fall von Emission (roter Pfeil mit der Energie $h\nu_{fl}$), jedoch geschieht dies meist aus dem Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustandes. Durch Molekülstöße relaxiert das Elektron aus höheren Schwingungszuständen in den Grundzustand. Nach [91].

Um solche molekularen Übergänge zu analysieren, stellt sich der molekulare Dipoloperator dar als

$$\hat{\mu} = \hat{\mu}_{el} + \hat{\mu}_{nuc}, \quad (2.32)$$

mit $\hat{\mu}_{el}$ als Dipoloperator des Elektrons und $\hat{\mu}_{nuc}$ als dem des Kerns. Das gesamte Übergangsdipolmoment zwischen den beiden Molekülorbitalen $\psi_{a,n}$ und $\psi_{b,m}$ ist:

$$\begin{aligned} \mu_{ba,mn} = & \langle \chi_m(R) | \chi_n(R) \rangle \langle \psi_b(r,R) | \hat{\mu}_{el} | \psi_a(r,R) \rangle + \\ & \underbrace{\langle \psi_b(r,R) | \psi_a(r,R) \rangle}_{=0} \langle \chi_m(R) | \hat{\mu}_{nuc} | \chi_n(R) \rangle. \end{aligned} \quad (2.33)$$

Damit lässt sich nun ein Übergangsdipolmoment formulieren zu:

$$\mu_{ba,mn} = \langle \chi_m(R) | \chi_n(R) \rangle \bar{U}_{ba}. \quad (2.34)$$

Dabei ist \bar{U}_{ba} das gemittelte elektronische Dipolmoment über alle \vec{U}_{ba} bezüglich der Kernkoordinate \vec{R} , beginnend mit den Anfangs- bis zu den Endschwingungszuständen. Diese Näherung, bei der das vollständige Übergangsdipolmoment ein Produkt aus dem Überlappintegral $\langle \chi_m(R) | \chi_n(R) \rangle$ und dem elektronischen Übergangsdipol $\vec{\mu}_{ba}$ ist, entspricht der Condon-Näherung. Der Beitrag bei Übergängen zwischen zwei vibronischen Zuständen zur Stärke der Dipolkopplung ist abhängig von $|\vec{\mu}_{ba,mn}|^2$ und damit abhängig vom Betragsquadrat des nuklearen Überlappintegrals $|\langle \chi_m(R) | \chi_n(R) \rangle|^2$. Das Betragsquadrat dieses Integrals ist als Franck-Condon-Faktor bekannt.

2.3.2 Fluoreszenz

Die bislang behandelten semiklassischen Betrachtungen sind nur gültig, um Absorption und stimulierte Emission zu beschreiben [94]. Der Effekt der spontanen Emission, die Fluoreszenz, bei welcher ein Atom oder ein Molekül aus einem angeregten Zustand durch die Emission eines Photons in den Grundzustand übergeht, kann dadurch nicht erklärt werden. Um eine korrekte Beschreibung der spontanen Emission zu gewährleisten, muss das Vektorpotential aus **Gl. 2.28** quantisiert werden. Dabei werden die zeitabhängigen Amplituden $A_0 e^{-i\omega t}$ und $A_0 e^{+i\omega t}$ durch Vernichtungs- und Erzeugungsoperatoren von Lichtquanten \hat{a}_j und \hat{a}_j^\dagger ersetzt:

$$\hat{A} = \sum_j \sqrt{\frac{\hbar}{2\epsilon_0 V \omega_j}} \vec{\epsilon}_j \left[\hat{a}_j e^{i\frac{\omega_j}{c} \vec{n} \cdot \vec{x}} + \hat{a}_j^\dagger e^{-i\frac{\omega_j}{c} \vec{n} \cdot \vec{x}} \right]. \quad (2.35)$$

Dabei beschreibt ω_j die Kreisfrequenz der Lichtwelle, V das Normierungsvolumen, in welchem sich die Lichtwelle ausbreitet (wobei periodische Randbedingungen vorausgesetzt werden) und ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante. Somit hat das Strahlungsfeld selbst in Abwesenheit von Photonen einen Eigenzustand und eine Grundzustandsenergie. Daher kann die spontane Emission als Störung des angeregten Zustandes durch das Nullpunktstrahlungsfeld gesehen werden. Besitzt das Elektron anfänglich die Wellenfunktion Ψ_a

2 Theoretische Grundlagen

und das Strahlungsfeld die Wellenfunktion ϑ_n , so ist die Gesamtwellenfunktion das Produkt der beiden mit $\Theta_{a,n} = \Psi_a \vartheta_n$. Der Übergang zum Zustand $\Theta_{b,m} = \Psi_b \vartheta_m$ wird durch den Störoperator \hat{H}_I erzeugt. Die Indizes des Strahlungsfeldes n und m sind äquivalent zur Anzahl der Photonen der j -ten Mode. Hierfür wird der Operator \hat{A} in **Gl. 2.27** eingesetzt. Die Wirkung des Störoperators ist dann wie folgt:

$$\langle \Psi_b \vartheta_m | \hat{H}^S | \Psi_a \vartheta_n \rangle = \frac{e}{m_e} \sqrt{\frac{\hbar}{2\varepsilon_0 V \omega_j}} \vec{\varepsilon}_j \langle \Psi_b | \hat{\nabla} | \Psi_a \rangle \langle \vartheta_m | \hat{a}_j + \hat{a}_j^\dagger | \vartheta_n \rangle. \quad (2.36)$$

Aus dem ersten Teil der **Gl. 2.36** $\vec{\varepsilon}_j \langle \Psi_b | \hat{\nabla} | \Psi_a \rangle$ erkennt man, dass in Übereinstimmung mit der semiklassischen Behandlung von Absorption und Emission nur Übergänge zwischen den Zuständen Ψ_a und Ψ_b parallel zur Polarisationsrichtung $\vec{\varepsilon}_j$ erlaubt sind. Letztlich muss noch der zweite Term $\langle \vartheta_m | \hat{a}_j + \hat{a}_j^\dagger | \vartheta_n \rangle$ bestimmt werden. Durch das Einsetzen von Hermite-Polynomen kann die Lösung bestimmt werden zu

$$|\langle \vartheta_m | \hat{a}_j + \hat{a}_j^\dagger | \vartheta_n \rangle| = \sqrt{\frac{\hbar}{2\omega_j}} \left(\sqrt{n} \delta_{m,n-1} + \sqrt{n+1} \delta_{m,n+1} \right). \quad (2.37)$$

Mit dem Kronecker-Delta $\delta_{i,l}$ bekommt man nur Beiträge, wenn $i = l$. Im ersten Term der Gleichung verringert sich die Anzahl der Photonen von n auf $n - 1$, dies beschreibt die Absorption. Der zweite Term beschreibt die Emission. Diese setzt sich zusammen aus einer intensitätsabhängigen (abhängig von der Anzahl der Photonen \sqrt{n}) und einer intensitätsunabhängigen Komponente. Erstere ist als stimulierte Emission bekannt, letztere als spontane Emission.

2.3.3 Stokes-Verschiebung

Das Fluoreszenzspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum zu niedrigeren Energien verschoben und wurde erstmals von George Stokes beschrieben Stokes 1852. Dies wird daher Stokes-Verschiebung genannt und fasst alle Beiträge der Rotverschiebung zusammen. Dazu gehören die Relaxationen innerhalb der vibronischen Zustände jeweils im angeregten Schwingungszustand nach Absorption und im Schwingungsgrundzustand nach Emission. Hauptsächlich tragen Lösungsmittelleffekte dazu bei, dass das Intensitätsmaximum des Emissionsspektrums zu dem des Absorptionsspektrums zu längeren Wellenlängen hin verschoben ist. Dieser Effekt nimmt mit der Polarität der Lösungsmittelmoleküle zu. Wie in **Abb. 2.3.2** zu sehen ist, sind im Grundzustand S_0 eines Fluorophors die Lösungsmittelmoleküle so um das Fluorophor angeordnet, dass die Energie des Gesamtsystems minimiert ist. Wird ein fluoreszentes Molekül in einen angeregten Zustand gebracht, zum Beispiel S_1 , so ändert sich sein Dipolmoment. Die polaren Lösungsmittelmoleküle richten sich dann nach der neuen Verteilung aus, stabilisieren den angeregten Zustand und minimieren so die Energie des Fluorophor-Lösungsmittelmolekül-Gesamtsystems zu S_1^* . Geht das fluoreszente Molekül durch die Emission eines Photons zurück in seinen Grundzustand, so befindet sich das Gesamtsystem durch die noch ausgerichteten Lösungsmit-

telmoleküle weiterhin in einem angeregten Zustand S_0^* , da die Lösungsmittelmoleküle noch immer ausgerichtet sind. Durch erneute Ausrichtung der Lösungsmittelmoleküle wird die Energie des Gesamtsystems wieder minimiert und in seinen Ausgangszustand S_0 versetzt.

2.3.4 Fluoreszenzquantenausbeute

Den Bruchteil aller angeregten Moleküle, welche durch Fluoreszenz in ihren Grundzustand zurückkehren, definiert man als Fluoreszenzausbeute ϕ . Im einfachsten Fall, in welchem Photonen nur aus dem niedrigsten vibronischen Zustand des angeregten Singulettzustandes emittiert werden, bestimmt sich ϕ wie folgt:

$$\phi = \frac{\text{emittierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}} = \frac{k_{fl}}{k_{total}}. \quad (2.38)$$

Dies ist gleichbedeutend damit, dass sich ϕ aus dem Verhältnis der Fluoreszenzzerfallsrate k_{fl} zur Gesamtzerfallsrate k_{total} bestimmt. k_{total} ist die Summe der Raten aller Abklingprozesse:

$$k_{total} = k_{fl} + k_{ISC} + k_{IC} + k_{RET} + \dots \quad (2.39)$$

Dabei findet man mit k_{ISC} , k_{IC} und k_{RET} jeweils die Zerfallsrate durch Interkombination, innere Konversion und Resonanzenergietransfer, die konkurrierende Übergänge zur Fluoreszenz.

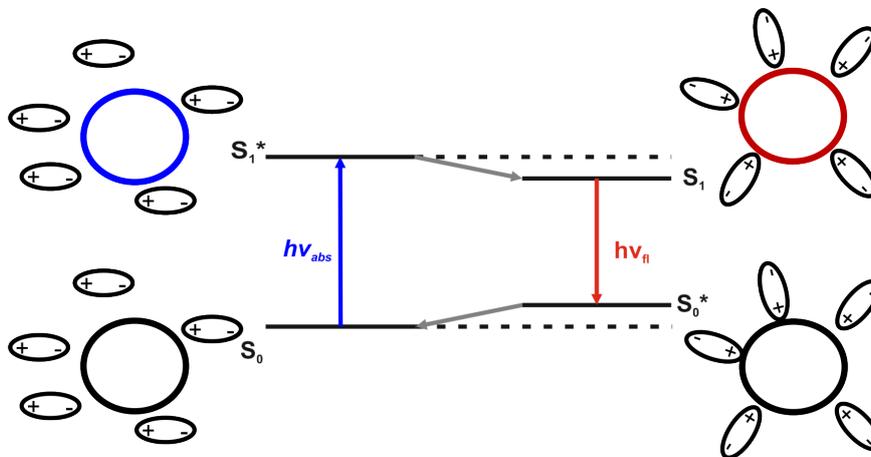


Abbildung 2.3.2: Lösungsmittelleffekt auf Fluorophore. Im Grundzustand S_0 befindet sich der Fluorophor (schwarzer Kreis) mit den polaren Lösungsmittelmolekülen (schwarze Ellipsen) im Gleichgewicht. Durch die Anregung mit der Energie $h\nu_{abs}$ (blauer Pfeil) in den „Franck-Condon-Zustand“ S_1^* (blauer Kreis) verändert sich das Dipolmoment des Fluorophors. Durch die schnelle Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle wird ein stabilisierter Zustand S_1 (roter Kreis), und damit energetisch günstigerer Zustand erzeugt. Durch spontane Emission der Energie $h\nu_{abs}$ (roter Pfeil) gelangt das System aus Fluorophor und Lösungsmittel in eine Art angeregten Grundzustand S_0^* , da sich die Lösungsmittelmoleküle noch nicht reorientiert haben. Nach [97].

2 Theoretische Grundlagen

reszenz sind. Wie in **Abb. 2.3.3** zu sehen, können alle An- und Abregungsprozesse mit einem Jablonski-Diagramm einfach dargestellt werden. Durch die Zerfallsraten lässt sich die Zeit bestimmen, in der das Elektron im angeregten Zustand verweilt. Diese nennt man Fluoreszenzlebensdauer τ ,

$$\tau = \frac{1}{k_{total}}. \quad (2.40)$$

Durch die Absorption eines Photons passender Energie gelangt ein Elektron aus seinem Grundzustand S_0 und dem niedrigsten vibronischen Zustand in einen angeregten Singulettzustand S_1 . Die Anregung in einen höheren vibronischen Zustand (1,2,...) ist abhängig vom Franck-Condon-Faktor (siehe **Gl. 2.3.1**). Absorption findet auf einer Zeitskala von 10^{-15} s statt. Durch interne Konversion (*engl. internal conversion, IC*) relaxieren die angeregten Elektronen im Bereich zwischen 10^{-14} – 10^{-11} s in den niedrigsten Zustand des S_1 -Niveaus. Die Energie wird dabei in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Von dort kann das Elektron durch Fluoreszenz in den Grundzustand übergehen. Typischerweise relaxiert das Elektron im Nanosekundenbereich zunächst in einen angeregten Schwingungszustand des elektronischen Zustands, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt [94, 97]. Absorption und Fluoreszenz sind spinerhaltend. Konkurrierend zur

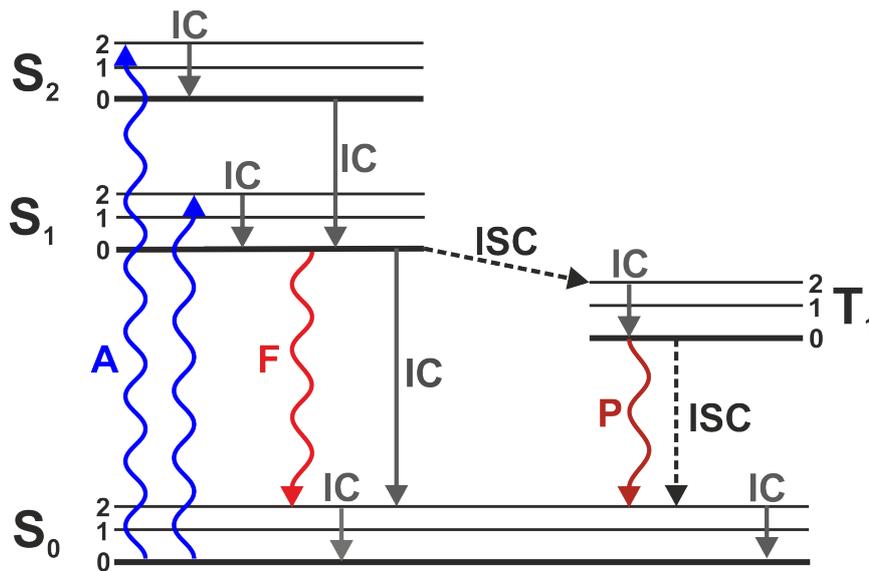


Abbildung 2.3.3: Jablonski-Diagramm. Das Jablonski-Diagramm liefert eine schematische Darstellung aller An- und Abregungspfade. Strahlende Übergänge zwischen Singulettzuständen, markiert mit S_0 , S_1 und S_2 , sowie zwischen dem Triplettzustand, markiert mit T_1 , werden mit gewellten Pfeilen dargestellt: in blau die Absorption eines Photons (A); in hellrot die Emission eines Photons durch Fluoreszenz (F); in dunkelrot die Emission eines Photons durch Phosphoreszenz (P). Um An- und Abregungsprozesse nach Franck-Condon in vibronische Zustände zu verdeutlichen, sind diese als zusätzliche Energieniveaus mit (0, 1, 2) dargestellt. Nichtstrahlende Übergänge sind durch geradlinige Pfeile dargestellt. Dazu gehören die interne Konversion (IC, hellgraue Pfeile) und die Interkombination (ISC, schwarzer gestrichelter Pfeil). Nach [94, 97].

Fluoreszenz, kann durch interne Konversion eine nichtstrahlende Abregung des Elektrons herbeigeführt werden. Ebenso kann ein Elektron durch Interkombination (*engl. intersystem crossing*, ISC) in den Triplettzustand T_1 gelangen. Hier ändern die Elektronen beim Übergang aus dem angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand ihren Spin, bevor sie unter einer weiteren Spinumkehr in den Grundzustand S_0 zurückfallen. Diesen Prozess nennt man Phosphoreszenz und findet auf Zeitskalen im Bereich von $10^{-3} - 10^{+2}$ s statt [94, 97].

2.3.5 Fluoreszenzbleichen und Quenchen

Da heutzutage sehr leistungsfähige Optiken und Sensoren hergestellt werden können, deren Transmission bzw. Quantenausbeute $> 95 \%$ erreichen, sind die Fluorophore die verbleibende Schwachstelle. Photophysikalische Eigenschaften, wie Fluoreszenzbleichen und Quenchen, beeinträchtigen die Emission von Photonen durch Fluoreszenz. Viele Experimente der Fluoreszenzspektroskopie sind jedoch oft auf eine langanhaltende und kontinuierliche Fluoreszenz der Fluorophore angewiesen [98, 99]. Man unterscheidet zwischen irreversiblen Prozessen, dem Bleichen, und reversiblen Prozessen, dem Quenchen. Das Fluoreszenzbleichen basiert auf photochemischen Reaktionen, bei welchen Fluorophore mit Sauerstoff zu einem nichtfluoreszenten Produkt reagieren, der Photo-Oxidation. Geht ein Fluorophor im elektronisch angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand über, so kann seine Energie und der Spin des Triplettzustandes auf ein O_2 -Molekül, dessen Grundzustand ein Triplettzustand ist, übertragen werden, sodass der Fluorophor in seinen Grundzustand zurückfällt. Das O_2 -Molekül geht dabei in seinen angeregten reaktiven Singulettzustand und kann somit wiederum mit dem Fluorophor in ein nichtfluoreszentes Produkt reagieren [100–103].

Beim Quenchen wird das Fluorophor durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen, den Quenchern, nichtstrahlend entweder in seinen Grundzustand oder in einen langlebigen Triplettzustand versetzt. Man unterscheidet dabei zwischen dynamischem und statischem Quenchen des Farbstoffmoleküls. Beim dynamischen Quenchen stößt der Quencher durch Diffusion mit dem Fluorophor innerhalb der Lebensdauer seines angeregten Zustands. Oft bilden beide einen Ladungsübertragungskomplex, der einen Elektronentransfer entweder vom angeregten Farbstoff zum Quencher oder umgekehrt ermöglicht. Im Fall von statischem Quenchen reagieren Fluorophor und Quencher zu einem nichtfluoreszenten Komplex.

Um die Häufigkeit des Bleichens und Quenchens zu reduzieren, gibt es verschiedene Lösungsansätze. Sauerstoff kann in seiner reaktiven Zustandsform als Singulett den Farbstoff bleichen. Deswegen wird dieser aus der Umgebung des Farbstoffes entfernt. Dies kann durch verschiedene chemische Reaktionen erreicht werden, wie zum Beispiel durch den Einsatz enzymatischer sauerstoffzehrender Reaktionen [104–107].

Weitere Strategien sind zum einen, den gelösten Sauerstoff durch Stickstoff zu verdrängen [108], oder zum anderen, die Probe während der Messung in ein Argonbad zu legen [109]. Jedoch fehlt dann Sauerstoff als Triplett-Quencher. Wegen der langen Phosphoreszenzlebensdauer gilt der Triplettzustand eines Fluorophors photochemisch als aktivster Zustand. Daher müssen zusätzliche Chemikalien eingesetzt werden, welche die

Fluorophore aus dem Triplettzustand wieder in den Singulettgrundzustand S_0 überführen [98, 110]. Mit Hilfe eines reduzierenden und oxidierenden Systems (ROXS) kann der Triplettzustand T_1 via Elektronentransfer entweder durch Reduktion in einen anionischen F^{*-} -Zustand oder via Oxidation in einen kationischen F^{*+} -Zustand überführt werden. Diese ionischen Zustände des Fluorophors werden darauf jeweils durch Oxidation von F^{*-} bzw. Reduktion von F^{*+} wieder in den Singulettgrundzustand versetzt. Voraussetzung für den Erfolg dieser Methode eines ROX-Systems ist es, eine hohe Oxidations- und Reduktionsrate, $k_{Ox(*)}$ und $k_{Red(*)}$, zu erzeugen, welche die Raten der Bleichprozesse k_B^{Ox} und k_B^{Red} in den Zustand B dominieren (Abb. 2.3.4). Die am häufigsten benutzten ROX-Systeme sind Ascorbinsäure mit Methylviologen [98], Trolox [111], β -Mercaptoethanol [112] oder eine Mischung aus Cyclooctatetraen, Nitrobenzylalkohol und Trolox [99].

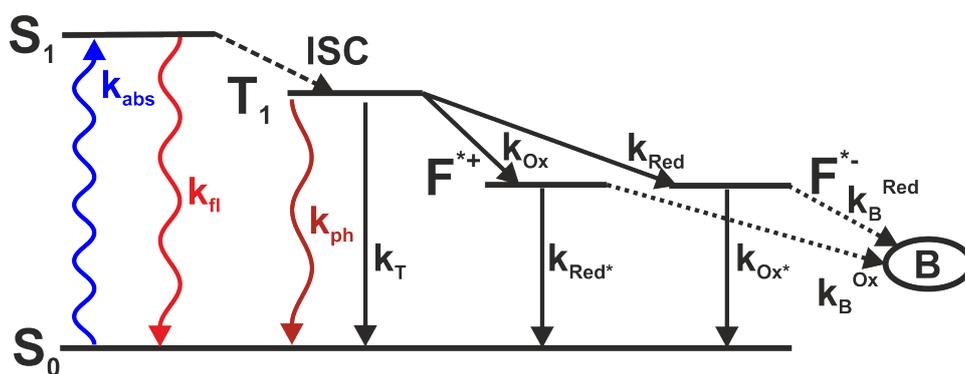


Abbildung 2.3.4: Reduktions- und Oxidationsmechanismen zur Rückführung in den Grundzustand. Durch Absorption von Licht wird ein Farbstoff aus seinem Singulettgrundzustand S_0 mit einer Rate k_{abs} in seinen elektronisch angeregten Zustand S_1 angeregt. Mit der Rate k_{fl} kehrt der Farbstoff entweder durch Fluoreszenz zurück in seinen Grundzustand, oder geht durch Interkombination (ISC) in seinen Triplettzustand T_1 über. Die Abregung von T_1 in S_0 erfolgt durch Phosphoreszenz (mit der Rate k_{ph}) oder ISC (mit der Rate k_T). Dies kann auch durch Triplettquenchen mit Hilfe ROXS erfolgen. Dabei wird durch Reduktion (mit der Rate k_{Red}) und Oxidation (mit der Rate k_{Ox}) jeweils der anionische F^{*-} - bzw. der kationische F^{*+} -Zustand erzeugt. Durch darauffolgende Oxidation oder Reduktion mit den Raten k_{Ox^*} und k_{Red^*} kann wiederum der Grundzustand erreicht werden. Diese Effekte müssen mit der Bleichreaktion in den Zustand B konkurrieren, sodass die Raten zu B , k_B^{Red} und k_B^{Ox} , nicht überwiegen. Nach [99, 110, 113].

2.4 Försterresonanzenergietransfer (FRET)

FRET wurde von Förster 1946 [114] erstmals vorgeschlagen und beschreibt den strahlungslosen Energieübertrag von einem Fluorophor, dem Donor (D), auf ein anderes Fluorophor, den Akzeptor (A) [97, 115]. Dieser nichtstrahlende Prozess lässt sich über die Kopplung der Wechselwirkungsdipolmomente des Donor- und des Akzeptormoleküls

quantenmechanisch erklären [116]. Unter der Annahme, dass Donor und Akzeptor miteinander wechselwirken können, um untereinander Energie auszutauschen, ergibt sich der Hamiltonoperator des Gesamtsystems als

$$\hat{H} = \hat{H}_D + \hat{H}_A + \hat{H}_{AD}. \quad (2.41)$$

Während jeweils \hat{H}_D nur auf Donorwellenfunktionen und \hat{H}_A nur auf Akzeptorwellenfunktionen wirkt, erlaubt \hat{H}_{AD} die Wechselwirkung zwischen beiden Molekülen. Die Wellenfunktionen im Grundzustand (angeregten Zustand) sind $\phi_{D1}\chi_{D1}$ ($\phi_{D2}\chi_{D2}$) für den Donor und $\phi_{A1}\chi_{A1}$ ($\phi_{A2}\chi_{A2}$) für den Akzeptor. Für eine vollständige Betrachtung müssen jeweils die Elemente der Übergangsmatrix, also sowohl die Anfangs- und Endzustände (mit Index $n = \{1, 2\}$) der Kernwellenfunktionen χ_{Dn} (χ_{An}) als auch der elektronischen Wellenfunktionen ϕ_{Dn} (ϕ_{An}) für den Donor (Akzeptor) enthalten sein. Setzt man wieder die Born-Oppenheimer-Näherung an, bekommt man für die Übergangsmatrixelemente:

$$H_{AD} = \underbrace{\langle \phi_{D1}\phi_{A2} | \hat{H}_{AD} | \phi_{D2}\phi_{A1} \rangle}_{H_{AD}(el)} \langle \chi_{D1} | \chi_{D2} \rangle \langle \chi_{A1} | \chi_{A2} \rangle \quad (2.42)$$

$$= H_{AD}(el) \langle \chi_{D1} | \chi_{D2} \rangle \langle \chi_{A1} | \chi_{A2} \rangle. \quad (2.43)$$

Dabei ist $H_{AD}(el)$ die elektronische Wechselwirkungsenergie. Die Überlappintegrale $|\langle \chi_{D1} | \chi_{D2} \rangle|^2$ und $|\langle \chi_{A1} | \chi_{A2} \rangle|^2$ entsprechen jeweils den Franck-Condon-Faktoren für die Abregung des Donors sowie für die Anregung des Akzeptors. Die Funktion des Energieübertrags zwischen Donor und Akzeptor ist graphisch dargestellt in **Abb. 2.4.1**.

Für die elektronische Wechselwirkung machte Förster in seiner Arbeit von 1948 die Näherung, dass „der Molekülabstand groß gegen die Bindungsabstände der Atome ist“ [117], wodurch die führende Wechselwirkung die Coulomb-Wechselwirkung ist. Ist der Molekülabstand weiterhin größer als die Moleküldimensionen, so reduziert sich die Wechselwirkung auf den Dipol-Dipol-Term

$$\hat{V}_{AD} = \left(\frac{f^2}{n^2} \right) \left\{ (\hat{\mu}_D \hat{\mu}_A) |\vec{R}_{AD}|^{-3} - 3 (\hat{\mu}_D \vec{R}_{AD}) (\hat{\mu}_A \vec{R}_{AD}) |\vec{R}_{AD}|^{-5} \right\}, \quad (2.44)$$

wobei $\hat{\mu}_D$ und $\hat{\mu}_A$ die Übergangsdipolmomente des Donors und des Akzeptors, sowie \vec{R}_{AD} den Abstand beider Moleküle beschreiben. Mit f und n werden lokale Feldeffekte und der Brechungsindex des Mediums (Dielektrikum) zwischen beiden Molekülen berücksichtigt. Damit lässt sich $H_{AD}(el)$ näherungsweise schreiben als

$$H_{AD}(el) = \left(\frac{f^2}{n^2} \right) \left\{ \sqrt{D_{21}(D)} \sqrt{D_{21}(A)} \underbrace{(\cos\theta - 3\cos\alpha\cos\beta)}_{\kappa} |\vec{R}_{AD}|^{-3} \right\}. \quad (2.45)$$

Somit gehen in die Elemente der Übergangsmatrix die Dipolstärken des Donors $D_{21}(D)$ sowie des Akzeptors $D_{21}(A)$ und deren Orientierung $\kappa = \cos\theta - 3\cos\alpha\cos\beta$ zueinander in die Gleichung ein. Wie in **Abb. 2.4.2** zu sehen, ist dabei θ der Winkel beider Übergangsdipole zueinander und α , β sind die Winkel der Übergangsdipole zum Verbindungsvektor \vec{R}_{AD} zwischen Donor und Akzeptor. Im ursprünglichen klassischen Ansatz von Förster [114] waren n und κ noch nicht enthalten und wurden mit der quantenmecha-

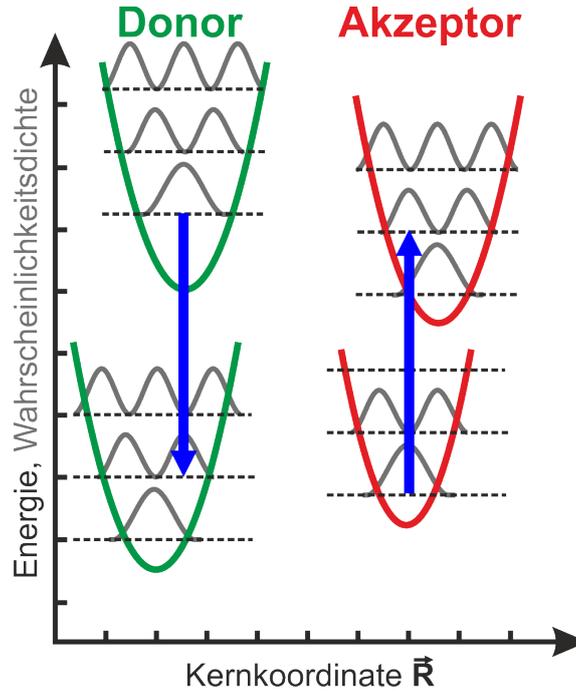


Abbildung 2.4.1: Resonanzenergietransfer. Voraussetzung für einen Resonanzenergietransfer ist die Kopplung der Abregung des Donormoleküls (**D**) und der Anregung des Akzeptormoleküls (**A**). Dafür muss die Resonanzbedingung $|E_2 - E_1| \approx 0$ erfüllt sein. Ebenso müssen die Franck-Condon-Faktoren für diese Übergänge ungleich Null sein. Nach [94].

nischen Betrachtung von 1948 [117] hinzugefügt [118]. Mit Hilfe von Fermis goldener Regel können Übergangsraten zwischen Zuständen ähnlicher Energie berechnet werden. Für die Berechnung der Transferrate zwischen der Zustandsdichte von Anfangszuständen $\rho_{S1}(E_1)$ im Bereich der Energie des Anfangszustandes E_1 und der Zustandsdichte der Endzustände $\rho_{S2}(E_1)$ gilt:

$$k_{RET} = \frac{2\pi}{\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} |H_{AD}|^2 \rho_{S2}(E_1) \rho_{S1}(E_1) dE_1. \quad (2.46)$$

Da die FRET-Rate k_{RET} proportional zu $|H_{AD}|^2$ ist, gilt $k_{RET} \propto \kappa^2$. Wie aus **Gl. 2.45** zu sehen, nimmt κ^2 daher, je nach gegenseitiger Orientierung der Übergangsdipole der Farbstoffe zueinander, Werte zwischen 0 und 4 an. Können sich nun die Farbstoffe willkürlich bewegen, zum Beispiel durch Rotationsdiffusion, und das auf einer Zeitskala kleiner als die Fluoreszenzlebensdauer des Donors, so ist $\kappa^2 = \frac{2}{3}$. Farbstoffe sind meist mit flexiblen Linkern an die zu untersuchenden Moleküle gebunden und besitzen damit auch eine gewisse Bewegungsfreiheit, wodurch $\frac{2}{3}$ meist eine gute Näherung darstellt [119]. Die Resonanztransferrate k_{RET} bestimmt sich zu [94]:

$$k_{RET} = \left(\frac{9000 \cdot \ln 10}{128 \cdot \pi^5} \frac{\kappa^2 c^4 \Phi}{n^4 N_A \tau} \right) |R_{AD}|^{-6} J. \quad (2.47)$$

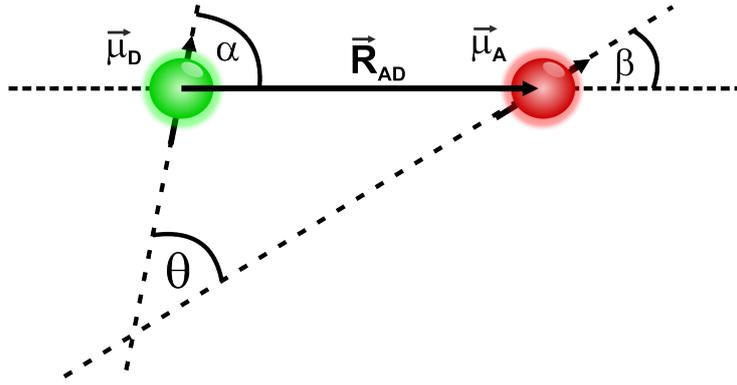


Abbildung 2.4.2: Orientierungsfaktor κ . Der Resonanzenergietransfers ist abhängig von den Beiträgen der Übergangsdipolmomente $|\vec{\mu}_D|$, $|\vec{\mu}_A|$, vom Abstand beider Ladungszentren $|\vec{R}_{AD}|$, sowie von ihrer Orientierung zueinander θ als auch ihrer Orientierung zu \vec{R}_{AD} mit α und β . Nach [94, 115].

Dabei gehen die Lichtgeschwindigkeit c , die Fluoreszenzquantenausbeute Φ , die Avogadrokonstante N_A und die Fluoreszenzlebensdauer τ in **Gl. 2.47** ein. Mit dem Brechungsindex n wird die Dämpfung der Ausbreitung von elektromagnetischen Wellen in einem Medium, hier die optische Dichte der Umgebung zwischen Donor und Akzeptor, berücksichtigt. Wie wir schon anhand der Franck-Condon-Faktoren gesehen haben, ist es möglich, die Energieübertragung als Funktion des Emissionsspektrums des Donors, in Abwesenheit des Akzeptors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors in Verbindung zu bringen. Mit J findet man das Überlappintegral aus dem Donoremmissionsspektrum und dem Akzeptorabsorptionsspektrum (**Abb. 2.4.3**). Drückt man die Anregungsfrequenz ν der Photonen in ihrer Wellenlänge λ aus mit $\frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$, so bekommt man

$$\bar{J} = Jc^{-4} = \frac{\int F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^2 d\lambda}{\int F_D(\lambda)\lambda^{-2} d\lambda}. \quad (2.48)$$

Dabei ist $F_D(\lambda)$ die Donoremmissionsintensität und $\epsilon_A(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors. Bei der Untersuchung biologischer Proben mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie bezieht sich der Brechungsindex auf das gesamte Medium zwischen Donor und Akzeptor. Damit eingeschlossen ist auch das die Fluorophore umgebende Material, wie zum Beispiel DNS, RNS oder Proteine und nicht nur das Lösungsmittel der Probe. Daher ist eine genaue Bestimmung meist nicht möglich. Für Proteine setzt man meist einen Faktor von $n \approx 1,4$ ein. Im Fall, dass man die Umgebung nicht genau kennt, benutzt man den Brechungsindex für Wasser mit $n \approx 1,33$ [94]. Mit R_0 sowie dem Abstand des FRET-Paares R_{AD} bestimmt sich die FRET-Rate zu [94]:

$$k_{RET} = \frac{1}{\tau} \left(\frac{|R_{AD}|}{R_0} \right)^{-6}. \quad (2.49)$$

Die starke Abhängigkeit von k_{RET} von den Fluorophorabständen im Nanometerbereich macht die Anwendung des FRET-Mechanismus im Experiment zu einer leistungsfähigen Methode, Abstandsmessungen auf einer Skala von 10 – 100 Å durchzuführen. In einer

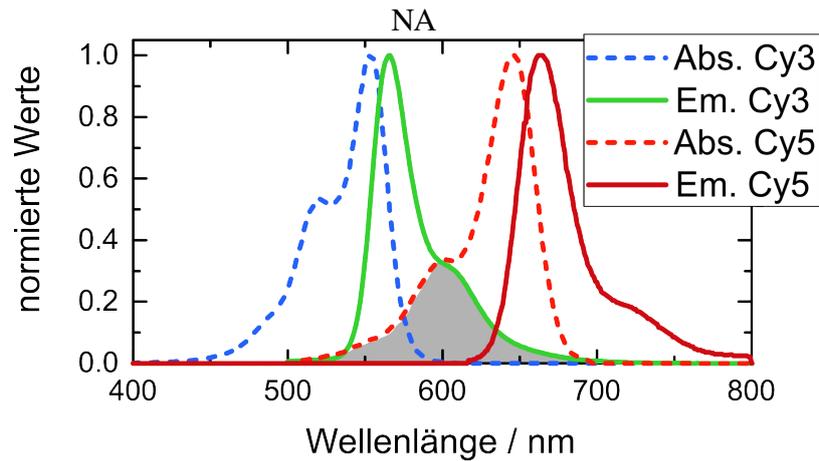


Abbildung 2.4.3: Überlappintegral J. Aufgetragen sind die Absorptionsspektren der Farbstoffe Cy3 und Cy5 als blau- bzw. hellrotgestrichelte Linien, sowie jeweils die dazugehörigen Emissionsspektren in grün bzw. dunkelrot. Der spektrale Überlapp (graue Fläche) bestimmt sich aus dem Emissionsspektrum des Donors (Cy3) und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Cy5).

Veröffentlichung von 1978 [120] machte L. Stryer auf die Anwendung dieser Methode auf biologische Proben aufmerksam und bezeichnete FRET als hoch präzises Lineal zur Vermessung von intra- oder extramolekularen Abständen. Fasst man nun alle physikalischen Eigenschaften des Donor-Akzeptor-Paares (FRET-Paar) zusammen, indem wir **Gl. 2.49** und **Gl. 2.47** kombinieren, findet man den Försterradius R_0 :

$$R_0 = \left[\frac{9 \ln 10}{128 \pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 \Phi_J}{n^4} \right]^{\frac{1}{6}}. \quad (2.50)$$

R_0 definiert den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei welchem die Wahrscheinlichkeit eines Energieübertrags durch FRET bei 50 % liegt.

2.4.1 Die FRET-Effizienz

Ist die FRET-Rate k_{RET} größer als die Fluoreszenzzerfallsrate des Donors in Abwesenheit eines Akzeptors k_0 (alle strahlenden und strahlungslosen Effekte außer FRET inbegriffen), so ist der Energieübertrag effizient. Erhöht man den Abstand beider Fluorophore, so wird die Wahrscheinlichkeit des Energieübertrags immer geringer, sodass schließlich kein Transfer mehr stattfindet (siehe **Abb. 2.4.4**). Die Wahrscheinlichkeit der Relaxation des Donors durch den Försterresonanzenergietransfer ist als die FRET-Effizienz E definiert [115]. Daher bestimmt sich die FRET-Effizienz E aus dem Verhältnis der Transfer-rate durch FRET zu der Summe aus k_{RET} und k_0 [97, 121]:

$$E = \frac{k_{RET}}{k_0 + k_{RET}}. \quad (2.51)$$

Durch Einsetzen der FRET-Rate aus **Gl. 2.49** in **Gl. 2.51** erhält man schließlich die Relation zwischen FRET-Effizienz und dem Abstand der Farbstoffmoleküle R_{AD} :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{AD}}{R_0}\right)^6}. \quad (2.52)$$

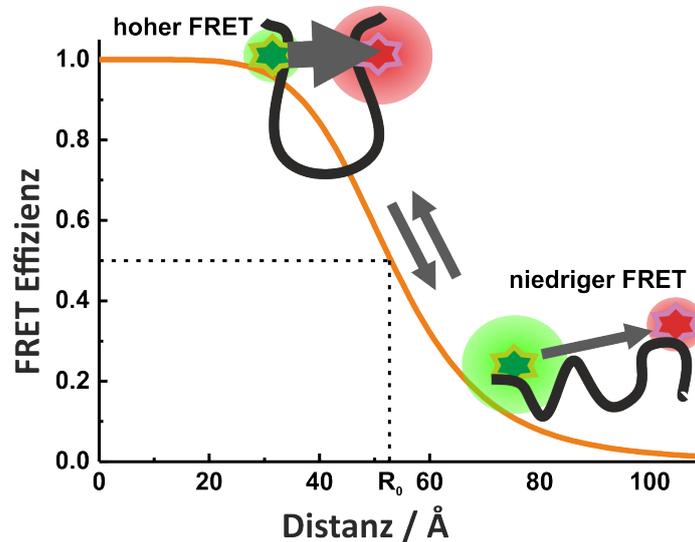


Abbildung 2.4.4: FRET-Effizienz. Kommt das Akzeptormolekül in die Nähe des Donormoleküls, so kann, abhängig vom Abstand, Energie durch den Försterresonanzenergietransfer übertragen werden. Die Übertragungswahrscheinlichkeit lässt sich durch die FRET-Effizienz ausdrücken. Das Schaubild zeigt die FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Abstand für einen Försterradius von 53 Å, den man für das Farbstoff-FRET-Paar Cy3 und Cy5 findet.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Um biologische Proben zu untersuchen, findet man in der Mikroskopie einen vielseitigen und leistungsfähigen Werkzeugkasten. Elektronenmikroskopie zählt bezüglich ihres Auflösungsvermögens von Strukturen zu den genauesten Messmethoden, jedoch können bislang damit nur abgetötete biologische Proben vermessen werden. Es gibt zwar Bemühungen, die Elektronenmikroskopie auch auf lebende Proben anzuwenden, jedoch ist diese Technik noch nicht final ausgereift [122–126].

Um biologische Strukturen und Vorgänge sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu untersuchen, ist die Fluoreszenzmikroskopie besonders gut geeignet. Eine umfangreiche Auswahl an biochemischen Verfahren ermöglicht nämlich die spezifische Markierung vieler biologischer Strukturen, auch in lebenden Proben. Dadurch können beispielsweise Reaktionen in Zellen nachverfolgt werden, sowie die Faltung von biologischen Molekülen wie Proteinen, Enzymen oder DNS und RNS untersucht werden. Somit erlangt man durch Fluoreszenzmikroskopieverfahren ein tieferes Verständnis biochemischer Vorgänge [94, 97].

2 Theoretische Grundlagen

Die Kerneigenschaft eines Mikroskops ist das Auflösungsvermögen seines Aufbaus. Das Auflösungsvermögen beschreibt die Fähigkeit zwei zueinander naheliegende Objekte unterscheiden zu können. Durch die endliche Öffnung der Objektivlinse eines Mikroskops entsteht durch Beugung des eingesammelten Lichts der beobachteten Probe eine radial-symmetrische Intensitätsverteilung. Dieses Beugungsbild besitzt eine zentrale Intensitätsamplitude, umringt von konzentrischen kreisförmigen Intensitätsverteilungen, welche in ihren Amplituden immer weiter abfallen. Diese Intensitätsverteilung wird als Airy-Muster bezeichnet. Das Limit des Auflösungsvermögens bestimmt sich aus dem Radius r_{Airy} des ersten Intensitätsminimums eines Airy-Musters:

$$r_{Airy} = \frac{1,22\lambda_0 f}{D}. \quad (2.53)$$

Dabei ist D der Durchmesser der Apertur, f die Brennweite des Objektivs und λ_0 die Wellenlänge des Lichts im Vakuum. Zwei Airy-Muster können dann noch voneinander unterschieden werden, wenn das Hauptmaximum eines Airy-Musters im ersten Minimum des anderen beobachtet wird. Liegen beide Hauptmaxima näher beieinander sind sie per Definition ununterscheidbar. Zur Verbesserung des Auflösungsvermögens werden Immersionsobjektive eingesetzt, welche mit Wasser oder Öl zwischen Objektiv und Probe eine Verbesserung der Auflösung um den Faktor des Brechungsindex n der Immersionsflüssigkeit erreichen. Die Wellenlänge skaliert mit dem Brechungsindex mit $\lambda_0 = \frac{\lambda}{n}$. Damit gilt,

$$r_{Airy} = \frac{1,22\lambda}{n} \frac{1}{2 \cdot \sin\alpha} = \frac{0,61\lambda}{NA}, \quad (2.54)$$

wobei mit $\frac{D}{f} = 2\sin\alpha$ der halbe Öffnungswinkel α des Objektivs in **Gl. 2.54** eingeht. Mit der numerischen Apertur $NA = n \cdot \sin\alpha$ bekommt man schließlich das Rayleigh-Kriterium [127–129]. Dieses Kriterium berücksichtigt jedoch nicht das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, *SNR*) zwischen Probe und Hintergrund, welches vor allen in der Fluoreszenzmikroskopie bei lichtschwachen Proben entscheidend ist. In der üblichen Weitfeldmikroskopie ist die Belichtung der Probe nicht auf die Fokusebene (Schärfeebene) beschränkt, sondern belichtet jede Schicht der Probe gleichmäßig, wenn man von Absorption absieht. Nachteilig ist dadurch, dass das auf den Detektor projizierte Bild nicht nur aus Licht aus der Fokusebene besteht. Das Licht der unscharf abgebildeten anderen Ebenen erhöht somit stark den Hintergrund, wodurch das Auflösungsvermögen schlechter wird.

2.5.1 Konfokalmikroskopie

Ein Ausweg gelang dem Mathematiker Martin Minsky, der die optische Mikroskopie verbesserte. Seine Idee bestand darin, statt einer Weitfeldbeleuchtung eine punktförmige Belichtung der Probe in der Fokusebene des Objektivs zu verwirklichen. Durch den zusätzlichen Einbau einer Lochblende sollte Licht, welches von außerhalb des Fokuses stammt, abgeblockt werden. Dabei ist das optische System so aufgebaut, dass Belichtungspunkt und Detektionspunkt konfokal zueinander sind. Dadurch sollte das SNR gegenüber kon-

ventioneller Mikroskopie stark verbessert werden [130]. Das Prinzip eines solchen, für diese Arbeit verwendeten Aufbaus ist in **Abb. 2.5.1** zu sehen. Um eine punktförmige Anregung zu erreichen, wird Licht aus einer optischen Faser oder Laserquelle ausgekoppelt und durch eine Kondensatorlinse ein kollimiertes Strahlenbündel erzeugt. Wie in **Abb. 2.5.1** gezeigt, wird die Probe durch das Objektiv nur im Fokus effektiv beleuchtet. Schließlich wird das Fluoreszenzlicht der Probe wieder durch das Objektiv eingesammelt. Dadurch wird tatsächlich realisiert, dass der Anregungsfokus und der Detektionsfokus konfokal zueinander sind.

Durch einen dichroitischen Spiegel werden dann Anregungslicht und Fluoreszenzlicht effektiv voneinander getrennt. Fluoreszenzlicht von außerhalb des Fokuspunktes wird stark unterdrückt, da nur Licht aus dem Fokus die Apertur vollständig passiert. Die Lochblende spielt dabei das Schlüsselement, weswegen der Lochdurchmesser angemessen gewählt werden sollte. Aus dem oben definierten Rayleigh-Kriterium können wir ablesen, dass das beste SNR dann erzielt wird, wenn die Lochgröße genau r_{Airy} , also einer Airy-Einheit

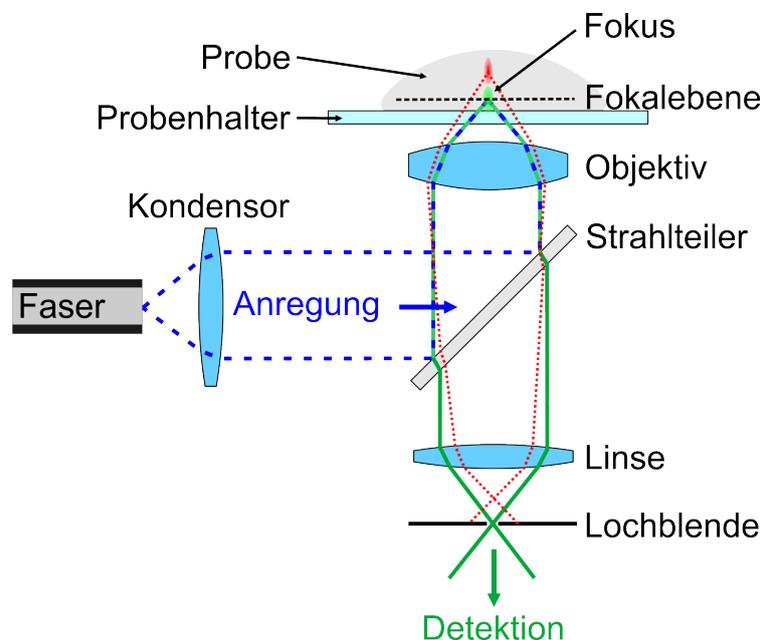


Abbildung 2.5.1: Prinzip des Konfokalmikroskops. Als punktförmige Lichtquelle dient hier eine optische Faser, in welche am anderen Ende Licht, zum Beispiel das eines Lasers, eingekoppelt wird. Die Kondensatorlinse erzeugt einen parallelen Strahlengang. Durch einen Strahlteiler, meist ein dichroitischer Spiegel, wird das Anregungslicht in die Rückapertur des Objektivs reflektiert. Das Objektiv bündelt das Anregungslicht im Fokus, wodurch dort eine nur punktförmige Anregung erreicht wird (grüner Punkt). Die durch das Licht angeregten Farbstoffe emittieren Fluoreszenzlicht, welches entsprechend der NA des Objektivs wieder eingesammelt wird. Durch den eingebauten Strahlteiler wird das Fluoreszenzsignal transmittiert. Nur das Licht aus dem Fokuspunkt passiert vollständig die Lochblende, da sie sich genau im Fokus der Sammellinse im Detektionspfad des Mikroskops befindet (grünes Strahlenbündel). Emissionslicht, welches aus dem Anregungsstrahlengang vor oder hinter dem Fokus erzeugt wurde (rotes Strahlenbündel), wird durch die Lochblende stark unterdrückt [127].

2 Theoretische Grundlagen

1 AU, entspricht. Für das Konfokalmikroskop wird das Kriterium für sein Auflösungsvermögen durch den Abstand zwischen dem Maximum und dem ersten Minimum der Punktspreizfunktion (PSF) einer punktförmigen Lichtquelle bestimmt. Die totale PSF für ein Konfokalmikroskop ergibt sich aus der Faltung der Anregungs-PSF und der Detektions-PSF:

$$PSF_{konfokal} = PSF_{Anregung} \otimes PSF_{Detektion}. \quad (2.55)$$

In der Einzelmolekülspektroskopie werden oft Lochblenden benutzt, deren Durchmesser größer 1 AU sind, da dadurch größere Detektionsvolumen erreicht werden und somit im Falle frei diffundierender Moleküle länger beobachtet werden kann.

2.5.2 Interne Totalreflexionsmikroskopie

Eine weitere häufig verwendete Methode in der Fluoreszenzmikroskopie zur Einschränkung des Beobachtungsvolumens ist die Interne Totalreflexionsmikroskopie (*engl. total internal reflection microscopy*, TIRFM). Hierbei wird ausgenutzt, dass eine totale Reflexion genau dann eintritt, wenn ein Lichtstrahl, kommend aus einem optisch dichteren Medium, mit einem Auftretswinkel größer dem kritischen Winkel auf ein Medium geringerer optischer Dichte trifft [97]. Um dies besser zu verstehen, nehmen wir zunächst eine Grenzschicht zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_1 und n_2 an, wobei $n_1 > n_2$ gilt. Damit gilt das Snelliussche Brechungsgesetz [131]:

$$\frac{\sin(\theta_1)}{\sin(\theta_2)} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (2.56)$$

Der Grenzwinkel, ab welchem Licht total reflektiert wird, ist:

$$\sin(\theta_C) = \frac{n_2}{n_1}. \quad (2.57)$$

Im Spezialfall der Totalreflexion ($n_1 > n_2$ und $\theta_i > \theta_C$) nimmt die Komponente des Wellenvektors des transmittierten Lichtstrahls senkrecht zur Einfallsebene $k_{t,z}$ nur noch imaginäre Werte an.

$$k_{t,z} = \pm i |\vec{k}_t| \sqrt{\frac{n_1^2}{n_2^2} \sin^2(\theta_i) - 1} = \pm i\beta. \quad (2.58)$$

Bei Totalreflexion dringt das E-Feld etwas in das zweite Medium ein [132]. Damit ergibt sich für das eindringende evaneszente Feld:

$$\vec{E}_t = \vec{E}_{0,t} e^{\pm\beta z} e^{i|\vec{k}_t|x \frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_i - \omega t)}. \quad (2.59)$$

Die Intensität im zweiten Medium ist damit proportional zu

$$I \propto |E_t|^2 e^{-\beta z}. \quad (2.60)$$

Mit β finden wir die Eindringtiefe mit

$$\Delta = \frac{1}{\beta} = \frac{\lambda_0}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta_i) - n_2^2}}, \quad (2.61)$$

wobei λ_0 die Wellenlänge der einfallenden ebenen Welle im Vakuum ist [133]. Bei einem TIRF-Mikroskop findet die totale Reflexion an der Grenzschicht zwischen Probelösung und Probenhalter, meist am Deckglas, statt. Daher werden nur die Teile der zu untersuchenden Probe belichtet, welche innerhalb des evaneszenten Feldes liegen. Da in der Fluoreszenzmikroskopie meist sichtbares Licht verwendet wird, ist die Eindringtiefe ca. 100 nm. Das schematische Funktionsprinzip eines Prisma-TIRF-Mikroskops ist in **Abb. 2.5.2** gezeigt. Dabei wird mit Hilfe eines Prismas das Licht, das zuvor aufgeweitet wurde, um ein möglichst großes Beobachtungsfeld zu erzeugen, so auf die Grenzschicht gebrochen, dass eine totale Reflexion entsteht. Das evaneszente Feld regt alle sich darin befindenden Farbstoffe an. Das Objektiv sammelt das Fluoreszenzlicht, welches nachfolgend durch die Tubuslinse auf eine CCD-Kamera abgebildet wird. Durch die dünne Belichtungsschicht der Probe, die kleiner ist als das axiale Auflösungsvermögen eines Konfokalmikroskops, erlangt man eine sehr große SNR. Daher kann dieser Mikroskoptyp auch als

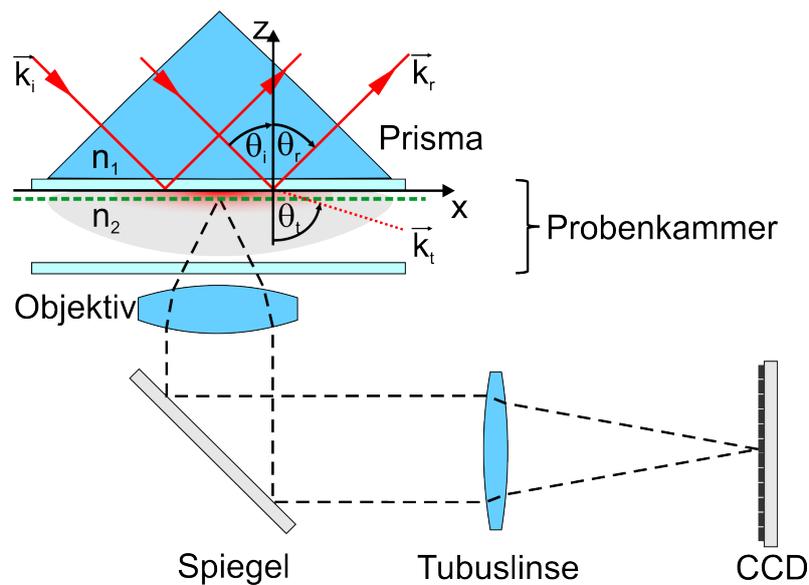


Abbildung 2.5.2: Prinzip des TIRF-Mikroskops. Schematische Darstellung eines TIRF-Mikroskopaufbaus. Mit Hilfe eines Prismas wird ein paralleles Strahlenbündel mit Wellenvektor \vec{k}_i (rote Linien von links) so auf den Phasenübergang zwischen Glas und Probelösung geleitet (mit Einfallswinkel $\theta_i > \theta_c$), dass dieses total reflektiert wird, beschrieben durch \vec{k}_r . An der Grenzschicht zwischen dem Objekthalter aus Glas und der Probelösung entsteht das evaneszente Feld (rotes Feld), welches nur die Farbstoffe innerhalb einer dünnen Schicht von ca. 100 nm anregen. Der optische Aufbau des Mikroskops entspricht dem eines Weitfeldmikroskops, sodass alles, was sich innerhalb der Fokusebene (grün gestrichelt) befindet, scharf auf die CCD-Kamera abgebildet werden kann [129, 134].

Grundlage für hochauflösende Mikroskopie verwendet werden. Im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie wird durch das große Beobachtungsfeld eine hohe Parallelisierung des Messprozesses möglich. Jedoch benötigen CCD-Kameras hohe Belichtungszeiten. Das limitiert die zeitliche Auflösung des TIRF-Mikroskops im Millisekundenbereich, sodass nur (biologische) Prozesse beobachtet werden können, welche auf größeren Zeitskalen ablaufen [128].

2.6 Hidden-Markov-Modell (HMM)

Die gemessenen FRET-Effizienztrajektorien der einzelnen Moleküle zeigen idealerweise eine Abfolge diskreter Faltungszustände mit deutlich unterschiedlichen FRET-Effizienzen, wodurch die Übergangsraten zwischen den einzelnen Zuständen direkt bestimmt werden können. Um dies zu erreichen, wurde bislang die Anzahl der Zustände entweder per Auge oder durch einfache Grenzwertalgorithmen bestimmt. Nachteilig bei diesen Ansätzen ist, dass basierend auf der persönlichen Einschätzung des Betrachters entschieden werden muss, ob ein selten auftretender Übergang als ein legitimer Zustandswechsel ausgelegt oder als photophysikalischer Effekt verworfen wird. Ein solcher Ansatz hängt stark von der Erfahrung ab und erzeugt daher unterschiedliche Ergebnisse, je nach Betrachter. Weiterhin können solche Ansätze keine Faltungszustände unterscheiden, welche innerhalb des Rauschens ähnliche FRET-Effizienzen, jedoch unterschiedliche Übergangsdynamiken zu anderen Zuständen aufweisen. Zusätzlich kommt hinzu, dass solche Analyseansätze kaum mehr als drei Zustände herausarbeiten können.

Daher benutzt man heutzutage Analysealgorithmen, welche nicht nur die spektroskopischen FRET-Effizienzen, sondern auch deren zeitliche Abfolge benutzen, um die am besten geeignete Anzahl von Zuständen, basierend auf den zugrunde liegenden Daten, zu bestimmen. Dafür kann man sich eines Hidden-Markov-Modell Analysealgorithmus bedienen, der zufällige Wechsel zwischen einer diskreten Anzahl von Zuständen mit wohl definierten mittleren FRET-Effizienzen und Zustandslebenszeiten annimmt.

2.6.1 Markov-Ketten

Nehmen wir zunächst an, dass ein physikalischer Prozess existiert, dessen Beobachtung über eine Zeit t eine Folge $q_{t=1}, q_{t=2}, \dots$ von diskreten Zuständen q_t als Ergebnis liefert. Im Fall, dass der Übergang vom Zustand $q_t \rightarrow q_{t+1}$ nur vom derzeitigen Zustand q_t , jedoch nicht von der Folge aller vorhergehenden Zustände abhängt, so lässt sich dieses System mathematisch durch eine Markov-Kette darstellen. Ein solcher physikalischer Prozess, der sogenannte Markov-Prozess, lässt sich auf die Übergänge zwischen Faltungszuständen von RNS-Molekülen und Proteinen übertragen [135–137].

Im einfachsten Fall einer Markov-Kette 1. Ordnung besitzt ein RNS-Molekül N diskrete Zustände S_1, S_2, \dots, S_N . Die Übergangswahrscheinlichkeiten P zwischen den Zuständen ergeben sich nur aus dem vorhergehenden und dem aktuellen Zustand:

$$P [q_t = S_j | q_{t-1} = S_i, q_{t-2} = S_k] = P [q_t = S_j | q_{t-1} = S_i]. \quad (2.62)$$

Somit lässt sich das System durch eine $N \times N$ große Übergangsmatrix \hat{T} mit

$$\hat{T}(\delta t) : t_{ij} = P[q_{t+\delta t} = S_j | q_t = S_i] \quad (2.63)$$

beschreiben. Die Übergangszustandskoeffizienten t_{ij} sind zudem positiv definit und vollständig:

$$t_{ij} \geq 0, \quad (2.64)$$

$$\sum_{j=1}^N t_{ij} = 1. \quad (2.65)$$

Dieser Prozess entspricht einem Markov-Modell, dessen Ergebnis zu jedem Zeitschritt δt einen Zustand liefert, der einem physikalisch beobachtbaren Ereignis zugeordnet werden kann [138]. In der Natur sind jedoch die einem Zustand zugeordneten Signale meist nicht diskret, sondern durch den Messprozess mit Rauschen überlagert. Für solche Fälle muss ein diskretes Markov-Modell so erweitert werden, dass die Beobachtung durch eine Wahrscheinlichkeitsfunktion der auftretenden Zustände beschrieben wird. Dies entspricht einem HMM. Durch die Überlagerung mehrerer stochastischer Prozesse wird der zu Grunde liegende Prozess, zum Beispiel die Faltungsdynamik zwischen strukturellen Zuständen eines RNS-Moleküls, verdeckt. Dieser kann nur dann beobachtet werden, wenn man die anderen stochastischen Prozesse, die Emission von Photonen der Fluorophore, sowie Schrotrauschen des Messprozesses, in das Modell einbindet [138].

Ein System, das durch ein HMM beschrieben werden kann, befindet sich zu jedem Zeitschritt δt in einem versteckten Zustand S_i und ist durch eine ihm zuordenbare Observable beobachtbar. Jeder Zustand in einem HMM besitzt eine eigene Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion f , welche die Observable erzeugt und daher als Emissionsfunktion bezeichnet wird. Zusätzlich besitzt jeder Zustand seinen eigenen Satz an Übergangswahrscheinlichkeiten in jeden anderen Zustand (**Abb. 2.6.1**). Zusammen mit den Übergangswahrscheinlichkeiten definiert die Emissionsfunktion einen Zustand vollständig. Für smFRET-Daten kann daher ein HMM durch die Parameter $\Phi (\hat{T}, \vec{\pi}, \vec{e})$ vollständig beschrieben werden. Mit dem Vektor $\vec{\pi}$ findet man die dem FRET-Effizienzvektor \vec{e} zugeordneten Gleichgewichtspopulationen der einzelnen Faltungszustände.

2.6.2 HMM für Einzelmolekül-FRET-Daten

Ein HMM ist eine stochastische Annahme $\Phi (\hat{T}, \vec{e})$, die eine beobachtete bzw. gemessene Trajektorie $O = o_1, \dots, o_m$ der Werte $o_m = (n_{d,m}, n_{a,m})$ modelliert, wobei sich die Werte o_m aus der jeweiligen Anzahl der gemessenen Photonen des Donor-, $n_{d,m}$, und des Akzeptorkanals, $n_{a,m}$, zu jedem Zeitschritt m ergeben. Weiterhin wird angenommen, dass sich die beobachteten Werte der Trajektorie durch eine Hidden-Markov-Kette darstellen lassen, deren Übergänge zwischen den Zuständen durch die Übergangsmatrix \hat{T} bestimmt sind. Die Zustände lassen sich dabei strukturellen Konformationen zuordnen, deren Verweildauern monoexponentiell abfallend verteilt sind. Die Zustände werden dabei jeweils durch einen Parametersatz e_i dargestellt, welcher in einem Vektor \vec{e} zusammengefasst wird. Die Messung lässt sich daher als stochastischer Prozess einer bedingten

Wahrscheinlichkeit $P[o_m|s_m]$ modellieren, der aussagt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein beobachteter Wert o_m einem versteckten (hidden) Zustand s_m zuzuordnen ist. Will man nun ein HMM finden, welches die Messung am besten darstellt, so ist das Ziel, einen solchen Satz von Modellparametern $\Phi(\hat{T}, \vec{e})$ zu finden, welcher die Likelihood-Funktion $P[O|\Phi]$ maximiert. Durch das Modell Φ kann der Datensatz O dargestellt werden. Die Konstruktion von HMM unterscheidet sich dabei in der Art und Weise, wie der versteckte (engl. *hidden*) Prozess und der Messprozess modelliert werden sowie durch den Ansatz der Parameteroptimierung [140].

Spezifisch für Einzelmolekül-FRET-Daten entwickelte Prof. Bettina Keller ein HMM mit dazugehörigem Optimierungsalgorithmus, der die Schwierigkeiten der Zustandszuordnung genau solcher Daten meistert. Zum einen benötigt man eine zuverlässige Unterscheidung von Zuständen verschiedener Konformationen innerhalb einer FRET-Effizienztrajektorie eines bestimmten Moleküls, um separate Zustände mit ähnlicher FRET-Effizienz unterscheiden zu können. Zum anderen sollten die existierenden Zustände der einzelnen Moleküle bei gleichen Umgebungsbedingungen, jedoch verschiedenen Koordinaten auf dem Objektträger, übergreifend identisch ermittelbar sein. Daher ist es absolut notwendig, das trajektorienspezifische Hintergrundsignal von jedem einzelnen Molekül zu bestimmen. Somit wurde eine trajektorienabhängige Hintergrundbestimmung durchgeführt. Für die HMM-Analyse wurden als molekülunabhängige Größen das spektrale Übersprechen der emittierten Photonen der Farbstoffe in die „falschen“ Detektionskanäle sowie die vom Faltungszustand abhängigen Quantenausbeuten durch die unterschiedliche Ausrichtung der Farbstoffe zueinander angenommen. Folgende zwei Eigenschaften des Algorithmus sind nötig, um trajektorienübergreifend die versteckten Konformationszustände richtig zuzuordnen:

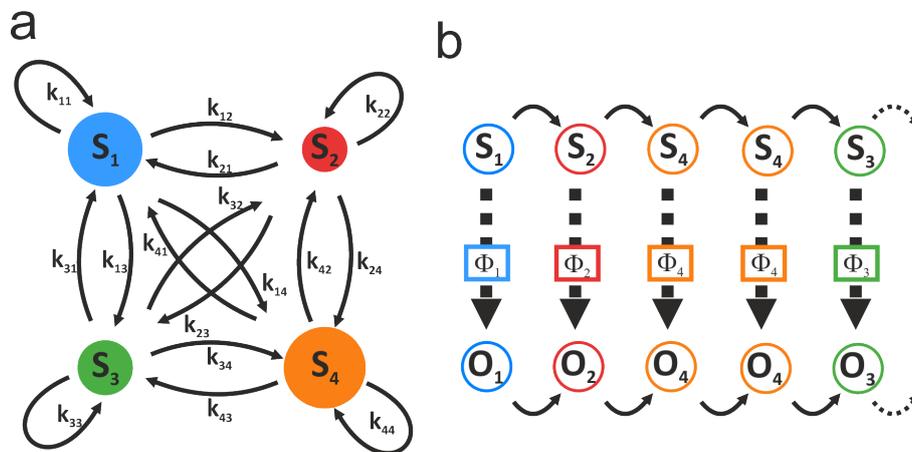


Abbildung 2.6.1: Schematische Darstellung eines Vier-Zustands-HMM. (a) Vier-Zustandsnetzwerk mit den Zuständen $S_1 - S_4$, wobei die Kreisflächen proportional zur Besetzungshäufigkeit $\pi_1 - \pi_4$ sind. Jedem Zustand ist zudem ein mittlerer FRET-Wert $e_1 - e_4$ zugeordnet. Die Pfeile zeigen die Übergangsraten k_{ij} vom Zustand i nach j . (b) Die HMM-Zustände $S_1 - S_4$ erzeugen mit den Emissionsfunktionen $\Phi_i(\hat{T}, \vec{\pi}, \vec{e})$ die beobachtbaren Observablen $O_1 - O_4$. Da jeder Zustand seinen eigenen Satz an Übergangswahrscheinlichkeiten besitzt, bekommen wir eine HMM-spezifische Zeitreihe. Nach [138, 139]

- Das HMM beachtet dabei, dass FRET-Effizienzen durch die Messung diskreter Photonen bestimmt werden. Dafür wird angenommen, dass die Emission von Photonen des Donor- und des Akzeptorfarbstoffes der Poisson-Statistik unterliegt.
- Bei der Bestimmung der Zustände werden die trajektorieneigenen Hintergrundsignale beachtet.

Folglich existiert für eine gewisse Anzahl an Zuständen N eine $N \times N$ große Übergangsmatrix \hat{T} mit einem $N \times I$ Vektor der Beobachtungsparameter \vec{e} . Dieser Parametervektor enthält schließlich die gemittelten hintergrundkorrigierten FRET-Werte der einzelnen versteckten Zustände. Diese Werte sind letztlich wichtig, um die Photonenemissionsraten des zugrundeliegenden Poisson-Prozesses zu bestimmen. Somit stellt sich das HMM-Optimierungsproblem wie folgt dar:

$$P\left[O|\hat{T}, \vec{e}\right] = \sum_{\text{alle Pfade } S} \vec{\pi}_{s_1} P[o_1|s_1] \prod_{m=2}^{m_{\max}} \hat{T}_{s_{m-1}, m} P[o_m|s_m]. \quad (2.66)$$

2.6.3 Maximum-Likelihood-Schätzer

Um eine möglichst gute Anpassung einer Verteilungsfunktion $f[\theta]$ mit den Modellparametern $\theta = (\theta_1, \theta_2, \dots)$ an beobachtete Daten $O = o_1, \dots, o_M$ zu bekommen, kann man einen Maximum-Likelihood-Schätzer ansetzen:

$$L(\theta) = f[o_1, o_2, \dots, o_m|\theta] = f(o_1|\theta) f(o_2|\theta) \dots f(o_m|\theta). \quad (2.67)$$

Der Logarithmus der **Gl. 2.67** entspricht der Log-Likelihood-Funktion:

$$l(\theta) = \ln[L(\theta)] = \sum_{i=1}^m \ln[f[o_i|\theta]]. \quad (2.68)$$

Ziel ist es, einen Parametersatz $\hat{\theta}$ zu finden, der die Log-Likelihood-Funktion maximiert:

$$l(\hat{\theta}) = \max\{l(\theta)\}. \quad (2.69)$$

Der Grundgedanke besteht also darin, das Modell zu finden, das die vorliegende Messung am besten beschreibt [141, 142]. Da durch das Logarithmieren des Produkts eine Summe wird, ist die Berechnung der Log-Likelihood-Funktion einfacher. Die Maxima ändern sich dadurch nicht, da der Logarithmus eine streng monoton wachsende Funktion ist [143, 144].

Im Falle einer Poisson-Verteilung, wie man sie für Photonenemission erwartet, ist die Verteilung

$$f(N) = \left(\frac{n^N}{N!} e^{-n}\right). \quad (2.70)$$

Dabei beschreibt N die detektierte Anzahl an Photonen und n die gemittelte Photonenzahl. Somit bekommt man als Ergebnis des Maximum-Likelihood-Schätzers für den Modellparameter $\theta = n$:

$$\hat{n}(o_1, \dots, o_m) = \overline{O_m}. \quad (2.71)$$

2.6.4 Übergangspfadtheorie

Zur Berechnung eines Faltungspfades beginnend von einem definierten Zustandsensemble A hin zu einem definiertem Zustandsensemble B , bietet die Übergangspfadtheorie (*engl. transition-path theory*, TPT) einen statistischen Ansatz, um den wahrscheinlichsten Faltungspfad zwischen zwei Faltungszuständen zu erhalten. Entwickelt wurde die TPT, um einen Faltungspfad, beginnend von einem fehl- oder ungefalteten Proteinzustand hin zum nativen Faltungszustand des Proteins, zu berechnen [137, 145]. Diese Berechnung von Faltungspfaden konnte seither auch auf RNS-Moleküle übertragen werden [140].

Beginnt die Faltung eines Biomoleküls mit einem ungefalteten elongierten Zustand A , existiert eine Zahl von Zwischenzuständen I bis die Faltung im stabilen nativen Zustand B des Biomoleküls endet. Die Zahl der Zwischenzustände kann sehr groß sein und zudem über nicht funktionale Fehlfaltungen führen, was eine Vielzahl an Faltungsmöglichkeiten ergibt. Interessant ist jedoch vor allem der Faltungspfad, welcher typischerweise direkt zur funktionalen Struktur des Biomoleküls führt. Zur Bestimmung des wahrscheinlichsten Pfades werden in der TPT zunächst sogenannte Kommittorwerte q_i^+ bestimmt. Der Kommittorwert ist definiert als die Wahrscheinlichkeit von einem Zustand i eher zum nativen Zustand B zu falten als zum ungefalteten Zustand A . Dabei ist der Startwert des Kommittors in A $q_{i=A}^+ \equiv 0$ und der Endwert in B $q_{i=B}^+ \equiv 1$ gesetzt. Alle Kommittorwerte der Zwischenzustände i nach k berechnen sich durch die Lösung des Systems von folgender Gleichung [137]:

$$-q_i^+ + \sum_{k \in I} T_{ik} q_k^+ = - \sum_{k \in B} T_{ik}. \quad (2.72)$$

Wie man sieht, benötigt die TPT zur Berechnung der Kommittorwerte die Übergangsmatrix T_{ik} , um vom Edukt A zum Produkt B zu gelangen. Die Kommittorwerte nehmen dabei beginnend von A hin zu B stetig zu. Um nun den wahrscheinlichsten Faltungspfad zu bekommen, werden weiterhin die Wahrscheinlichkeitsflüsse (*engl. probability flux*) berechnet. Sie entsprechen einer Rate f_{ik}^+ und ergeben zusammen mit den Kommittorwerten ein Netzwerk aus Faltungspfaden, mit:

$$f_{ik}^+ = \pi_i (q_k - q_i) T_{ik} (\delta t). \quad (2.73)$$

Die Rate stellt sich dann in Einheiten der kleinsten Zeitschritte δt dar, im Experiment entspricht dies der kleinsten Abtastrate. Dabei sind q_i und q_k Kommittorwerte mit $q_i \leq q_k$. Die Berechnung der Kommittorwerte ist in der EMMA-Software, welche die Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Bettina Keller für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat, implementiert [146].

3 Materialien und Methoden

3.1 Mikroskopaufbauten

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Mikroskoptypen in Abhängigkeit der jeweils nötigen Messmethode verwendet. Die Einzelmolekül-FRET-Experimente an frei diffundierenden und immobilisierten Molekülen wurden an einem selbstgebauten Konfokalmikroskop (**Abb. 3.1.1**), basierend auf einem Zeiss Axiovert 35 (Jena, Deutschland), durchgeführt [147, 148]. Neben dem Konfokalmikroskop wurde auch ein selbstgebautes Prisma-TIRF-Mikroskop, basierend auf einem Zeiss Axiovert 200 (Jena), benutzt, um Einzelmolekülexperimente durchzuführen [149, 150].

3.1.1 Das Konfokalmikroskop

Zur Anregung der FRET-Farbstoffmoleküle Cy3 als Donor sowie Cy5 als Akzeptor werden jeweils ein 532 nm Laser (Excelsior, 532, Nd-YAG Laser, Spectra Physics, Mountain View, CA) und ein 637 nm Laser (Obis 637, Coherent Inc., Santa Clara, CA) verwendet. Beide Laser sind auf einem getrennten optischen Tisch (Melles Griot, Albuquerque, NM) verbaut. Das Licht der beide Laser wird über einen Kollimator (PAFA-FC/APC-4-A, Thorlabs, Newton, NJ) in eine optische Faser (QSMJ-A3A,3AF-400/700-S-3.5AS8, OZ-Optics) eingekoppelt und auf dem optischen Tisch des Konfokalmikroskops wieder ausgekoppelt (HPUCO-23AF 400/700-S-20AS, OZ Optics), wodurch eine optimale TEM 00 Mode entsteht. Zur Sicherstellung einer hohen Detektionseffizienz in mehreren Farbkanälen bei gleichzeitiger Nutzung eines Mehrfarbenanregungsschemas wird statt einem Standard-Multiband-Strahlteiler ein programmierbarer akustooptischer Strahlteiler, basierend auf mehreren akustooptischen Transmissionsfiltern (*engl. acousto optical tunable filter, AOTF*), 97-01776-01, Crystal Technology, Palo Alto, CA), verwendet [151]. Die Anordnung der vier verwendeten AOTF-Module ermöglicht es, zum Beispiel im Fall einer alternierenden Laseranregung, immer nur eine der vier zur Verfügung stehenden Laserlinien für die Anregung zu schalten (**Abb. 3.1.2**). Gleichzeitig ermöglicht das AOTF-System, das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht zur Detektion zu trennen. Zur reinen Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht wäre ein optischer Multibandfilter zwar einfacher und günstiger. Der Nachteil von Multibandfiltern gegenüber dem verwendeten AOTF-System ist jedoch, dass Multibandfilter ein festes Transmissions- und Reflektionsspektrum besitzen. Dagegen kann der akustooptische Strahlteiler immer nur die gewünschte Anregungswellenlänge aus dem Emissionsspektrum herauschneiden, sodass bei der Verwendung mehrerer Farbstoffe die kompletten Emissionsspektren ungestört transmittiert werden (**Abb. 3.1.2**). Die computergesteuerte Kontrolle dieser vier AOTFs

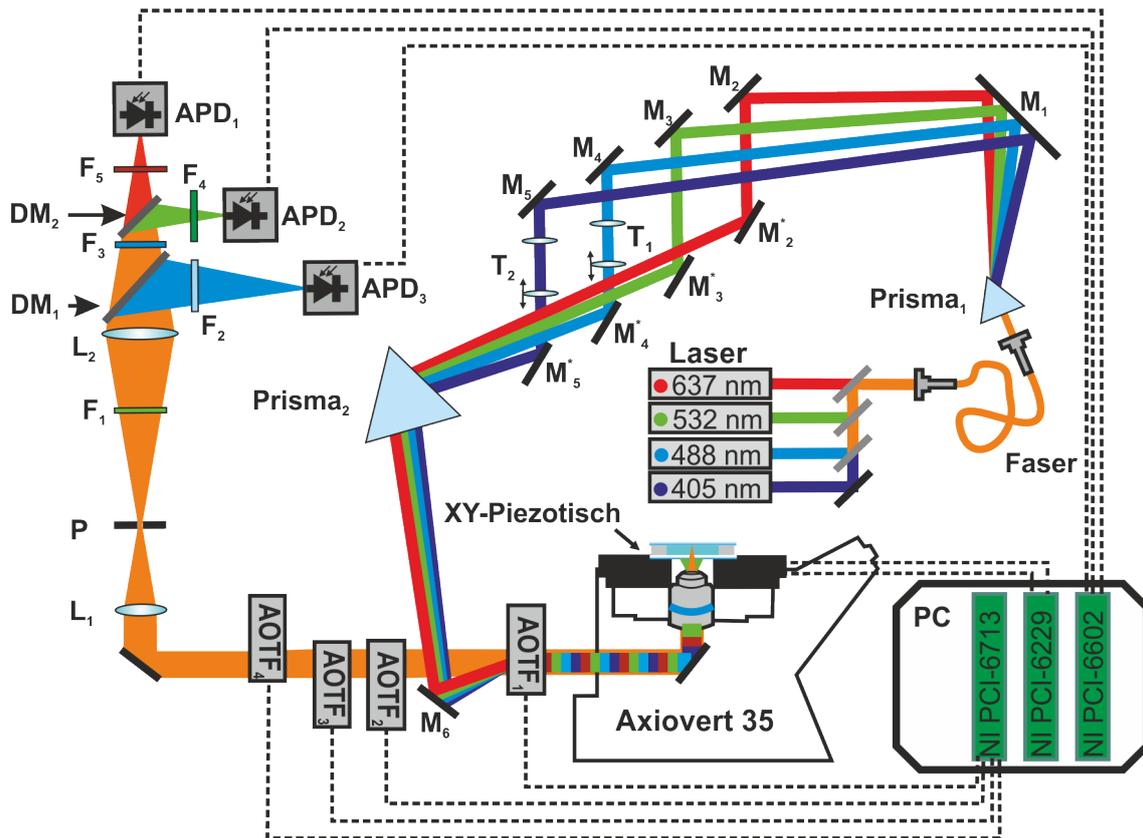


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung des Konfokalmikroskops. Beschreibung der Abkürzungen: AOTF₁₋₄ – akustooptischer Transmissionsfilter, APD₁₋₃ – Avalanche Photodiode, DM_{1,2} – dichroitische Spiegel, M₁₋₆ – dielektrische Spiegel, P – Lochblende, PC – Computer, T_{1,2} – Teleskope, L_{1,2} – Linsen, F₁₋₅ Filter.

erfolgt dabei mit Hilfe einer multifunktionalen Datenerfassungskarte (PCI-6713, National Instruments, Austin, TX). Das AOTF₁ beugt den einlaufenden Laserstrahl in erster Beugungsordnung, welche zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs justiert ist. Die anderen drei AOTF-Module benötigt man zur Kompensation der durch AOTF₁ erzeugten Dispersion und Doppelbrechungseffekte auf das Emissionslicht. Details zur Einstellung und Justage sind im Anhang zu finden. Um eine optimale axiale und laterale Überlappung der vier Laserstrahlen zu bekommen, werden diese durch zwei dispersionskompensierende Prismen (Thorlabs) geleitet, über jeweils ein Paar justierbarer Spiegel (Thorlabs) geführt und durch ein zusätzliches Teleskop (Linsen und Halterung von Thorlabs) kollimiert. Damit nur Daten von solchen Molekülen aufgezeichnet werden, welche mit einem funktionalen FRET-Paar markiert sind, wird ein alternierendes Anregungsschema genutzt (*engl. alternating laser excitation, ALEX*, Details siehe **Kapitel 3.4.3**) [152]. Dieses schaltet abwechselnd für einige Mikrosekunden zwischen dem Anregungslaser des Donorfarbstoffes und dem des Akzeptorfarbstoffes hin und her. Die Fluoreszenzsignale werden mit der Anregung synchronisiert und getrennt nach Detektionskanal (Donor- und Akzeptorkanal) erfasst. Somit werden die emittierten Photonen bezüglich ihrer Fluorophore und der Anregung sortiert. Zwischen den Anregungsintervallen muss jedoch stets eine Pause von 5 μ s eingehalten werden, da der AOTF diese Zeit braucht, um zwischen zwei Wellen-

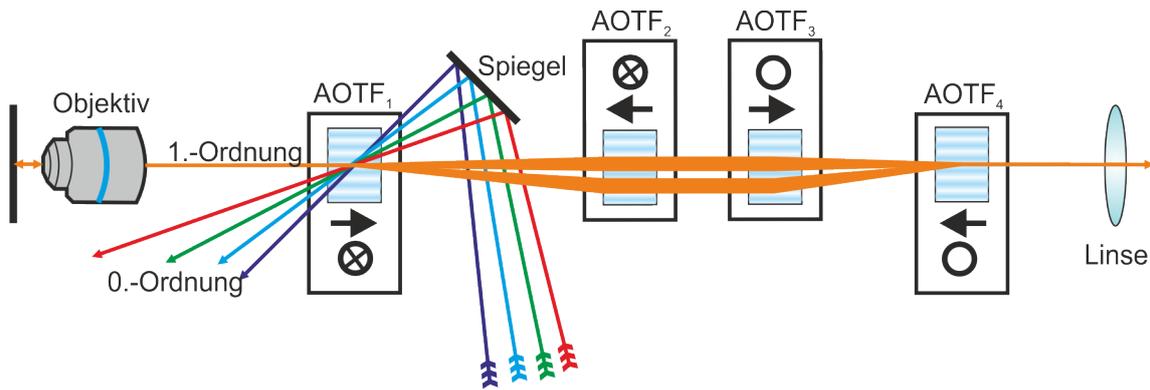


Abbildung 3.1.2: Programmierbarer akustooptischer Strahlteiler. Bestehend aus vier AOTFs, erlaubt es der programmierbare akustooptische Strahlteiler, eine von vier Anregungswellenlängen auszuwählen, ohne dabei das Transmissionsspektrum bezüglich aller anderen Wellenlängen zu beeinflussen. Das AOTF₁ beugt den ausgewählten Laserstrahl in erster Beugungsordnung in die optische Achse des Objektivs. Die anderen AOTFs korrigieren die Strahlage aufgrund von Dispersion und Doppelbrechung, welche durch das AOTF erzeugt werden. Daher besitzt dieser programmierbare Filter einen großen Vorteil gegenüber dielektrischen Multibandfiltern, welche zu jeder Zeit alle Anregungswellenlängen reflektieren und das restliche Spektrum transmittieren. Die rote, grüne, blaue und violette Linie entsprechen den Laserstrahlen. Die orangefarbenen Strahlenbündel beschreiben das Emissionslicht. Die Kreise mit Kreuz markieren die Oberseite und die leeren Kreise die Unterseite der AOTF-Module.

längen umzuschalten. Dies verhindert das Übersprechen der spektralen Signale während des Schaltvorgangs.

Das Fluoreszenzemissionslicht wird mit einem Wasserimmersionsobjektiv (UPlanApo 60× 1.2w, Olympus, Hamburg, Deutschland) eingesammelt und nach den vier AOTF-Modulen entweder durch eine 100 μm Lochblende (P) (zur Messung von frei diffundierenden Partikeln) oder durch eine 50 μm Lochblende (P) (zur Messung von immobilisierten Partikeln) mit der Linse L₁ ($f_1 = 125$ mm, Thorlabs) fokussiert. Das Emissionslicht wird dann spektral durch die Verwendung eines dichroitischen Spiegels DM₂ (640 DCXR, Chroma, Bellows Falls, VT) in Donor- bzw. Akzeptoremission aufgespalten. Der dichroitische Spiegel DM₁ (550 DCXR, Chroma) wird in Kombination mit der Avalanche-photodiode APD₃ (MPD, Bozen, Italien), einem schmalbandigen Sperrfilter F₁, einem Bandpassfilter F₂ und einem Langpassfilter F₃ verwendet. Der Detektionskanal der APD₃ dient zur Detektion von Fluoreszenzsignal mit Wellenlängen kleiner 550 nm und wird zum Beispiel für FRET-Experimente mit drei unterschiedlichen Farbstoffen eingesetzt. Um das Emissionslicht von restlichem Laserlicht sowie spektral übersprechendem Licht zu bereinigen, ist im Donorkanal ein Bandpassfilter mit zentraler Transmissionswellenlänge von 580 nm und einer Bandbreite von 60 nm (F₄, BrightLine HC 580/60, Semrock, Rochester, NY) und im Akzeptorkanal ein 642 nm Langpassfilter (F₅, BrightLine 642/LP, Semrock) eingebaut. Die Linse L₂ ($f_1 = 100$ mm, Thorlabs) fokussiert das Emissionslicht auf die Photodioden. Photonen werden mit den Avalanche-photodioden (SPCM-AQR-14, Perkin Elmer Optoelectronics, Boston, MA) getrennt nach Donorkanal (grüner Kanal, APD₂) und Akzeptorkanal (roter Kanal, APD₁) detektiert. Die APD

Signale werden dann mit einer Datenerfassungskarte (PCI-6602, National Instruments) mit dem Anregungsschema synchronisiert und verarbeitet. Die Probe wird auf dem Mikroskopisch mit etwas Vakuumfett befestigt und kann mit Hilfe eines Piezotisches (P-731.20, Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany) lateral positioniert werden. Über das Anlegen eines Analogsignals, ausgegeben durch eine weitere Datenerfassungskarte (PCI-6229, National Instruments), wird die Position der Probe festgelegt.

In dieser Arbeit wurden nur Moleküle mit einem Cy3-Cy5-FRET-Paar vermessen, sodass zum einen die Filter $F_1 - F_3$ sowie der dichroitische Spiegel DM_1 aus dem Strahlengang entfernt wurden und zum anderen nur der 532 nm Laser und der 637 nm Laser genutzt wurden. Für die Messung frei diffundierender Moleküle wurde die Probe kontinuierlich in Kreisen von $30 \mu\text{m}$ Durchmesser und mit einer Geschwindigkeit von $25 \mu\text{m s}^{-1}$ über das Objektiv bewegt, um optisch beeinflusste Diffusionseffekte zu kompensieren [153]. Für die Messung immobilisierter Moleküle wurde jeweils ein Bereich von 128×128 Pixel mit einer Haltezeit von 5 ms pro Pixel abgescannt, was einer Gesamtfläche von $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ entspricht. Mit einer hauseigenen Software wurden darin die Positionen einzelner detektierter Partikel bestimmt, die zur Messung der individuellen Moleküle angefahren wurden. Dann wurde mit dem ALEX Anregungsschema der zeitliche Verlauf der Emissionsintensität in Donor- und Akzeptorkanal (APD_2 bzw. APD_1) erfasst, wobei die Anregungszyklen mit der Detektion synchronisiert waren.

3.1.2 Das Prisma-TIRF-Mikroskop

Zur Anregung der mit dem FRET-Paar Cy3 und Cy5 markierten RNS-Moleküle werden jeweils ein 532 nm Laser (DPGL-2050F, SUWTech Laser, Fujian, China) und ein 638 nm Laser (MLD 638, Cobolt AB, Solna, Schweden) verwendet (**Abb. 3.1.3**). Neben diesen Lasern ist das Prisma-TIRF-Mikroskop weiterhin mit einem 561 nm Laser (Jive, Cobolt AB) sowie mit einem 488 nm Laser (Stabilite 2017, Spectra Physics, Mountain View, CA) ausgerüstet. Die einzelnen Laserstrahlen werden mit Hilfe zweier Spiegel und einem dichroitischen Spiegel in erster Ordnung in ein AOTF (AA Opto-electronic, Orsay, Frankreich) eingekoppelt. Die verwendeten dichroitischen Spiegel DM_1 , DM_2 und DM_3 haben jeweils eine Grenzwellenlänge von 590 nm (DCXR590, Chroma, Bellows Falls, VT), 550 nm (DCXR550, Chroma) und 510 nm (FT510, Zeiss). Selektiert durch das AOTF, wird das Laserlicht in 0. Beugungsordnung transmittiert und durch zwei Linsen aufgeweitet (L_1 , $f_1 = 30 \text{ mm}$ und L_2 , $f_2 = 100 \text{ mm}$, Thorlabs). Die darauf folgende Linse L_3 besitzt eine Brennweite $f_3 = 300 \text{ mm}$ und ist so positioniert, dass der Brennpunkt etwas unterhalb der Fokusebene des Objektivs liegt. Somit wird eine homogene Ausleuchtung des Beobachtungsfeldes gewährleistet, womit schließlich viele Moleküle gleichzeitig beobachtet werden konnten. Dieser durch die Linse L_3 fokussierte Strahl wird zunächst über zwei Spiegel umgelenkt und so auf das Pellin-Broca-Prisma geführt, das an der Grenzschicht des Quarzglas und der Probenflüssigkeit die gewünschte totale Reflexion erzeugt wird (roter Kasten, **Abb. 3.1.3**). Besteht der Probenhalter aus Quarzglas und ist mit wässriger Pufferlösung gefüllt, ergeben sich jeweils Brechungsindizes von $n_I = 1,46$ und $n_2 = 1,33$. Dadurch ergibt sich ein kritischer Grenzwinkel von $\theta_C \approx 66^\circ$. Zur Justage der Laser, welche sich denselben Anregungsstrahlengang teilen, wurde der Einstrahlwinkel so eingestellt, dass er größer als $\theta_C \approx 66^\circ$ ist. Das Pellin-Broca-Prisma wird, nachdem

der Objektträger auf dem Mikroskoptisch fixiert wurde, darauf gesetzt und ebenso fixiert. Um eine ungestörte Strahlführung an die Grenzschicht der Probenkammer zu garantieren, wird zwischen Prisma und Objektträger ein Tropfen Immersionsöl ($n = 1,518$, Immersol 518F, Zeiss) aufgetragen.

Das Fluoreszenzlicht, erzeugt durch die Anregung der Fluorophore durch das evaneszente Feld, wird durch das Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat $63\times$, $NA = 1,2$) eingesammelt. Durch den Langpassfilter F_1 (HQ550LP, Chroma Technology via AHF, Tübingen, Deutschland) wird das restliche Donoranregungslaserlicht unterdrückt. Das Licht wird dann durch die Tubuslinse des Kameraports des Axiovert200 in den Detektionspfad des pTIRFM geleitet. Im Brennpunkt der Tubuslinse befindet sich eine Schlitzeblende (P), welche die Größe des reellen Bildes einschränkt, sodass nur diejenige Bildfläche auf dem Kamerachip abgebildet wird, die diesen ausfüllt. Mit dem Filter F_2 (NF03-633E-25, Semrock via AHF) wird schließlich das Laserlicht zur Anregung des Akzeptors unterdrückt. Mit Hilfe der drei Umlenkspiegel M und des dichroitischen Spiegels DM_4 (650DCXRU, Chroma, Bellow Falls, VT) wird die Abbildung spektral in den Donor- und den Akzeptorkanal aufgetrennt. Die verwendete Kamera besitzt einen EMCCD-Chip (*engl. electron multiplying charged coupeld device* (iXon EM+ DU-897, Andor, Belfast, GB), welcher einzelne Photonen detektiert. Das Linsensystem aus L_4 und L_5 bildet ein Teleskop, welches eine zusätzliche $10\times$ Bildvergrößerung erzeugt.

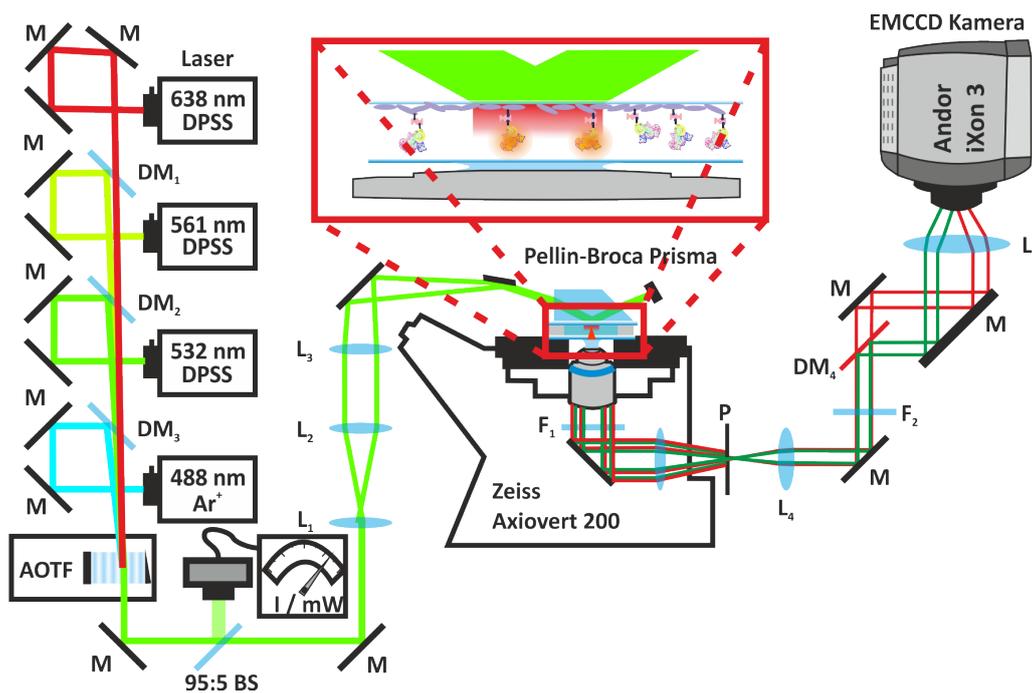


Abbildung 3.1.3: Schematische Darstellung des Prisma-TIRF-Mikroskops. Beschreibung der Abkürzungen: AOTF – akustooptischer Transmissionsfilter, EMCCD-Kamera, DM_{1-4} – dichroitische Spiegel, M – dielektrische Spiegel, P – Schlitzeblende, BS – Strahlteiler, $T_{1,2}$ – Teleskope und L_{1-4} – Linsen. Die gezeigte Vergrößerung im roten Kasten verdeutlicht die Anregung der fluoreszenten Moleküle, die durch ein Schichtsystem, bestehend aus BSA/Biotin-BSA und Streptavidin, an der Oberfläche immobilisiert sind.

3.2 Pufferlösungen und Stammlösungen

Um für die Einzelmolekülexperimente an RNS-Proben dieser Arbeit die optimalen Voraussetzungen zu schaffen, wurden für die Präparation der Proben nur Chemikalien mit möglichst hoher Reinheit verwendet. Ebenso wurde stets darauf geachtet, dass die verwendeten Chemikalien frei von lumineszenten Verunreinigungen waren. Um eine hohe Sauberkeit aller verwendeter Puffer und Lösungen sicherzustellen, wurden diese in den jeweiligen Stammlösungen unter dem Prisma-TIRF-Mikroskop auf Verunreinigungen kontrolliert. Nur Lösungen mit minimaler Verunreinigung wurden in Aliquote aufgeteilt und entsprechend gelagert. Vor jedem Experiment wurden diese Aliquote zu ihren Arbeitslösungen verdünnt und nochmals unter dem Mikroskop auf lumineszente Verunreinigungen getestet. Beim Kauf der Chemikalien wurden nur solche ausgewählt, welche laut Lieferant nachweislich frei von RNasen und DNasen waren. RNase und DNase sind Enzyme, welche jeweils einzelstrangige RNS und DNS spalten. Um folglich eine Zerstörung der zu untersuchenden RNS-Struktur zu verhindern, ist es notwendig, die Chemikalien frei von solchen Enzymen zu halten. Diese Sicherheitsvorkehrungen dienen schließlich dazu, sicherzustellen, dass nur funktionstüchtige und farbstoffmarkierte RNS-Moleküle unter bekannten Bedingungen mit dem Mikroskop untersucht werden.

Für die Einzelmolekülexperimente an RNS wurde ein $5\times$ RNS-Standardpuffer, bestehend aus 250 mM Tris-HCl (pH 7,4) mit 1,5 M NaCl, hergestellt. Dieser wurde aliquotiert und bei 8 °C gelagert. Erst zur Probenpräparation wurden die Aliquote auf die benötigte Konzentration verdünnt. Um eine entsprechende Konzentration an Magnesiumionen für das Experiment zu bekommen, wurde eine 1 M Stammlösung in H₂O hergestellt. Erst bei Bedarf wurden diese mit hochreinem Wasser verdünnt und dem RNS-Standardpuffer beigefügt.

3.2.1 Redox- und sauerstoffzehrende Systeme

Um lange Messzeiten an immobilisierten Molekülen zu ermöglichen, ist es wichtig, die Bleich- und Blinkstabilität der Fluorophore zu maximieren. Dazu werden sauerstoffreduzierende Systeme eingesetzt, um Reaktionen der Fluorophore mit Sauerstoff in nichtfluoreszente Komplexe zu verhindern.

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde das sauerstoffzehrende PCA/PCD-System verwendet, bestehend aus Protocatechusäure (*engl. protocatechuic acid*, PCA) und Protocatechuate-3,4-Dioxygenase (PCD) [105]. Alle folgenden Chemikalien wurden über die Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Es wurde eine 100 μ M Stammlösung von PCD hergestellt. Die Aliquote der $100\times$ Stammlösung wurden bei -20 °C gelagert. Dafür war es nötig, das Enzym PCD (100 μ M) in einem speziellen Lösungsmittel, bestehend aus 50 % Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM Natriumchlorid und 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (*engl. ethylenediamine tetraacidic acid*, EDTA), zu lösen. Um jederzeit frische PCA-Lösung zur Verfügung zu haben, wurde eine 100 mM Stammlösung ($100\times$, pH 7,4), gepuffert mit NaOH, bei -20 °C gelagert und kurz vor der Messung aufgetaut.

Weiterhin soll verhindert werden, dass die Fluorophore der Moleküle Tripletzustände

einnehmen. Dazu werden Redox-Systeme verwendet. In den Experimenten dieser Arbeit wurde dafür eine Lösung aus Trolox und Trolox-Chinon verwendet. Trolox ist ein Vitamin-E-Derivat und ein Reduktionsmittel. Trolox-Chinon ist ein oxidiertes Trolox-Derivat und wirkt als Oxidationsmittel. Trolox-Chinon kann durch Photooxidation aus Trolox hergestellt werden. Für die Herstellung eines Redox-Systems wird folgendermaßen vorgegangen: Um eine $5\times$ Stammlösung herzustellen wurde zunächst eine 5 mM Trolox-Lösung in 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) angesetzt. Wegen der schweren Löslichkeit von Trolox wurde die Lösung in einem Zentrifugenröhrchen (VWR, Radnor, PA) verschlossen und über 18 h Stunden durch langsames Drehen durchmischt. Das durchsichtige Röhrchen mit der Trolox-Stammlösung wurde dabei dem Tageslicht ausgesetzt, bis eine leicht gelbliche und klare Lösung entstand. Die gelbliche Färbung stammt vom Trolox-Chinon und war somit ein Indikator, dass die Photooxidation stattgefunden hat. Die qualitative Prüfung der Stammlösung auf Trolox-Chinon wurde durch Absorptionsmessung mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop, ThermoFischer, Waltham, MA) durchgeführt. Das gelöste Trolox besitzt eine Absorptionsbande bei ~ 290 nm. Ist genügend Trolox-Chinon in der Lösung vorhanden, ist seine Absorptionsbande bei ~ 270 nm messbar. Bis zur Verwendung wurde die Stammlösung vor Licht geschützt und bei $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert [111].

Zur weiteren Verbesserung der Photostabilität der Fluorophore wurden die Tripletquencher 4-Nitrobenzyl-Alkohol (NBA), 2-Mercaptoethylamin (MEA) sowie Cyclo-Octatetraen (COT) beigemischt [99]. Von NBA, MEA und COT wurden jeweils 100 mM Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Endkonzentrationen, welche für die Messung der fluoreszenten Moleküle benutzt wurden, betragen immer $1\text{ }\mu\text{M}$ PCD und 1 mM PCA, sowie 1 mM Trolox, 1 mM COT, 1 mM MEA und 1 mM NBA. Dadurch waren Messungen über mehrere Minuten möglich.

3.2.2 SAM und S-Adenosylhomocystein (SAH)

Für die Einzelmolekülexperimente des SAM-I-Riboschalters wurden ebenso Stammlösungen der Liganden SAM und SAH angesetzt. Diese wurden nach denselben Reinheits- und Sauberkeitsanforderung wie oben beschrieben hergestellt. Die SAM-Stammlösung war eine 3 mM SAM-Lösung. Dafür wurde eine entsprechende Menge SAM (Sigma-Aldrich) in einer wässrigen Lösung, bestehend aus 10 % Ethanol und 5 mM H_2SO_4 , gelöst. Die SAH-Stammlösung bestand aus 9,78 mM SAH, gelöst in einer wässrigen Lösung (pH 1,7) von 50 mM H_2SO_4 . Beide Stammlösungen wurden aliquotiert, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und für das Experiment erst kurz vor Verwendung entsprechend mit RNS-Standardpuffer verdünnt.

3.3 Probenpräparation für Einzelmolekülexperimente

Die Synthese der RS-Moleküle wurde von Dr. Ayan Samanta in der Arbeitsgruppe von Prof. Jäschke, Universität Heidelberg, durchgeführt. Die SAM-I-RS-Konstrukte wurden

aus fünf RNS-Oligomeren mit Hilfe der sogenannten geschichteten Ligationsmethode (*engl. splinted ligation method*) synthetisiert [154]. Der Riboschalter wurde aus den folgenden RNS-Sequenzen zusammengesetzt:

- 5'-AUA UCC GUU CUU AUC AAG AGA AGC AGA GGG ACU G-3'
- 5'-GCC CGA CGA UGC UUC AGC AAC CAG UGU AAU GGC G-3'
- 5'-AUC AGC CAU GAC UAA GGU GCU AAA UCC AGC AAG C-3'
- 5'-UCG AAC AGC UUG GAA GAU AAG AAG AGA CAA AAU C-3'
- 5'-ACU GAC AAA GUC UUC UUC UUA AGA GGA CUU UUU-Biotin-3'

Um Moleküldynamiken mit Hilfe von FRET messen zu können, wurden RNS-Fragmente spezifisch ausgewählt und an den fett gedruckten Uridinen mit einem Cy3- oder einem Cy5-Fluoreszenzfarbstoff markiert (**Abb. 3.3.1**). Indem markierte und unmarkierte Teilsequenzen entsprechend zusammengesetzt wurden, entstanden daraus FRET-Paar markierte RS-Konstrukte. Die hergestellten Konstrukte sind in **Tab. 3.1** aufgeführt. Die Uridine wurden mit einem 5-[3-[(6-aminohexyl)amino]-3-oxo-1-propenyl]-Linker versehen und diese durch eine post-synthetische Derivatisierung der primären Amino-Gruppe mit der NHS-Ester-Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 verbunden. Weitere Details zur Synthese der FRET-Konstrukte sind im **Kapitel A.1** zu finden.

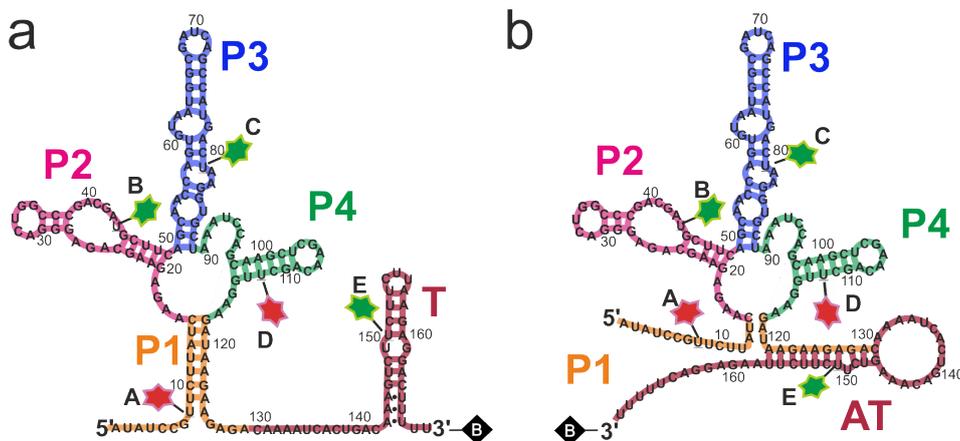


Abbildung 3.3.1: FRET-Konstrukte des SAM-I-Riboschalters. Sekundärstrukturmodelle des *B. subtilis yitJ* SAM-I-RS, bestehend aus 169 Nukleinsäuren in der (a) Terminator- und (b) Antiterminator-Struktur. Die Helices des Aptamers sind P1 (orange), P2 (magenta), P3 (blau) und P4 (grün); die Expressionsplattform ist in dunkelrot dargestellt. Die möglichen Positionen, welche mit Farbstoff markiert werden können, sind mit den Buchstaben A bis E gekennzeichnet. Für sinnvolle Kombinationen von FRET-Paaren werden die Positionen B, C und E nur mit dem Donor (Cy3), und die Positionen A und D nur mit dem Akzeptor (Cy5) markiert. Der Donor und der Akzeptor sind jeweils mit einem grünen und einem roten Stern gekennzeichnet. Ein Konstrukt besteht dabei immer nur aus einer FRET-Paarkombination. Das 3'-Ende des SAM-I-RS ist mit einem Biotin (schwarze Raute) funktionalisiert.

Tabelle 3.1: Synthetisierte FRET-Konstrukte des SAM-I-Riboschalters. Insgesamt wurden sechs verschiedene Konstrukte synthetisiert, um strukturelle Veränderungen mit Hilfe von FRET messen zu können. Die Positionen der Farbstoffmarkierungen A – E sind ergänzt durch U₈, U₄₄, U₈₁, U₁₁₂ und U₁₅₀, wobei diese das markierte Nukleotid Uridin (U) mit seiner Positionsnummer in der Polymerkette beschreiben.

FRET-Paarkombinationen					
Konstrukt	Farbstoffpositionen				
	A (U ₈)	B (U ₄₄)	C (U ₈₁)	D (U ₁₁₂)	E (U ₁₅₀)
I	Cy5	Cy3	-	-	-
II	Cy5	-	Cy3	-	-
III	Cy5	-	-	-	Cy3
IV	-	Cy3	-	Cy5	-
V	-	-	Cy3	Cy5	-
VI	-	-	-	Cy5	Cy3

3.3.1 Probenvorbereitung für Einzelmolekülexperimente

Die Einzelmolekülexperimente am Konfokal- wie auch am Prisma-TIRF-Mikroskop wurden mit selbst hergestellten Mikrofluidikkammern durchgeführt, jedoch mussten für beide Mikroskope unterschiedliche Kammerdesigns benutzt werden. Die Mikrofluidikkammer für das Konfokalmikroskop bestand aus zwei Deckgläsern ($24 \times 32 \text{ mm}^2$, Nr. 1 und $24 \times 20 \text{ mm}^2$, Nr. 1, Menzel, Braunschweig, Deutschland). Nach Reinigen und Abflammen der Deckgläser wurden diese mit zwei Streifen beidseitig adhäsivem Klebeband (3M, St. Paul, MN) so zusammengeklebt, dass ein $\sim 2 \text{ mm}$ breiter Kanal erzeugt wurde (**Abb. 3.3.2 b**). Für das Prisma-TIRF-Mikroskop wurde ein Deckglas ($24 \times 40 \text{ mm}^2$, Nr. 1, Menzel) mit beidseitig adhäsivem Klebeband so an einen Objektträger aus Quarz ($26 \times 76 \text{ mm}^2$, Finkenbeiner, Waltham, MA) geklebt, dass vier Kanäle mit einer Breite von je 5 mm entstanden. Um das Pipettieren von Probenflüssigkeit in die Kammer zu erleichtern, wurden vor dem Zusammenkleben jeweils am Ende der Kanäle zusätzlich Löcher von je 1 mm Durchmesser in den Quarzobjektträger gebohrt. Um immer das gleiche Bohrbild zu erhalten, wurde auf Papier eine maßstabsgerechte Schablone mit äquidistanten Punkten gedruckt. Die Quarzgläser wurden auf diese Schablone gelegt. Mit Hilfe eines wasserfesten Folienstiftes (Lumocolor, F-Strichstärke $0,6 \text{ mm}$, Nürnberg, Deutschland) wurden die Bohrpunkte auf das Glas übertragen. Mit einer Bohrmaschine (Dremel, Racine, WI), in welche ein 1 mm Diamantbohrer (Dremel) eingesetzt wurde, konnten dann die Löcher gebohrt werden. Für die Bohrungen wurden die Quarzgläser so in ein Wasserbad gelegt, dass die Gläser leicht bedeckt waren. Damit konnte sowohl ein gutes Bohrbild erlangt, als auch die Lebensdauer der Diamantbohrer erhöht werden. Später wurde die Probenflüssigkeit per Pipette durch die Löcher in die Probenkammer pipettiert. Um das Pipettieren zu erleichtern, wurden die Bohrlöcher mit Hilfe der Bohrmaschine noch entgratet (**Abb. 3.3.2 a**). Ein detailliertes Präparationsprotokoll ist im Anhang zu finden. Um unspezifische Absorption von Molekülen an der Glasoberfläche zu verhindern, wurde zur Messung an frei diffundierenden Molekülen die Kammern zuvor gründlich mit

3 Materialien und Methoden

einer 15 mM Lösung Rinderserumalbumin (*engl. bovine serum albumin* (BSA), Sigma Aldrich, St. Louis, MO) passiviert [155]. Das BSA wurde dazu in einem Phosphatpuffer (*engl. phosphate buffered saline* (pH 7,4), PBS, Sigma Aldrich) gelöst. Beim Lösen des BSA in PBS wurde stets darauf geachtet, die Probe nicht zu schütteln, sondern nur sanft zu bewegen, um eine Schaumbildung zu vermeiden. Die Lösung wurde dann unter dem TIRF-Mikroskop auf lumineszente Verschmutzung getestet. Im Falle minimaler Verschmutzung wurde die Lösung in Probenröhrchen (Eppendorf Tubes (1,5 ml), Eppendorf, Deutschland) aliquotiert und bei 8 °C gelagert.

Um Moleküle auf der Oberfläche zu immobilisieren, wurden die Kammern mit einer Mischung aus 10 mg ml⁻¹ BSA und 1 mg ml⁻¹ biotinyliertem BSA (Sigma Aldrich), jeweils gelöst in PBS, funktionalisiert. Die Lösung ist so ausgelegt, dass zum einen das BSA den größten Teil der Glasoberfläche passiviert und zum anderen der kleinere Anteil an biotinyliertem BSA ausreichend genügend Ankerpunkte für die zu immobilisierenden Moleküle bildet. Um die RNS-Moleküle zu immobilisieren, welche auch einen Biotin-Linker besitzen, wurde die Kammer anschließend mit einer 100 µg ml⁻¹ Streptavidin-Lösung inkubiert [148]. Da Streptavidin bis zu vier Biotin-Linker binden kann, dient es als Verbindungsstück zwischen dem biotinylierten BSA auf der Glasoberfläche und dem

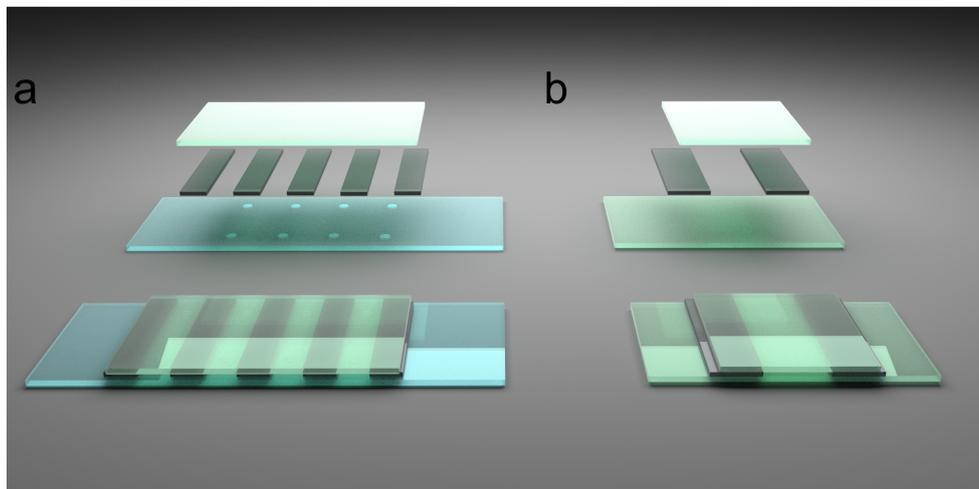


Abbildung 3.3.2: Probenkammern für Einzelmolekülexperimente. Entsprechend des jeweiligen Mikroskopieverfahrens, unterschiedlicher Mikroskopaufbauten sowie verschiedener Versuchsverfahren eignen sich unterschiedliche Probenkammerdesigns für Einzelmolekülexperimente. Hier sind die in dieser Arbeit verwendeten Kammern, durchgeführt am pTIRF-Mikroskop (a) und am Konfokalmikroskop (b) dargestellt. Der Zusammenbau des Sandwich-Designs aus Probenhalter, beidseitig adhäsivem Klebeband und Deckglas ist in der oberen Reihe erkennbar. Die fertigen Probenkammern sind in der unteren Reihe zu sehen. (a) Quarzglas-Probenhalter (blau gefärbtes Glas) wurden mit dünnen Streifen beidseitig adhäsiven Klebebands (graue Streifen) mit Deckgläsern aus Glas (grünes Glas, Menzel) zusammengeklebt. Die Löcher, die in das Quarzglas hineingebohrt wurden, besitzen einen Durchmesser von ≈ 1 mm und eigneten sich daher zum Einpipettieren der Probenflüssigkeiten mit den benutzten Pipettenspitzen (DNA LoBind, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). (b) Die Probenkammer für das Konfokalmikroskop wurden aus zwei Deckgläser (Menzel) unterschiedlicher Größe zusammengeklebt.

biotinylierten RNS-Molekül in der Probelösung. Die Aliquote der SAM-I-RS-Lösungen wurden mit RNS-Standardpuffer mit 15 mM Mg^{2+} auf 10 – 100 pM verdünnt und für 2 min auf 70 °C erhitzt sowie anschließend langsam abgekühlt, bevor sie dann in die Kammer pipettiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min wurde dann die Kammer gründlich mit der Lösung, wie sie für die jeweilige Messung benötigt wird (mit entsprechender Liganden- und Magnesiumionenkonzentration, mit dem sauerstoffzehrenden System und den Triplettquenchern), durchgespült. Somit werden nicht immobilisierte Moleküle ausgewaschen und gleichzeitig die gewollten Umgebungsbedingungen für den Riboschalter sichergestellt. Eine funktionalisierte Glasoberfläche mit immobilisierten Molekülen ist in **Abb. 3.3.3** schematisch dargestellt.

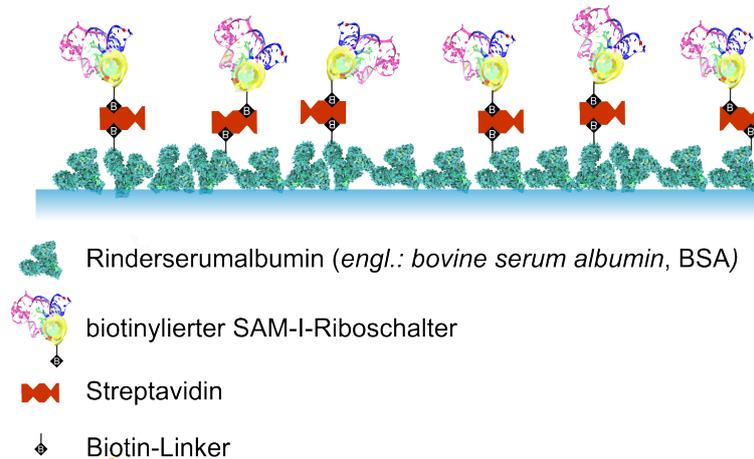


Abbildung 3.3.3: Funktionalisierte Glasoberfläche der Probenkammern. Durch die negative Nettoladung einer Glasoberfläche in Wasser haften die BSA-Moleküle (grüne Moleküle) auf der Glasoberfläche. Der Oberflächenteil der Proteine, der der Lösung zugewandt ist, besitzt eine neutrale Oberflächennettoladung und dient somit als Passivierung der Oberfläche. Das Streptavidin (rote Kästchen) haftet wiederum am Biotin der Linker (schwarze Quadrate und schwarze Striche) und dient somit als Bindeglied zwischen den biotinylierten BSA-Molekülen und den hier zu immobilisierenden SAM-I-RS.

3.4 Einzelmolekülspektroskopie

Der große Vorteil von Einzelmolekülexperimenten ist die Möglichkeit, Details aufzudecken, welche durch die statischen und dynamischen Heterogenitäten der biologische Proben in einer Ensemblemessung bei der Mittelung vieler Moleküle untergehen. Auch wenn man nur einzelne Moleküle betrachtet, so kann man auf Grund der Ergodizität schon mit wenigen Molekülen das Ergebnis einer Ensemblemessung reproduzieren. Selbst im Fall, dass die Ergodizität nicht erfüllt wird, so erhält man dennoch detailliertere Informationen über das vermessene System als bei einem Ensembleexperiment. Ein weiterer Vorteil von Einzelmolekülexperimenten ist der geringe Probenverbrauch, da für einzelne Messungen nur Konzentrationen im Pico- bis Nanomolarbereich benötigt werden [156]. In

diesem Kapitel werden die experimentellen Methoden erklärt, welche in dieser Arbeit benutzt wurden, um den SAM-I-RS mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie zu erforschen.

3.4.1 Die Messung der FRET-Effizienz

Im Idealfall, unter Ausschluss nichtfluoreszenter konkurrierender Prozesse (Quenchen, etc.), kann die FRET-Effizienz aus dem Anteil der vom Akzeptor emittierten Photonen N_A zur Summe aller emittierten Photonen $N_D + N_A$, inklusive der Donoremission N_D , gemessen werden:

$$E = \frac{N_A}{N_A + N_D}. \quad (3.1)$$

Im Experiment wurde das Fluoreszenzsignal der beiden Farbstoffe Cy3 und Cy5 durch einen dichroitischen Spiegel getrennt. Dieser dichroitische Spiegel ist speziell an die jeweiligen Emissionsspektren des Donors und des Akzeptors angepasst. Das Emissionslicht wurde dann in zwei verschiedene Kanäle detektiert. Zusätzlich wurden pro Detektionskanal ein Bandpassfilter verbaut, um spektrales Übersprechen sowie das Streulicht der Laserlichtquelle zu minimieren. Zwar waren die verwendeten optischen und optoelektronischen Systeme sehr gut, jedoch nicht perfekt, sodass sich das gemessene Signal der Donorintensität I_D und der Akzeptorintensität I_A vom emittierten Fluoreszenzsignal N_D und N_A unterschied. Diese Diskrepanz des gesamten optischen Messsystems wurde durch die Einführung der zusätzlichen Faktoren der Detektionseffizienzen η_D und η_A des Donor- und des Akzeptorkanals berücksichtigt. Die Größen η_D und η_A sind ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, die tatsächliche Anzahl an Photonen zu detektieren. Da die verwendeten Farbstoffe Cy3 und Cy5 unterschiedliche Quantenausbeuten ϕ_D und ϕ_A besitzen, gilt:

$$I_D = \phi_D \eta_D N_D, \quad (3.2)$$

$$I_A = \phi_A \eta_A N_A. \quad (3.3)$$

Mit den angepassten Emissionsintensitäten konnte dann die korrigierte FRET-Effizienz berechnet werden. Setzt man die beiden letzteren Gleichungen in **Gl. 3.1** ein, so folgt daraus die FRET-Effizienz:

$$E = \frac{\frac{I_A}{\phi_A \eta_A}}{\frac{I_A}{\phi_A \eta_A} + \frac{I_D}{\phi_D \eta_D}} = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D}. \quad (3.4)$$

Mit

$$\gamma = \frac{\phi_A \eta_A}{\phi_D \eta_D} \quad (3.5)$$

erhält man nun einen Korrekturfaktor γ , der abhängig von der Messmethode bestimmt wird [157].

3.4.2 Messung an frei diffundierenden Molekülen

Eine Methode, die FRET-Effizienz der RS-Moleküle zu messen, ist die Pulsanalyse (*engl. burst analysis*). Bei dieser Methode werden die SAM-I-RS-Moleküle in RNS-Standardpuffer mit einer Konzentration von $\approx 0.1 - 1$ nM gelöst. Damit wird sichergestellt, dass nur einzelne Moleküle durch das Anregungsvolumen des Mikroskops, welches im Femtoliterbereich liegt, diffundieren. Die Diffusionszeit des SAM-I-RS durch das Anregungsvolumen liegt im Bereich von ≈ 1 ms. Beim Passieren des Anregungsvolumens erzeugen die Fluorophore eine große Anzahl an Photonen, welche im Detektor relativ zum Hintergrundsignal starke Signale (*engl. bursts*) erzeugen.

Um Signale von Hintergrundpulsen zu unterscheiden, definiert man ein Kriterium, das einen Grenzwert an detektierten Photonen N_{min} in einer bestimmten Messzeit, einem Bin, festlegt. Dieser Grenzwert sollte abhängig vom Hintergrund gewählt werden. Jeder Puls, welcher die minimale Anzahl an detektierten Photonen N_{min} überschreitet, wird als Signale gewertet. Ist die Diffusionszeit größer als die angesetzte Binbreite, so werden alle aufeinanderfolgenden Bins, in denen N_{min} überschritten wird, zum selben Puls, also zum selben Molekül, gezählt. Für FRET-Experimente, wie sie für diese Arbeit genutzt wurden, wurden dann bei alternierender Anregung mit einem 532 nm und einem 637 nm Laser die Photonenemission der beiden Farbstoffe Cy3 und Cy5 in zwei Kanälen, einem grünen Kanal (Cy3) und einem roten Kanal (Cy5), gemessen. Durch den FRET-Mechanismus werden während der 532 nm Anregungsdauer eines einzelnen Moleküls sowohl Photonen im grünen als auch im roten Kanal detektiert. Da die Photonenpulse der Einzelmolekülmessungen einem individuellen Molekül zugewiesen werden, wird die Gesamtintensität des Pulses durch Addition des grünen Pulssignals und des roten Pulssignals bestimmt. Da bei 637 nm Anregung nur die Photonen des Akzeptors relevant sind, wird nur das Pulssignal des roten Kanals zu einem Puls gezählt. Erfüllt die Anzahl der gemessenen Photonen eines Pulses das Grenzwertkriterium, mehr Photonen als den Grenzwert N_{min} zu besitzen, so wird dieser Puls zur weiteren Berechnung eines FRET-Effizienzwertes ausgewählt. Alle anderen Pulse werden verworfen.

Um den Grenzwert N_{min} sinnvoll zu wählen, mit welchem das Hintergrundrauschen vom relevanten Messsignal der Fluorophore getrennt wird, muss eine kontinuierliche Messung von Photonenintensitäten, eine sogenannte Intensitätstrajektorie, analysiert werden. Dafür wird die Anzahl der gezählten Photonen pro Zeitbin der Intensitätstrajektorie in einem Histogramm aufgetragen. Durch die starke Verdünnung der Probe bei Einzelmolekülmessungen dominieren die Beiträge des Hintergrundsignals im Histogramm. Das Hintergrundsignal setzt sich zusammen aus der Dunkelzählrate der Detektoren (Grundrauschen des Detektors ohne Lichteinstrahlung), Streulicht aus der Umgebung, autofluoreszierender Verunreinigung, die in die Probe gelangt ist, sowie dem Streulicht der Laseranregung, welches indirekt detektiert wird. Die Beiträge der einzelnen Hintergrundsignale sind zufällig und unabhängig voneinander, jedoch gleichmäßig verteilt. Die Wahrscheinlichkeit P , N Photonen innerhalb einer Zeitspanne δt zu erhalten, wird durch die Poisson-Verteilung beschrieben [130], mit

$$P(N) = \frac{\mu^N}{N!} e^{-\mu}. \quad (3.6)$$

Mit μ , dem Erwartungswert, bekommt man daraus den Mittelwert des Hintergrundsignals, welcher schließlich für jeden Detektionskanal bestimmt wird. Daraus ergibt sich ein sinnvoller Wert N_{min} , der ein Kriterium zur Entscheidung darstellt, wie hoch das Risiko ist, Hintergrundsignale fälschlicherweise als Fluoreszenzsignale zu zählen. Der Grenzwert des Hintergrundsignals wurde auf die Anzahl von Photonen pro Bin gesetzt, bei welcher die Poisson-Verteilung des Intensitätshistogramms auf 0,1 % gefallen war.

Da die Diffusion der Moleküle durch den Fokus ein stochastischer Prozess ist, schwimmen diese nicht gleichmäßig oder gerichtet, wodurch manche eine längere Zeit im Detektionsvolumen verbringen als andere. Die Folge ist keine diskrete Pulsgröße, sondern eine stochastische Verteilung, welche durch ein Histogramm visualisiert wird. Für die weitere Analyse der Daten wurden die Pulse ausgewählt, die eine ausreichend hohe Photonenzahl aufweisen. Aus diesen ausgewählten Pulsen wurde ein FRET-Effizienz-Histogramm erstellt, welches die Häufigkeit der aufgetretenen FRET-Effizienzwerte darstellt. Durch die Detektion der Fluoreszenzsignale beider Fluorophore in zwei unterschiedlichen Kanälen (APD₁ und APD₂, siehe **Abb. 3.1.1**) trägt unter anderem das Schrotrauschen in jedem Kanal zur Verbreiterung der FRET-Effizienzverteilung bei. Schrotrauschen bezeichnet die statistische Schwankung bei der Messung diskreter Teilchen, wie zum Beispiel Elektronen oder Photonen, und ist vor allem bei Messungen niedriger Teilchenzahlen relevant. Durch die Verwendung elektronischer Sensoren ist das auftretende Schrotrauschen unvermeidbar, wodurch diese statistisch auftretenden Fluktuationen immer zum eigentlichen Signal beitragen. Dieses Schrotrauschen definiert daher die minimal auftretende Standardabweichung der Verteilung eines FRET-Effizienzwertes. Die Standardabweichung von E durch Schrotrauschen σ_{SN} bestimmt sich zu [158]

$$\sigma_{SN} = \sqrt{\frac{E(1-E)}{N_{total}}}. \quad (3.7)$$

Mit N_{total} geht dabei die totale Anzahl der Photonen pro Puls ein, sodass die Standardabweichung der Verteilung der FRET-Effizienzen kleiner wird, wenn man nur solche Pulse aussucht, deren Photonenzahl ausreichend groß ist. Unter anderem durch die schon erwähnte Diffusion der Moleküle treten solche Pulse statistisch gesehen nicht besonders häufig auf. Somit muss man einen Kompromiss finden, welcher eine brauchbare Breite der Standardverteilung der FRET-Effizienzen ermöglicht und gleichzeitig eine akzeptable Statistik an FRET-Effizienzwerten in annehmbarer Zeit liefert [159]. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein Wert von $N_{min} = 50$ gewählt (siehe **Abb. 3.4.1**).

3.4.3 Alternierende Anregung

Um Faltungsdynamiken von Biomolekülen mittels FRET zu untersuchen und um gleichzeitig sicherzustellen, dass das FRET-Farbstoffpaar vollständig und intakt ist, implementierten Kapanidis et al. [152] 2004 die alternierende Laseranregung ALEX in ihr Mikroskop. Durch schnelles Schalten zwischen der Laseranregung des Donors und der des Akzeptors konnten für jedes einzelne Molekül (angewandt sowohl auf frei diffundierende als auch auf immobilisierte Moleküle) donor- und akzeptorabhängige Observablen aufgezeichnet werden. Laseranregung und Datenerfassung sind dabei synchronisiert, sodass

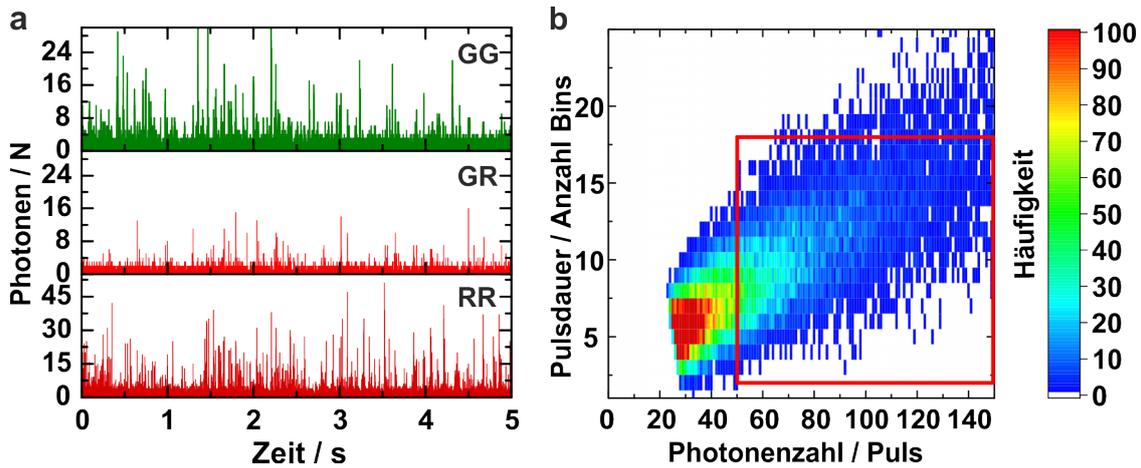


Abbildung 3.4.1: Selektion verwertbarer Pulse. (a) Die Anzahl der gemessenen Photonen N frei diffundierender SAM-I-Riboschalter werden durch Intensitätstrajektorien dargestellt, aufgetrennt nach den einzelnen Farbkanälen und ihrer Laseranregung. Die oberen beiden Tafeln zeigen das Donorsignal (GG, grün) und das Akzeptorsignal (GR, rot) bei 532 nm, also grüner Anregung. Die untere Tafel zeigt die Kontrolltrajektorie, roter Kanal bei 637 nm Anregung (RR, dunkelrot), die zur Bestimmung der Stöchiometrie nötig ist. (b) Die Pulsdauern (Anzahl der zum Puls zugehörigen Bins) werden über der summierten Photonenzahl eines Pulses aus den FRET-Kanälen GG und RG aufgetragen. Der rote Kasten markiert dabei die selektierten Pulse, welche für die weitere Analyse in Frage kommen.

jederzeit bekannt ist, welches Signal durch welche Anregung erzeugt wurde. In dieser Arbeit wurden Mikroskope benutzt, deren alternierende Anregung, unter Verwendung von Lasern in Dauerstrichbetrieb, durch AOTF-Module (siehe **Abb. 3.1.1, 3.1.3**) umgesetzt wurde. Somit konnte neben der FRET-Effizienz auch die abstandsunabhängige Donor-Akzeptor-Stöchiometrie, also dem Mengenverhältnis von donor- zu akzeptormarkierten Molekülen, gemessen werden. Jedoch kann ein Missverhältnis zwischen Donor- und Akzeptormolekülen durch zwei Mechanismen entstehen:

- Die chemische Synthese der farbstoffmarkierten Moleküle ist zwar effizient, aber nicht perfekt. So kann es vorkommen, dass manche Moleküle entweder nur mit einem Donor oder einem Akzeptor markiert wurden. Nur einfach markierte Moleküle vollständig aus der Probelösung herauszufiltern, ist jedoch nicht möglich.
- Da die Probe beim Lagern, bei der Probenpräparation oder während der Messung dem Umgebungslicht ausgesetzt ist, besteht die Möglichkeit, dass die Fluoreszenzfarbstoffe bleichen oder quenchen. Die Folge wäre eine Verfälschung der FRET-Effizienzpopulationen. Allerdings werden die beschädigten Moleküle digital herausgefiltert.

Die Donor-Akzeptor-Stöchiometrie berechnet sich, falls γ bekannt ist, nach

$$S = \frac{\gamma I_D + I_A}{\gamma I_D + I_A + I_A^{direct}}. \quad (3.8)$$

Dabei entspricht I_D und I_A jeweils der gemessenen Donor- und der Akzeptorintensität bei Donoranregung, und I_A^{direct} der gemessenen Akzeptorintensität bei Akzeptoranregung. Wie aus **Gl. 3.8** herauszulesen ist, entspricht die Stöchiometrie dem Verhältnis der Emissionsintensitäten von Donor und Akzeptor bei FRET-Messungen (Laseranregung des Donors) I_{Tot} zur gesamten Emissionsintensität eines ALEX-Beleuchtungszyklus (Donor-, gefolgt von Akzeptoranregung) $I_{Tot} + I_A^{direct}$. Mit

$$S = \frac{I_{Tot}}{I_{Tot} + I_A^{direct}} \quad (3.9)$$

bestimmt sich die Stöchiometrie aus den gemessenen Photonen der Fluoreszenzfarbstoffe. Da jedoch im Experiment die Detektionseffizienzen der Detektoren sowie die Quantenausbeute der Fluorophore mit und ohne FRET unterschiedlich sein können, muss die Anregungsleistung der jeweiligen Laserintensitäten so angepasst werden, dass die Anzahl der detektierten Photonen des Akzeptor- und des Donorfarbstoffes gleich groß sind. Stellt man folglich die Anregungsleistungen so ein, dass die Gesamtheit der detektierten Photonen im Donor- und im Akzeptorkanal bei Donoranregung gleich der Anzahl detektierter Photonen im Akzeptorkanal bei Akzeptoranregung ist, so nehmen alle doppelt markiert Moleküle einen Wert von $S \approx 0,5$ ein. Moleküle, welche zum Zeitpunkt der Messung eine reine Donoremission erzeugten, nehmen Werte von $S \approx 1$ an, und bei Molekülen mit reiner Akzeptoremission ergibt sich $S \approx 0$. Mit einem ES-Plot, in welchem die Stöchiometrie S über der FRET-Effizienz E aufgetragen wird, lassen sich alle Moleküle mit einem funktionierenden FRET-Paar zur weiteren Analyse aussortieren. Durch die sequentielle Vermessung der Farbstoffmoleküle mit ALEX werden die Farbstoffintensitäten I_{Tot} und I_A^{direct} nicht exakt zur selben Zeit bestimmt. Innerhalb dieser Zeitspanne kann sich durch den Einfluss photophysikalischer Effekte wie zum Beispiel Blinken das Emissionsverhalten der Farbstoffmoleküle verändern. Ebenso können sich die vermessenen diffundierenden Moleküle zu unterschiedlichen Zeiten in verschiedenen Zonen des Anregungs- beziehungsweise Detektionsvolumens des Mikroskopes befinden. Dies hat jeweils Einfluss auf die Anregungsintensität und die Detektionseffizienz der Farbstoffmoleküle. Folglich können die Pulsintensitäten zweier aufeinanderfolgender Pulse variieren, sodass eine Verbreiterung des Parameters S folgt [115, 159]. In dieser Arbeit wurden aus der Pulsanalyse alle Moleküle weiter verwendet, deren S -Werte innerhalb $0,3 \leq S \leq 0,8$ lagen. Werte oberhalb dieses Bereichs wurden als einzelnes Donorsignal gewertet und aussortiert. Da ein einzelnes Donorsignal eine FRET-Effizienz von $E \approx 0$ ergibt, findet man solche Populationen in einem typischen ES-Plot (zu sehen in **Abb. 3.4.2 a**, in der linken oberen Ecke). Gleiches gilt für Moleküle, deren S -Werte unterhalb des definierten Bereichs liegen, da sie als einzelnes Akzeptorsignal gewertet werden.

3.4.4 Berechnung des γ -Faktors mit Hilfe eines ES-Plots

Ist, wie im letzten Kapitel vorausgesetzt, der γ -Faktor nicht bekannt, so kann er mit Hilfe der ES-Plots im Mittel über alle Moleküle der Pulsanalyse bestimmt werden. Sind die Detektionseffizienzen des Donorfarbstoffes im Donorkanal und des Akzeptorfarbstoffes im Akzeptorkanal verschieden, so ist die Gesamtheit der gemessenen Photonen aus Donor-

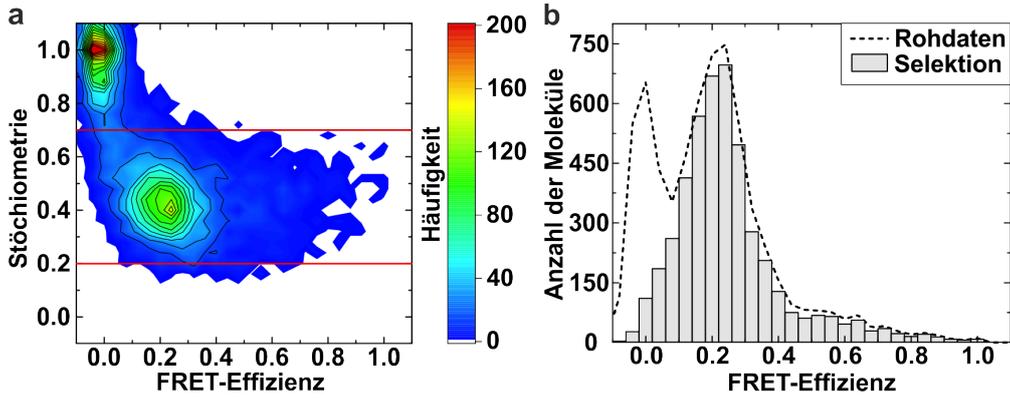


Abbildung 3.4.2: Selektion FRET-Paar-markierter Moleküle. (a) Dargestellt ist ein ES-Plot, in welchem die Stöchiometrie S über der FRET-Effizienz aufgetragen ist. Die Laseranregung wird so eingestellt, dass die detektierte Anzahl an Photonen von Donor- und Akzeptorfarbstoff (Cy3 und Cy5), falls sie nicht als FRET-Paar verbunden sind, vergleichbar ist. Moleküle mit einem funktionierenden FRET-Paar erscheinen im ES-Plot im Bereich zwischen $0,2 \leq S \leq 0,7$, markiert durch rote Linien. Der ES-Plot dient somit als effektives Mittel, einfach markierte Moleküle von den zu verwertenden doppelt markierten FRET-Paaren zu unterscheiden. (b) Gezeigt sind die selektierten FRET-Effizienzen in einem Histogramm. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt das unkorrigierte FRET-Histogramm.

und Akzeptorkanal I_{Tot} abhängig von der Verteilung der emittierten Photonen des FRET-Paares. Somit ist auch die Bestimmung der FRET-Effizienz abhängig von der Verteilung der detektierten Photonen.

Mit dem Korrekturfaktor γ wird die gemessene Donorintensität der des Akzeptors angepasst. $I_{Tot} = \gamma I_D + I_A$ ist dann unabhängig von der FRET-Effizienz wie folglich auch vom Stöchiometriefaktor S . In einem iterativen Prozess wird der γ -Faktor so lange variiert, bis die FRET-Populationen im ES-Plot den gleichen mittleren S -Wert annehmen.

Im Experiment werden durch die Photodetektoren zunächst die Emissionsintensitäten I_D und I_A gemessen. Diese Intensitäten bestimmen sich aus der Anzahl der emittierten Photonen N_D beziehungsweise N_A sowie aus der totalen Detektionseffizienz des jeweiligen Detektors Φ_D und Φ_A mit

$$I_{D/A} = \Phi_{D/A} N_{D/A}. \quad (3.10)$$

Setzt man die Intensitäten aus Gl. 3.10 in Gl. 3.9 ein, so erhält man:

$$S = \frac{\gamma \Phi_D N_D + \Phi_A N_A}{\gamma \Phi_D N_D + \Phi_A N_A + \Phi_A N_A^{direct}} = \frac{\gamma \frac{\Phi_D}{\Phi_A} N_D + N_A}{\gamma \frac{\Phi_D}{\Phi_A} N_D + N_A + N_A^{direct}}. \quad (3.11)$$

Die Korrekturfaktoren lassen sich für die spätere Betrachtung zusammenfassen zu [160]:

$$\sigma = \gamma \frac{\Phi_D}{\Phi_A}. \quad (3.12)$$

Die Abhängigkeit des Stöchiometriewertes von der FRET-Effizienz lässt sich folgendermaßen einführen: Die Anzahl der emittierten Photonen beim Donor ist abhängig von der Anregungsintensität des Lasers P_D und vom donoreigenen Extinktionskoeffizienten ϵ_D . In Anwesenheit eines Akzeptors gibt der Donor zudem einen Energieanteil $(1 - E)$ ab. Die Anzahl der emittierten Photonen des Akzeptors bestimmt sich somit aus der abgegebenen Energie des Donors:

$$N_D = (1 - E)\epsilon_D P_D, \quad (3.13)$$

$$N_A = E\epsilon_D P_D. \quad (3.14)$$

Setzt man **Gl. 3.13** in **Gl. 3.11** ein, bekommt man schließlich:

$$S = \frac{\{\sigma + (1 - \sigma)E\}\epsilon_D P_D}{\{\sigma + (1 - \sigma)E\}\epsilon_D P_D + \epsilon_A P_A}. \quad (3.15)$$

Dabei wurde zur Betrachtung der direkten Laseranregung des Akzeptors für N_A^{direct} die Anregungsleistung des Lasers zur Anregung des Akzeptors P_A , sowie der Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei direkter Anregung ϵ_A eingesetzt. Aus **Gl. 3.15** kann man ablesen, dass die Abhängigkeit der Stöchiometrie von der FRET-Effizienz dann verschwindet, wenn $\sigma = 1$ gilt. Bestimmt man den γ -Faktor folglich so, dass **Gl. 3.5** erfüllt wird, kann ein FRET-Effizienz-unabhängiger ES-Plot erstellt werden. Die Charakteristik eines FRET-Effizienz-unabhängigen ES-Plots zeichnet sich dadurch aus, dass die mittleren Stöchiometriewerte der einzelnen FRET-Populationen gleich sind mit Ausnahme der Population, welche nur ein Donorsignal besitzt. Bei der Auswertung der Daten werden mehrere ES-Plots mit variierenden γ -Faktoren geplottet. Der Wert des γ -Faktors, der eine Verteilung der FRET-Populationen im ES-Plot mit gleichbleibendem Stöchiometriewert erzeugt, wird als Korrekturfaktor angenommen [152, 160, 161].

3.4.5 Messung an immobilisierten Molekülen

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Faltung von Biomolekülen auf Basis von Einzelmolekülspektroskopie ist die Immobilisierung der Biomoleküle auf der Oberfläche eines Objekträgers. Der große Vorteil gegenüber der Messung an frei diffundierenden Molekülen ist die lange Beobachtungszeit eines einzelnen Moleküls. Bei frei diffundierenden Molekülen in wässriger Lösung ist die Vermessung struktureller Dynamik durch ihre kurze Aufenthaltsdauer im konfokalen Beobachtungsvolumen des Mikroskops auf ≈ 1 ms beschränkt. Bei immobilisierten Molekülen ist die Beobachtungszeit nur durch das unvermeidbare Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe limitiert. Daher ist die Vermessung der Faltungsdynamik sowohl für kurze als auch für lange Zeitabschnitte $\gg 1$ s möglich. Um nicht mehrere immobilisierte Moleküle gleichzeitig zu vermessen, muss die Konzentration der Probenmoleküle bei der Probenpräparation so eingestellt werden, dass der Abstand zweier Moleküle größer ist als die Breite der PSF [155]. Dazu wählt man Molekülkonzentrationen im Bereich von 10 - 100 pM [134]. Wie von Taekjip Ha 2001 vorgeschlagen [162], kommen dafür mehrere Methoden in Frage:

- Die einfachste Methode ist die Immobilisierung der Moleküle durch unspezifische Adsorption auf der Glasoberfläche. Dies kann jedoch das freie Falten der Molekülstruktur beeinflussen oder die Beweglichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe beeinträchtigen.
- Ebenso einfach in der Präparation ist die Immobilisierung in Acrylamid-Nanoporen oder in Agarosegel. Jedoch können dann keine Veränderungen der Pufferbedingungen, welche zur Untersuchung molekularer Dynamik unverzichtbar sind, durchgeführt werden.
- Durch spezifische Funktionalisierung der zu untersuchenden Moleküle durch Biotin können diese mit Hilfe von Streptavidin [162, 163] oder Neutravidin [164] als Zwischenbindeglied auf einer Oberfläche angedockt werden, die ebenso mit Biotinmolekülen versehen ist. Auf die Glasoberfläche kann entweder ein Gemisch aus BSA/BSA-Biotin oder biotinyliertem Polyethylenglycol (PEG) aufgetragen werden. Die Wahl der Oberflächenbeschichtung sollte so getroffen werden, dass sie nur minimalen Einfluss auf das Targetmolekül hat [155].

Eine ideale Oberfläche weist zumeist die Eigenschaft hoher Hydrophobizität und elektrischer Neutralität auf [165, 166]. Zur Beobachtung der Faltungsdynamik erwies sich nach qualitativen Tests (Daten nicht enthalten) die mit BSA/BSA-Biotin passivierte Oberfläche am geeignetsten, da die PEG-Oberfläche die freie Faltung des SAM-I-Riboschalters beeinträchtigt. Die SAM-I-RS wurden ebenso mit einem Biotin funktionalisiert (siehe **Kapitel 3.3**), sodass diese sich via Streptavidin an die biotinylierte BSA-Oberfläche binden konnten. Die Bindung von Biotin an Avidinmoleküle ist eine der stärksten bekannten, nicht kovalenten Bindungen [167] und eignet sich somit hervorragend Immobilisierung von Molekülen. Diese Art der Probenpräparation wurde deshalb für die Konfokal- und die TIRF-Mikroskopie in dieser Arbeit verwendet.

3.4.5.1 Datenerfassung am Konfokalmikroskop

Ein Datenerfassungsprogramm auf der Basis von C++, geschrieben von Dr. Andrei Kobitski, regelt die synchronisierte Ansteuerung der Laseranregung durch die AOTFs, die Photodetektoren und die Speicherung der Daten. Für jedes gemessene Molekül wird eine Datei erstellt, in welcher mit einem Datensampling von 100 μ s die gemessenen Photonennraten, aufgeteilt nach Detektionskanal und Anregungswellenlänge, gespeichert werden. Durch die Software wird der ALEX-Zyklus festgelegt. Die in dieser Arbeit erhobenen Einzelmolekülintensitätstrajektorien wurden mit einem ALEX-Zyklus erzeugt, der sich alle 100 μ s wiederholte. Der ALEX-Zyklus wurde spezifisch auf die Messmethode frei diffundierender bzw. immobilisierter Moleküle eingestellt.

ALEX-Zyklus für frei diffundierende Moleküle:

- 65 μ s mit 532 nm bei einer Leistung von 400 μ W (gemessen vor dem Objektiv)
- 5 μ s Pause (Umstellungszeit der AOTFs auf neue Wellenlänge)

3 Materialien und Methoden

- 25 μs mit 637 nm bei einer Leistung von 900 μW
- 5 μs Pause.

ALEX-Zyklus für immobilisierte Moleküle:

- 70 μs mit 532 nm bei einer Leistung von 6 μW (gemessen vor dem Objektiv)
- 5 μs Pause (Umstellungszeit der AOTFs auf neue Wellenlänge)
- 20 μs mit 637 nm bei einer Leistung von 2 μW
- 5 μs Pause.

Diese Daten wurden dann mit einer von Dr. Andrei Kobitski geschriebenen Analysesoftware weiterverarbeitet. Mit dieser Software konnte jedes Molekül einzeln untersucht werden, indem mit Hilfe eines Piezotisches jede zuvor detektierte Position eines Moleküls nach und nach angefahren werden konnte. Die gemessenen Intensitäten wurden wiederum, aufgeteilt nach Kanal und Anregungswellenlänge, aufgezeichnet. Das sind die sogenannten Intensitätstrajektorien (*engl. intensity time traces*). Zur Vermessung der mit Cy3 und Cy5 markierten SAM-I-RS-Moleküle wurden die Trajektorien im grünen Kanal (APD₂, Cy3) bei 532 nm Anregung (GG), im roten Kanal (APD₁, Cy5) bei 532 nm Anregung (GR) und im roten Kanal (APD₁, Cy5) bei 637 nm Anregung (RR), zur weiteren Analyse benutzt. Die beiden ersten Trajektorien wurden zur Berechnung der FRET-Effizienz verwendet. Die dritte Trajektorie diente als Kontrolle, um das Akzeptorbleichen zu detektieren.

Um die verrauschten Rohdaten besser visualisieren zu können, wurden 10 Intensitätswerte von je 100 μs Belichtungszeit zu einem 1 ms Bin zusammengefasst. Danach wurden manuell alle Moleküle zur weiteren Verwendung ausgewählt, die folgende Kriterien erfüllen:

- Anwesenheit beider Farbstoffe, das heißt Signaldetektion in den Kanälen GG und RR;
- Trajektorien mit wenig Blinken der Farbstoffe:
Beim Blinken unterscheidet man zwischen Donor- und Akzeptorblinken. Donorblinken erkennt man daran, dass bei Donoranregung das Donorsignal zwischen Untergrundsignal und dem erwarteten Signalniveau springt. Im Falle eines FRET-Übergangs zum Akzeptormolekül wechselt sich bei Donoranregung das Akzeptor- und Donorsignal gleichermaßen ab. Das Akzeptorsignal bei Akzeptoranregung bleibt dabei unverändert.
Akzeptorblinken zeigt sich im Donorkanal bei Donoranregung so, dass das Donorsignal zwischen zwei unterschiedlich hohen Signalstärken springt, während das Akzeptorsignal bei Donoranregung zwischen Rauschsignal und der erwarteten hohen Signalstärke springt. Im Akzeptorsignal bei Akzeptoranregung schaltet das Signal derweil zwischen den Zuständen „AUS“ und „AN“.

- Akzeptor- vor Donorbleichen, um eine individuelle Korrektur des γ -Faktors jedes einzelnen Moleküls zu ermöglichen, und zur Korrektur von spektralem Übersprechen von Cy3-Emission in den RR-Kanal;
- Donorbleichen zur Korrektur von Hintergrundsignal in den Kanälen GG, GR und RR.

Die selektierten Trajektorien wurden bezüglich Hintergrund, spektralem Übersprechen und γ -Faktor korrigiert. Schließlich wurden alle Trajektorien aussortiert, welche solche γ -Faktoren aufwiesen, die stark von denen der anderen abwichen. Ebenso wurden nur solche Trajektorien weiterverarbeitet, welche ein SNR von 5:1 oder besser hatten. Diese Trajektorien (Beispieltrajektorie siehe **Abb. 3.4.3**) wurden für die weitere Datenverarbeitung ausgewählt und gespeichert. Für die spezielle Kinetikanalyse der Trajektorien zur Ermittlung struktureller Dynamik kam die von Jun.-Prof. Dr. Bettina Keller entwickelte HMM-Analysesoftware zum Einsatz (siehe **Kapitel 2.6.2**). Damit wurden nur solche Trajektorien untersucht, welche durch den FRET-Mechanismus ein anti-korreliertes Verhalten zwischen Kanal GG und Kanal GR aufzeigen.

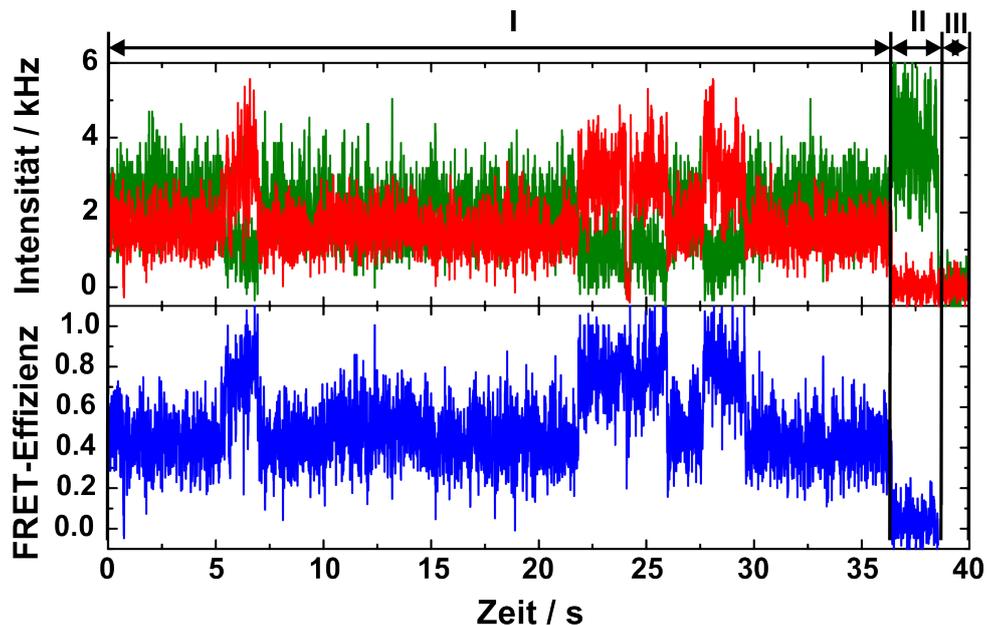


Abbildung 3.4.3: Trajektorien eines immobilisierten RS-Moleküls. In der oberen Tafel sind die Photonenzählraten des Donorkanals (grün, APD2, Cy3) und des Akzeptorkanals (rot, APD1, Cy5) eines mit einem FRET-Paar markierten, immobilisierten Moleküls bei 532 nm Anregung zu sehen. Die daraus berechnete FRET-Effizienz ist in blau in der unteren Tafel dargestellt. Der Bereich **I** zeigt Intensitätsfluktuationen bei Aktivität beider Farbstoffe, wobei der Bereich **II** die gemessene Intensität nach Akzeptorbleichen und Bereich **III** nach Donorbleichen markiert.

3.4.5.2 Datenerfassung am pTIRF-Mikroskop

Die Aufnahme der Bilder durch die EMCCD-Kamera wurde mit Hilfe der kameraeigenen Software Andor-Solis (Andor) getätigt. Damit wurde mit Hilfe des externen Triggermodus der Software das ALEX-Belichtungsschema durch den AOTF (Details siehe **Kapitel 3.1.2**) über eine NI-Karte (PCI-6713, National Instruments) mit der Kamera so synchronisiert, dass jedes Bild eindeutig einer einzigen Belichtung zuzuordnen war. Die Software zur Implementierung des ALEX-Schemas, also zur Ansteuerung des AOTF-Moduls, wurde durch eine gruppeneigene LabView-Software (LabView, National Instruments) verwirklicht. Die Belichtungszeit des EMCCD-Chips wurde dabei auf 100 ms bei einem Gain-Faktor (einem kamerainternen Verstärkungsfaktor) von 230 eingestellt. Zur Erstellung von FRET-Histogrammen wurden je 20 Bilder im ALEX-Modus aufgenommen. Die jeweiligen Laserleistungen wurden dabei auf 50 mW des 532 nm Lasers und 20 mW des 638 nm Lasers gestellt. Die Leistung wurde so gewählt, um das beste SNR bei gleichzeitig ausreichend langer Bleichstabilität der Fluorophore zu erhalten. Die weitere Datenverarbeitung der Kameravideos wurde durch eine frei verfügbare Analysesoftware „smCamera“ (<https://cplc.illinois.edu/software>) durchgeführt.

Wie in **Abb. 3.1.3** gezeigt, wurde die Abbildung der Probe durch einen Strahlteiler (DM₄) chromatisch in zwei Strahlengänge aufgetrennt. Durch einen Spiegel wurden die beiden Bilder nebeneinander auf demselben Kamerachip abgebildet. Somit erreichte man eine getrennte Beobachtung des Donor- und des Akzeptorkanals. Die Software smCamera besitzt die Fähigkeit, die so erfassten Daten auszuwerten. Dadurch, dass das Kamerabild in zwei Farbkanäle derselben Abbildung geteilt wurde, ordnete die Software zunächst die Koordinaten der identifizierten Moleküle im grünen und im roten Kanal einander zu. Das Programm bietet zur Detektion der Moleküle und deren Zuordnung über beide Farbkanäle zwei Optionen an. Mit der ersten Option wurden zunächst die Moleküle im Donorkanal bei Donoranregung identifiziert und deren Koordinaten auf der linken Chiphälfte bestimmt. Durch eine Transformation der Donorkoordinaten auf die rechte Chiphälfte wurden dann die Positionen der Akzeptormoleküle bestimmt. Die Intensitäten dieser Koordinaten bestimmen die Donor- und Akzeptortrajektorie eines FRET-Paar markierten Moleküls. Mit der zweiten Option geschieht das Gleiche, nur dass die detektierten Akzeptormoleküle bei Akzeptoranregung als Ausgangspunkt gewählt wurden. Im Falle der Verwendung eines ALEX-Anregungsschemas wurden immer die detektierten Akzeptormoleküle bei Akzeptoranregung zur Bestimmung der Molekülkoordinaten verwendet (Option 2). Dabei wurden alle Moleküle beachtet, welche mit einem Akzeptor markiert waren, unabhängig davon, ob ein Donorfarbstoff existierte. In der anschließenden Auswertung bei Donoranregung konnten dann durch das Setzen eines Schwellenwertes alle Moleküle zur weiteren Datenverarbeitung selektiert werden, welche zweifelsfrei durch ein FRET-Paar markiert waren. Die aufgenommenen Daten wurden von der Software smCamera zunächst durch Abzug des Hintergrundsignals korrigiert und dann gespeichert. Die weitere Datenanalyse erfolgte mit einer von Dr. Florian Stockmar erstellten, haus-eigenen Software Traceinspect (Version 1.07) [168, 169]. Diese Software ermöglicht eine halbautomatische Filterung der Daten, was bei einer Anzahl von mehreren Tausend gemessenen Molekülen von großem Vorteil ist. Durch das Erstellen eines Intensitätshistogramms bei Donoranregung, in welchem die Intensitäten der Moleküle aus Donor- und Akzeptorkanal addiert und dann nach Helligkeit histogrammiert werden, konnten durch

das Setzen eines Schwellenwertes alle Moleküle zur weiteren Verarbeitung ausgesucht werden, die ein FRET-Paar besitzen. Denn Moleküle, welche nur durch einen Akzeptorfarbstoff markiert sind und keinen Donorfarbstoff besitzen, emittieren bei Donoranregung kein Signal. Sie erzeugen somit eine Verteilung im Intensitätshistogramm bei niedrigen Zählraten.

Im Weiteren wurden alle ausgewählten Trajektorien einzeln durch die Traceinspect-Software begutachtet. Die Software ermöglicht durch Darstellung der Intensitätstrajektorien, getrennt nach Donor- und Akzeptorkanal, die Selektion aller Trajektorien, welche kein Blinken oder Bleichen während der Messung aufweisen. Diese händisch verlesenen Trajektorien wurden dann innerhalb der Software zu FRET-Histogrammen und ES-Plots weiterverarbeitet und abgespeichert.

3.5 Auswertung mit einem Hidden-Markov-Modell

Der HMM-Algorithmus von Jun.-Prof. Dr. Bettina Keller wurde in der Gruppe von Frank Noé [140, 170] speziell für die Analyse von FRET-Experimenten weiterentwickelt. Die dabei gemessene Photonenemission von Biomolekülen, welche mit einem FRET-Paar spezifisch markiert wurden, können damit in Modelle verschiedener Konformationsänderungen der Biomoleküle übersetzt werden.

3.5.1 Auf Photonenemission basierte Maximum-Likelihood-Schätzer

Um Photonenemissionsprozesse zu modellieren, eignen sich poissonartige Beobachtungswahrscheinlichkeiten, die zur Beschreibung der Photonentrajektorien, gemessen in Einzelmolekül-FRET-Experimenten, von Donor- und Akzeptormolekülen angesetzt werden [171–174]:

$$P(N_A, N_D) = \text{Pois}(k_A, N_A) * \text{Pois}(k_D, N_D). \quad (3.16)$$

Dabei beschreiben N_A und N_D die Anzahl an Akzeptor- und Donorphotonen, k_A und k_D die dazugehörigen Emissionsraten der Fluorophore. Ziel ist es, eine Likelihood-Funktion zu erstellen, welche die Anzahl der beobachteten Donor- und Akzeptorphotonen (N_D und N_A) innerhalb einer Zeitspanne δt mit entsprechendem Hintergrundsignal für Donor- und Akzeptorkanal charakterisiert. Folgende Annahmen sind zu beachten:

- Durch Laseranregung der FRET-Paar-markierten Moleküle wird pro Molekül eine Photonenemissionsrate beider Farbstoffe k_{mol} generiert.
- Die Wahrscheinlichkeit, dass durch FRET der Akzeptor Photonen emittiert und diese detektiert werden, wird durch die FRET-Effizienz E_{mess} beschrieben.
- Jeder gemessenen Photonentrajektorie ist eine Hintergrundsignalrate zuzuschreiben, $k_{A,bg}$ für den Akzeptorkanal und $k_{D,bg}$ für den Donorkanal.

Die Emissionsraten für D und A ergeben sich daher zu

$$k_A = E_{mess}k_{mol} + k_{A,bg}, \quad (3.17)$$

$$k_D = (1 - E_{mess})k_{mol} + k_{D,bg}. \quad (3.18)$$

Um die beobachteten Photonen N_D und N_A zu beschreiben, setzt sich daher die Likelihood-Funktion aus dem Produkt der Poisson-Prozesse zusammen [140]:

$$p_{AD}(N_A N_D) = \frac{k_A^{N_A}}{N_A!} e^{-N_A} \frac{k_D^{N_D}}{N_D!} e^{-N_D}. \quad (3.19)$$

3.5.2 Korrektur der FRET-Effizienzen des HMM

Eine grundlegende Annahme der bereitgestellten HMM-Analyse-Software ist, dass die Photonenemissionen der versteckten Zustände und die daraus resultierenden FRET-Effizienzen sich innerhalb eines Datensatzes nicht ändern. Ansonsten müsste angenommen werden, dass die gemessenen FRET-Effizienzen einzelner Zustände von Trajektorie zu Trajektorie, selbst innerhalb eines Datensatzes, schwanken. Die heutige Programmierung würde die schwankenden FRET-Effizienzwerte jedoch eigenen Zuständen zuweisen und somit ein verfälschtes Modell ausgeben. Die bereitgestellte HMM-Analyse kann daher weder einen trajektorien- noch einen zustandsabhängigen γ -Faktor korrigieren.

Deshalb wurden die erstellten HMM im Nachhinein jeweils durch einen kumulativen $\hat{\gamma}$ -Faktor korrigiert, um die korrekten FRET-Effizienzen der versteckten Zustände zu bestimmen. Der kumulative $\hat{\gamma}$ -Faktor berechnete sich aus dem Mittelwert der individuell bestimmten γ -Faktoren der einzelnen Trajektorien eines Datensatzes. Um die FRET-Effizienzen der einzelnen Zustände entsprechend korrigieren zu können, wird **Gl. 2.51**, unter Vernachlässigung anderer ratenbeeinflussender Effekte (Blinken, etc.), zunächst geschrieben als

$$E = \frac{k_A}{k_A + \gamma k_D}. \quad (3.20)$$

Da im Vorfeld der HMM-Analyse das trajektorienspezifische Hintergrundsignal bestimmt und entsprechend korrigiert wird, kann die **Gl. 3.17** abzüglich der Hintergrundfaktoren in **Gl. 3.20** eingesetzt werden, sodass

$$E = \frac{E_{mess}k_{mol}}{E_{mess}k_{mol} + \gamma(1 - E_{mess})k_{mol}} = \frac{E_{mess}}{E_{mess} + \gamma(1 - E_{mess})}. \quad (3.21)$$

Mit der FRET-Effizienz E findet man den korrigierten FRET-Effizienzwert eines Zustandes.

3.5.3 Auswertung und Validierung des HMM

Die Daten zur weiteren Analyse durchlief den in **Kapitel 3.4.5** beschriebenen Auswahlprozess. Zur weiteren Untersuchung schneller Faltungskinetiken mit Hilfe der HMM-

Analyse wurden aus einer Vielzahl gemessener Donor- und Akzeptortrajektorien der Einzelmolekül-FRET-Messungen von Riboschaltern diejenigen zur weiteren Analyse selektiert, deren Kreuzkorrelation von Donor- zu Akzeptorsignal eine Antikorrelation aufweisen. Solche negativen Amplituden geben das typische Verhalten zweier Moleküle wieder, welche über den FRET-Mechanismus miteinander Energie austauschen. Diese Fluktuationen entstehen entweder durch photophysikalische Effekte wie Blinken, oder durch Abstandsänderungen wie die Faltungsdynamik von Biomolekülen. Zur Unterscheidung der Beiträge dieser Effekte zur Antikorrelation werden normalerweise zusätzliche Analysen durch die Autokorrelation des Donorsignals in Abwesenheit des Akzeptorsignals, sowie des Akzeptorsignals bei reiner Akzeptoranregung durchgeführt. Dadurch werden die Zeiten der FRET-unabhängigen Effekte (Blinken, etc.) ermittelt [147].

Für die qualitative Auswertung der Intensitätstrajektorien in den hier präsentierten Experimenten wurden jedoch keine Autokorrelationen beachtet. Dafür wurden per händischer Auswahl nur die Teilstücke der Intensitätstrajektorien einer Kreuzkorrelationsanalyse unterworfen, welche frei von Blinken waren. Die Korrelationsanalyse der Einzelmolekültrajektorien wurde über eine Kreuzkorrelation $CC_{DA}(\tau)$ von normierten Donorintensitäten zu normierten Akzeptorintensitäten durchgeführt:

$$CC_{DA}(\tau) = \frac{\langle (I_D(t) - \langle I_D(t) \rangle) (I_A(t + \tau) - \langle I_A(t + \tau) \rangle) \rangle}{\langle I_D(t) \rangle \langle I_A(t + \tau) \rangle}. \quad (3.22)$$

Dabei beschreiben $I_D(t)$ und $I_A(t)$ jeweils die Intensitätstrajektorien des Donors und des Akzeptors eines FRET-markierten Moleküls. Die spitzen Klammern stellen die Mittelung über die Zeit dar. Der stochastische Prozess struktureller Konformationsänderungen von Biomolekülen, beobachtet mittels Konfokalmikroskopie, kann als stationär angenommen werden. Daher sind die zeitlichen Mittelwerte zeitunabhängig. Somit ist die Kreuzkorrelationsfunktion $CC_{DA}(\tau)$ nur abhängig von einem zeitlichen Verzögerungsparameter τ [175, 176]. Zur Sicherstellung, dass der FRET-Mechanismus einem einzelnen Molekül zuzuordnen ist und nicht einem Bindungszustand mehrerer Moleküle wurde zusätzlich darauf geachtet, dass nur solche Trajektorien ausgewählt wurden, welche nach mehreren Sekunden einen einzelnen Bleichschritt zuerst im Akzeptor- und dann im Donorkanal aufwiesen. Zur Vorbereitung der Daten für die HMM-Analysesoftware wurden die selektierten Trajektorien als Rohdaten zu einer 1ms Binbreite abgespeichert. Zusätzlich wurde eine Datei bereitgestellt, welche intensitätstrajektorienspezifisch die Grundniveaus der Hintergrundsignale auflistete. Die Bestimmung der Hintergrundsignale wurde mit der gruppeneigenen Einzelmolekülsoftware durchgeführt (siehe **Kapitel 3.4.5**) und getrennt nach Detektionskanal abgespeichert. Der Analyse-Algorithmus der Software besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten:

- 1) Für eine gewählte Anzahl von vorbestimmten versteckten Zuständen wurden zunächst 100 Modelle mit Zufallsparametern konstruiert. Diese wurden nur mit einer kleinen Anzahl an Iterationen mit dem Erwartungswertmaximierungs-Algorithmus optimiert.
- 2) Das Modell mit der höchsten Wahrscheinlichkeit, den Datensatz zu repräsentieren, wurde bis zur vollen Konvergenz optimiert.

- 3) Um die Reproduzierbarkeit eines Modells zu bestätigen, wurde der Prozess aus 1) und 2) 20 Mal wiederholt. Der Ansatz des gewählten heuristischen Kriteriums besagt, dass ein Modell als reproduzierbar gilt, wenn es in 20% aller Versuche auftritt. Die Modelle werden als identisch angesehen, wenn sich ihre Log-Likelihood-Werte um weniger als $\Delta\log L=10$ unterscheiden. Um dies besser sichtbar zu machen, wurden die Ergebnisse der einzelnen HMM, sortiert nach der Größe ihrer Log-Likelihood-Werte, in ein Diagramm übertragen. Innerhalb des Diagramms wurde ein Grenzwertbereich von $\Delta\log L=10$ gesetzt, dessen oberer Grenzwert sich aus dem HMM ergibt, welches den höchsten Log-Likelihood-Wert besitzt. Es müssen sich mindestens vier HMM innerhalb des Grenzwertbereichs befinden, damit ein Modell als reproduzierbar gilt (siehe **Abb. 3.5.1**).
- 4) Im nächsten Schritt wurden alle HMM, welche innerhalb des Grenzwertbereichs lagen, danach überprüft, ob sie dieselbe Definition an FRET-Zuständen besitzen. Somit kann sichergestellt werden, dass nicht komplett unterschiedliche Modelle gleicher Wahrscheinlichkeit existieren. Die Modelle wurden sowohl danach überprüft, ob sie eine vergleichbare Häufigkeit ihrer FRET-Zustände aufweisen, als auch danach, ob die Zustandslebensdauern vergleichbar sind. Dazu wurden die Zustände der einzelnen HMM in zwei Diagrammen verglichen. Im ersten Schritt wurden die Lebensdauern über der FRET-Effizienz der gefundenen HMM-Zustände in einem Punktediagramm aufgetragen (**Abb. 3.5.2 a**). Zustände, welche zum selben HMM gehören, wurden mit derselben Farbe eingezeichnet. Im zweiten Schritt wurde das gleiche mit einem Plot wiederholt, welcher die Zustandslebensdauern über der FRET-Effizienz veranschaulicht (**Abb. 3.5.2 b**). Waren die Ergebnisse wiederum vergleichbar, wurde das HMM weiter betrachtet, welches den höchsten Log-Likelihood-Wert besaß.
- 5) Falls ein Ergebnis reproduziert wurde, musste es zunächst validiert werden, sodass sichergestellt wurde, dass das Modell einem Markovprozess zuzuordnen ist. Dies bedeutet, dass die Verweildauer der Moleküle in jedem der versteckten Zustände, berechnet durch den Maximum-Likelihood-Pfad, einer Exponentialverteilung folgt, das heißt, dass die Besetzungswahrscheinlichkeit spezifischer Zustände zeitlich exponentiell abnimmt.
- 6) Ein weiterer Validierungsschritt ist der Vergleich einer simulierten Zustandsverteilung aus den HMM-Modelldaten mit den experimentellen Daten. Dabei wurden aus dem Maximum-Likelihood-Pfad Donor- und Akzeptorphotonentrajektorien erzeugt, wobei berücksichtigt wurde, dass die Emissionswahrscheinlichkeiten von Photonen der Farbstoffe einer Poisson-Verteilung folgen. Der Ratenparameter der Poisson-Verteilung, die Emissionsrate, ist zeitabhängig und wurde für einen versteckten Zustand zu jedem Zeitpunkt t , in Einbeziehung der Gesamtrate für Donor und Akzeptor, neu bestimmt. Aus diesen simulierten Intensitätstrajektorien für ein Donor- und ein Akzeptormolekül wurden schließlich FRET-Effizienzen bei zugrundeliegenden zeitlichen Binbreiten der Trajektorien von 10, 50 und 250 ms berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen.

- 7) Diese Schritte wurden durch die Variation der Anzahl der möglichen Zustände wiederholt. Schließlich wurde das Modell mit der höchsten Anzahl an HMM-Zuständen gewählt, dessen Zustände reproduzierbar sind und der Validierung standhalten. Die Dynamik der Faltung von RNS-Molekülen wird durch eine hierarchische Energielandschaft bestimmt. Dadurch beschreibt ein HMM ein System schnell ineinander übergehender benachbarter Zustände besser, wenn es diesen zwei unterschiedliche Zustände zuweist, anstatt die beiden in einem gemittelten Zustand zu vereinen. Zur weiteren Interpretation wurden diese Zustände dann kinetisch miteinander in einem sogenannten Cluster verknüpft (*engl. kinetic clustering method* [137]). Das ausgewählte und validierte HMM lieferte schließlich einen Satz an Molekülzuständen, welche durch ihre Population π , ihre Zustandslebensdauern τ und ihre FRET-Effizienz beschrieben werden. Die Übergänge zwischen den Zuständen ergeben sich aus der Übergangsmatrix \hat{T} mit seinen Eigenwerten λ . Diese Werte werden zur nachfolgenden Interpretation weiterverwendet.

3.5.4 Kinetische Verknüpfung der versteckten Zustände

Charakteristische Zeitskalen der Übergangszeiten zwischen den Zuständen werden durch eine Eigenwert/Eigenvektor-Analyse der Übergangsmatrix \hat{T} , bestehend aus den Übergangsraten der Zustände untereinander, berechnet. Jeder Eigenwert λ_i der Übergangsmatrix \hat{T} , mit Ausnahme von λ_1 , welche den stationären Zustand beschreibt, wird einem Übergang zwischen zwei bestimmten Zuständen oder Zustandsgruppen (kinetisches Cluster) zugeordnet. Die charakteristische Ausgleichszeit innerhalb eines Zustandsclusters berechnet sich schließlich durch

$$\tau_{eq_i}(\delta t) = -\frac{\delta t}{\ln(\lambda_i)}. \quad (3.23)$$

Dabei beschreibt δt die zeitliche Auflösung der zugrundeliegenden experimentellen Daten. Als Ergebnis dieser gegenseitigen Umwandlung der Zustände ineinander, reduziert sich die mehrdimensionale Energielandschaft auf einen dominierenden, eindimensionalen Faltungspfad des Moleküls. Die Cluster-Analyse gibt dabei die Faltungshierarchie und die dazugehörigen Übergangszeiten vor [137].

3.5.5 Berechnung der Differenzen der Gibbsschen freien Energie aus den HMM

Um eine vollständige Energielandschaft zu erzeugen, müssen neben der Übergangsdynamik der einzelnen Zustände auch deren Energieniveaus berechnet werden. Gemäß **Gl. 2.5** und **2.7** können aus den HMM die Differenzen der Gibbsschen freien Energie mit

$$\delta G_{i,R} = -k_B T \ln \left[\frac{\pi_i}{\pi_R} \right] \quad (3.24)$$

berechnet werden. Dazu muss zuvor ein Referenzzustand (Index R) ausgewählt werden, zu dem die Differenz der Gibbschen freie Energie jedes anderen Zustands (Index i) berechnet wird. Aus den einzelnen Gibbschen freien Energiedifferenzen eines HMM kann dann eine Energielandschaft erstellt werden. Eine solche Energielandschaft spielt eine zentrale Rolle für die Interpretation der Messergebnisse und trägt damit zum besseren Verständnis der Faltung von Riboschaltern bei.

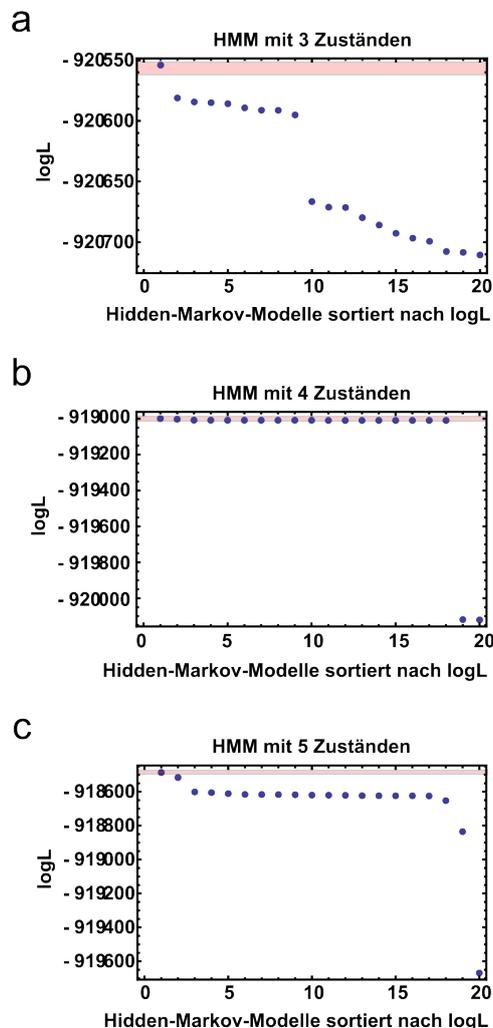


Abbildung 3.5.1: Reproduzierbarkeit der Hidden-Markov-Modelle. Am Beispiel des Datensatzes für das Konstrukt RS_{EA1} in Standardpuffer und 15 mM Mg^{2+} werden die Log-Likelihood-Ergebnisse (blaue Punkte) von (a) drei HMM-Zuständen, (b) vier HMM-Zuständen und (c) fünf HMM-Zuständen zu je 20 Durchläufen der HMM-Analyse gezeigt. Die Log-Likelihood-Werte sind auf den y-Achsen aufgetragen. Zur besseren Feststellung der Reproduzierbarkeit der HMM mit der höchsten Log-Likelihood ($\log L$) werden alle 20 Modelle, sortiert nach ihrem Wahrscheinlichkeitswert, auf der x-Achse aufgetragen. Der rötliche Bereich kennzeichnet das Grenzwertkriterium mit $\Delta \log L = 10$, innerhalb dessen alle HMM, ausgehend vom Zustand mit dem höchsten Log-Likelihood-Wert, liegen müssen, um als reproduziert zu gelten. Wie in diesem Beispiel zu sehen ist, findet sich nur für das HMM mit vier Zuständen eine eindeutige Reproduzierbarkeit.

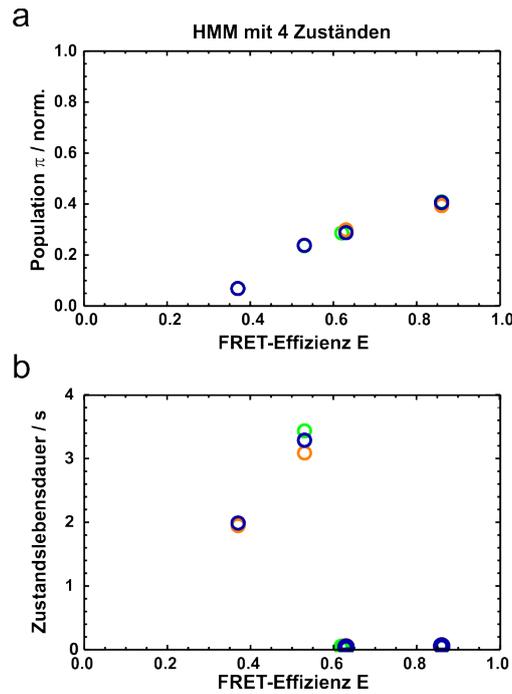


Abbildung 3.5.2: Überprüfung der Reproduzierbarkeit bezüglich Zustandshäufigkeit und Zustandslebensdauer. Die Überprüfung, ob die gefundenen HMM mit je vier Zuständen für das Konstrukt RS_{EA1} in Standardpuffer und 15 mM Mg^{2+} vergleichbare Zustandsdefinitionen liefern, geschieht in zwei Schritten: **(a)** Im ersten Schritt wird überprüft, ob die Zustände ähnlicher Log-Likelihood gleiche Populationsanteile π (y-Achse) zum selben FRET-Effizienzwert (x-Achse) liefern. **(b)** Im zweiten Schritt, gezeigt in werden zusätzlich die Zustandslebensdauern τ über der FRET-Effizienz aufgetragen.

3.6 Das empirische Hill-Modell

Als weit verbreiteter Ansatz zur Beschreibung von Bindungsreaktionen wird das Hill-Modell verwendet. Die Hill-Gleichung wurde ursprünglich entwickelt, um die kooperative Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin zu beschreiben, und wird seither eingesetzt, um die Bindung von Liganden an eine feste Anzahl von Bindungsstellen eines Proteins oder Enzyms zu modellieren [12, 177]. Die Hill-Gleichung setzt dafür ein Bindungsmodell voraus, in dem eine bestimmte Anzahl von N Liganden L nötig ist, damit eine funktionale Veränderung der Makromoleküle R mit N Bindungsstellen erzeugt wird:



Dabei entspricht k_1 dem Ratenkoeffizienten für Assoziation und k_{-1} dem Koeffizienten für Dissoziation, sodass im Reaktionsgleichgewicht die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden kann:

$$K_D = \frac{[R][L]^N}{[R(L)_N]} = \frac{k_{-1}}{k_1}. \quad (3.26)$$

Mit der Gesamtkonzentration an Makromolekülen $[R_0] = [R] + [R(L)_N]$ ergibt sich:

$$\frac{K_D}{[L]^N} = \frac{[R_0] - [R(L)_N]}{[R(L)_N]}. \quad (3.27)$$

Formt man **Gl. 3.27** um, so findet man das Verhältnis X von Makromolekülen mit voll besetzten Bindungsstellen zur Gesamtzahl aller Makromoleküle als:

$$\frac{\text{Gebunden}}{\text{Gesamt}} = \frac{[R(L)_N]}{[R_0]} = \frac{1}{1 + \frac{K_D}{[L]^N}} = X. \quad (3.28)$$

Die Annahme eines Bindungsmodells, in dem entweder keine oder alle Bindungsstellen mit Liganden besetzt sind, ist nur theoretisch (mit Ausnahme von $N = 1$), jedoch nicht physikalisch möglich [178]. Dies wäre nur mit einer unendlich hohen Bindungskoooperativität der Liganden an die Makromoleküle gegeben. Da die Zahl N experimentell nicht bestimmt werden kann, wählt man eine Konstante n_H , wodurch man die Hill-Gleichung erhält:

$$X = \frac{1}{1 + \left(\frac{K'_D}{[L]}\right)^{n_H}}. \quad (3.29)$$

Dabei entspricht n_H dem Hill-Koeffizienten, wobei dieser als Faktor für die Kooperativität der Bindung von Liganden interpretiert werden kann und nicht mit der stöchiometrischen Anzahl an gebundenen Liganden gleichzusetzen ist. Er bestimmt die Krümmung der Funktion. Der Faktor K'_D ist die sogenannte apparente Bindungskonstante mit

$$K'_D = \sqrt[n_H]{K_D}. \quad (3.30)$$

K'_D entspricht dabei der Ligandenkonzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren der Makromoleküle besetzt sind. Eine weitverbreitete Anwendung der Hill-Gleichung ist die zur Analyse von Mg^{2+} -induzierter Faltung von RNS. Dabei wird der empirische Hill-Koeffizient n_H entweder als die Anzahl an gebundenen Mg^{2+} -Ionen an die RNS interpretiert, die für die RNS-Faltung nötig ist, oder als das Maß für die kooperative Ionenbindung bei der Faltung in den nativen Zustand eines RNS-Moleküls [179].

In dieser Arbeit wurde die empirische Hill-Gleichung angewandt, um die Mg^{2+} -induzierter Faltung des SAM-I-Riboschalters zu analysieren, welche durch die Titrationsexperimente beobachtet werden konnten. Dazu wurde der Hill-Koeffizient jedoch nicht als stöchiometrischer Koeffizient interpretiert. Die passendere Bedeutung dieses Koeffizienten wird später im Ergebniskapitel 4.4.1 diskutiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Um die Faltung des SAM-I-Riboschalters zu untersuchen, wurden die drei verschiedenen FRET-Konstrukte RS_{AA} , RS_{EA1} und RS_{EA2} ausgewählt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der damit durchgeführten Experimente erläutert und diskutiert. Als Erstes wird die magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters von allen drei Konstrukten behandelt. Im Anschluss folgen Ausführungen zur SAM-abhängigen Faltung der beiden Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} . Das für RS_{AA} und RS_{EA1} gefundene Vierzustandsmodell konnte auf Grundlage weiterer Datensätze mit dem Konstrukt RS_{EA2} zu einem Fünfzustandsmodell erweitert werden. Schließlich wird zusätzlich die Faltung der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} in Abhängigkeit von SAH diskutiert, um die Funktionsweise des Riboschalters in Anwesenheit SAM-ähnlicher Moleküle besser zu verstehen.

4.1 Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters

Basierend auf früheren Erkenntnissen über die Sekundär- und Tertiärstruktur des SAM-I-RS [56,57], wurden in dieser Arbeit die Positionen der Farbstoffmoleküle so gewählt, dass strukturelle Veränderungen des SAM-I-Riboschalters mit Hilfe des FRET-Mechanismus deutlich beobachtet werden konnten. Durch die Messung der FRET-Effizienzen war es möglich, Aussagen über die liganden- und magnesiumionenabhängige Faltung eines vollständigen SAM-I-RS-Moleküls zu treffen. Um zum einen die Faltung der Aptamerdomäne in Anwesenheit der Expressionsplattform, und zum anderen die Faltung der Expressionsplattform auf die Aptamerdomäne zu untersuchen, wurden mehrere unterschiedliche Molekülkonstrukte synthetisiert, deren Farbstoffpaare an verschiedenen Positionen angebracht wurden (**Abb. 3.3.1**). Von diesen sechs zur Verfügung stehenden Proben wurden diejenigen ausgesucht, die eine per FRET deutlich messbare Moleküldynamik aufzeigten. Konstrukte, bei welchen kaum strukturelle Veränderungen durch Variation der Magnesiumionen- oder Ligandenkonzentration messbar waren, wurden nicht weiter verwendet. Somit wurden die Riboschalterkonstrukte II, III und VI aus **Tab. 3.1** (siehe **Kapitel 3.4**) ausgewählt, welche im Folgenden jeweils als RS_{AA} , RS_{EA1} und RS_{EA2} bezeichnet werden (**Abb. 4.1.1**).

Zur Untersuchung der Aptamerfaltung des vollständigen SAM-I-Riboschalters wurde ein Konstrukt synthetisiert, dessen Fluoreszenzmarker an der P1- und der P3-Helix angebracht wurden:

- RS_{AA} , mit Cy3 am Nukleotid U_{81} und Cy5 an U_8 .

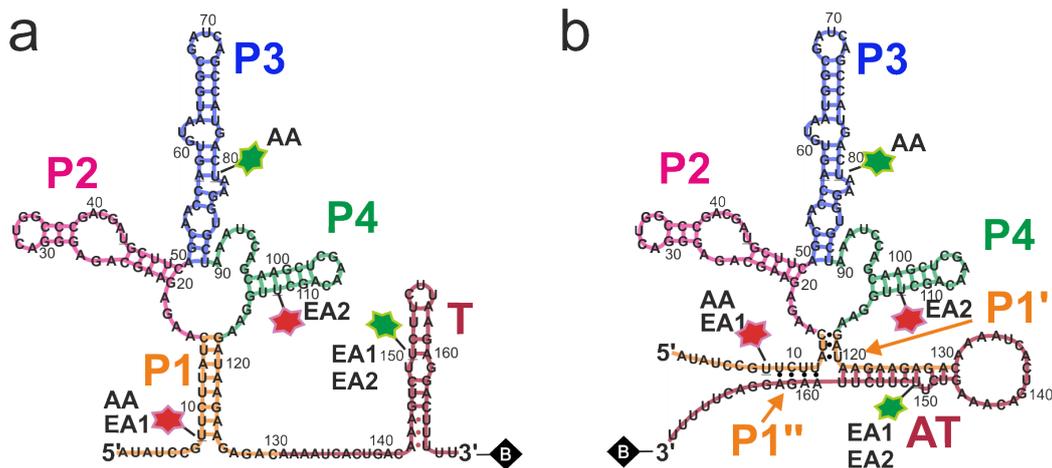


Abbildung 4.1.1: Verwendete FRET-Konstrukte des SAM-I-Riboschalters. Sekundärstrukturmodelle des *B. subtilis yitJ* SAM-I-Riboschalters, bestehend aus 169 Nucleinsäuren in der (a) Terminator- und (b) Antiterminator-Struktur. Die Helices des Aptamers sind P1 (orange), P2 (magenta), P3 (blau) und P4 (grün); die Expressionsplattform ist in dunkelrot dargestellt. Die Donor- (Cy3) und die Akzeptor- (Cy5) markierten Nucleinsäuren der drei verwendeten Konstrukte RS_{AA} , RS_{EA1} und RS_{EA2} sind jeweils mit einem grünen und einem roten Stern gekennzeichnet. Das 3'-Ende des SAM-I-Riboschalters ist mit einem Biotin (schwarze Raute) funktionalisiert.

Um die Konformationsänderungen zwischen der Aptamerdomäne und der Expressionsplattform zu untersuchen, wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt:

- RS_{EA1} , mit Cy3 am Nucleotid U_{150} und Cy5 an U_8
- RS_{EA2} , mit Cy3 am Nucleotid U_{150} und Cy5 an U_{112} .

Aus früheren Untersuchungen der Aptamerdomäne des SAM-I-Riboschalters ist bekannt, dass die Bindung von Mg^{2+} -Ionen einen strukturellen Kollaps der Molekülstruktur induziert [59, 60, 67]. Um die Auswirkungen von Mg^{2+} -Ionen auf die Konformationen des vollständigen SAM-I-RS zu erforschen, wurde hier sowohl die Fluoreszenzemission von frei diffundierenden SAM-I-RS-Molekülen mit Hilfe der Burst-Analyse (**Kapitel 3.4.2**), als auch von immobilisierten SAM-I-RS-Molekülen (**Kapitel 3.4.5**) auf Einzelmolekülniveau in zwei Detektionskanälen (Donor- und Akzeptorkanal, **Abb. 3.1.1, 3.1.3**) gemessen. Die Titrationsexperimente deckten einen großen Bereich von Mg^{2+} -Konzentrationen (0 – 100 mM) ab. Von mehreren tausenden RS-Molekülen für jede Pufferbedingung wurden die Donor- und Akzeptoremissionen in Abhängigkeit der entsprechenden Mg^{2+} -Konzentration gemessen, daraus die FRET-Effizienzen berechnet und in FRET-Histogrammen zusammengefasst. Die Moleküle wurden in FRET-Effizienzintervallen mit einer Binbreite von 0,04 zusammengefasst und die Anzahl über der FRET-Effizienz aufgetragen. In den folgenden Kapiteln werden die Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente der Konstrukte RS_{AA} , RS_{EA1} und RS_{EA2} gezeigt und diskutiert. Die genaue Datenbasis ist in **Tab. B.1** im Anhang zu finden.

4.1.1 Ausschluss von Oberflächeneffekten

Um mögliche Oberflächeneffekte auszuschließen, welche die freie Faltung der Probenmoleküle beeinträchtigen könnten, wurden zusätzliche Kontrollexperimente an immobilisierten RS_{AA} -Molekülen durchgeführt. Ein solches Experiment ist äußerst wichtig, um sicherzustellen, dass die Proben durch ihre Lagerung nicht degradiert sind und um Fehlinterpretationen des Faltungszustands und des Faltungsverhaltens zu vermeiden. Dazu wurde die Glasoberfläche des Probenhalters, gezeigt in **Abb. 3.3.2 a**, durch die Funktionalisierung mit BSA/Biotin-BSA passiviert. Für das Kontrollexperiment wurden SAM-I-RS-Moleküle des Konstrukts RS_{AA} gemäß **Protokoll A.4** mit Streptavidin an der BSA/Biotin-BSA-Oberfläche immobilisiert. Dann wurden dieselben Moleküle bei abwechselnd hoher und niedriger Magnesiumionenkonzentration vermessen. Den Lösungen unterschiedlicher Magnesiumionenkonzentration wurden das in **Kapitel 3.2.1** beschriebene Redox- und das sauerstoffzehrende System beigelegt, um das Bleichen und Blinken der fluoreszenten Proben zu minimieren. Das SAM-I-RS-Konstrukt RS_{AA} eignet sich in mehrfacher Hinsicht gut für dieses Kontrollexperiment. Zum einen ist die Aptamerstruktur des Riboschalters bekannt und wurde schon eingehend mit FRET-Experimenten untersucht. Somit kann selbst im Vergleich zum unvollständigen Riboschalter eingeschätzt werden, ob das globale Faltungsverhalten der Molekülstruktur sinnvoll erscheint. Heppell et al. [60] stellten innerhalb ihrer Titrationsexperimente mit Mg^{2+} -Ionen fest, dass bei Magnesiumionenkonzentrationen im Nanomolarbereich Populationen niedriger FRET-Effizienzen vorherrschen. Bei Magnesiumionenkonzentrationen im höheren Millimolarbereich dominieren Konformationen, welche sich durch hohe FRET-Effizienzen auszeichnen. Zum anderen eignet sich das Konstrukt RS_{AA} auch, um festzustellen, ob sowohl die Aptamerdomäne als auch die Expressionsplattform frei falten konnten. Zwar besitzt RS_{AA} keinen Farbstoff an der Expressionsplattform, jedoch kann eine vollständige Ausbildung der Bindungstasche im Aptamer nicht stattfinden, wenn die Expressionsplattform durch Oberflächeneffekte in ihrer Faltung behindert wird. Da die Expressionsplattform mit der Aptamerdomäne über die P1-Helix verknüpft ist, kann eine freie Faltung des Aptamers auch nur mit einer freien, ungestörten Expressionsplattform geschehen. Folglich könnte man die erwarteten strukturellen Veränderungen über FRET nicht messen, wären die Molekülstrukturen durch äußere Einflüsse in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Also zeichnet sich eine genügende Passivierung dadurch aus, dass unter Variation der Pufferbedingungen, welche die Faltung des Moleküls beeinflussen, immer wieder dieselben Populationen an Konformationen reproduziert werden können. Im Falle von RNS-Molekülen kann dies mit der Variation der Magnesiumionenkonzentration im Puffer getestet werden. Die Ergebnisse des Experiments sind in **Abb. 4.1.2** zusammengefasst.

Der Probenhalter (**Abb. 3.3.2 a**) wurde auf dem Mikroskopisch des Prisma-TIRF-Mikroskops (**Abb. 3.1.3**) befestigt, sodass immer dieselbe Stelle mit denselben Molekülen beobachtet werden konnte. Nach jeder Messung wurde mit Hilfe einer Pipette (Eppendorf) mehrfach die Probenkammer mit frischem Puffer einer anderen Magnesiumionenkonzentration durchgespült, um sicherzustellen, dass die gewünschte Magnesiumionenkonzentration eingestellt wurde. Dabei wurden abwechselnd 100 mM, 0,001 mM, 100 mM und 0 mM Mg^{2+} (letzteres durch Zugabe von 50 mM EDTA) getestet. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ist ein Chelatkomplex, welcher divalente Ionen bindet. Sie wurde hier

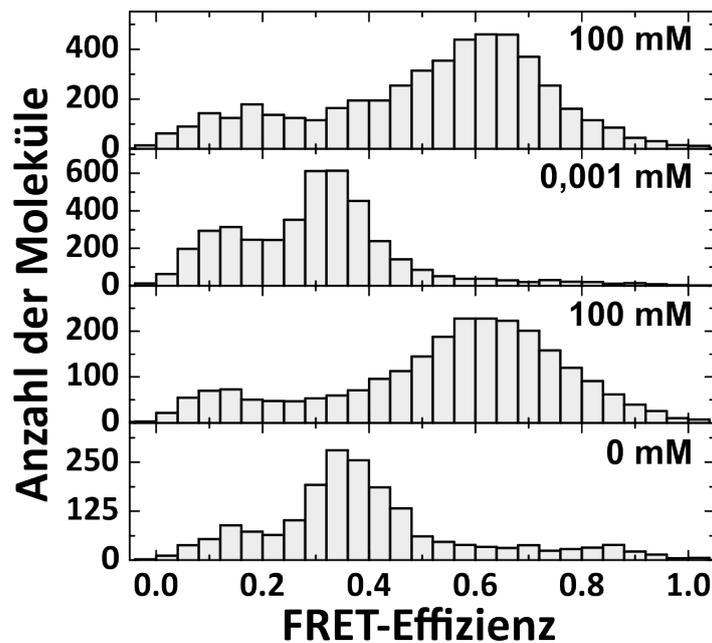


Abbildung 4.1.2: Kontrollmessung von möglichen Oberflächeneffekten. Einzelmolekül-FRET-Histogramme von immobilisierten Molekülen des SAM-IRS-Konstrukts RS_{AA} unter abwechselnd niedriger (0,001 mM Mg^{2+} und 0 mM Mg^{2+} mit 50 mM EDTA) und hoher (100 mM Mg^{2+}) Magnesiumionenkonzentration. Die Daten der Histogramme wurden jeweils von denselben Molekülen erhoben.

verwendet, um restliche Magnesiumionen zu entfernen. Beginnend mit einer Konzentration von 100 mM Mg^{2+} -Ionen, konnte wie erwartet eine kleine Population bei niedrigen FRET-Effizienzen mit $\langle E \rangle \approx 0,1$ und eine dominierende Population bei $\langle E \rangle \approx 0,6$ gemessen werden. Folglich befand sich der Großteil der Riboschalter in einer kompakten strukturellen Konformation. Nach gründlichem Spülen der Probenkammer mit einer Lösung, deren Magnesiumionenkonzentration 0,001 mM betrug, konnte eine deutliche Verschiebung der Populationen zu niedrigeren FRET-Werten beobachtet werden. Im Histogramm sind zwei Populationen mit jeweils $\langle E \rangle \approx 0,1$ und $\langle E \rangle \approx 0,3$ zu erkennen. Unter fehlendem Einfluss der Ionenstärke konnten sich die Riboschalter in eine Art offene Struktur falten. Der Vorgang der Zugabe von hoher zu abwechselnd niedriger Magnesiumionenkonzentration wurde wiederholt. Da wieder vergleichbare Populationen bei sich entsprechenden Magnesiumionenkonzentrationen reproduziert werden konnten, kann man davon ausgehen, dass eine freie Faltung der Riboschalter bei einer solch passivierten Oberfläche funktioniert. Jedoch erkennt man, dass in der Wiederholung die abklingende Schulter der Population hoher FRET-Effizienz im Vergleich zur ersten Messung etwas weniger stark abfällt. Ebenso erkennt man, dass bei einer Konzentration von 0 mM Mg^{2+} die Population hoher FRET-Effizienzen nicht völlig verschwindet. Dies deutet darauf hin, dass Oberflächeneffekte zwar nicht völlig auszuschließen sind, aber eine vernachlässigbare Rolle spielen. Der kleine Verlust an Molekülen pro Durchgang ist dadurch zu rechtfertigen, dass zum einen durch Bleichen und zum anderen durch Ablösen der Moleküle durch das Spülen weniger Moleküle zur Statistik beitragen als in der Messung davor.

4.1.2 Magnesiumionenabhängige Faltung des Konstrukts RS_{AA}

Nach dem Überprüfen der passivierten Oberfläche konnten nun Titrationsexperimente des Konstrukts RS_{AA} an immobilisierten Molekülen unter dem TIRF-Mikroskop durchgeführt werden. Da nur eine begrenzte Menge dieses Konstrukts zur Verfügung stand, konnten keine Messungen an frei diffundierenden Molekülen mit Hilfe des Burst-Analyseverfahrens realisiert werden. Während das Messverfahren an frei diffundierenden Molekülen Konzentrationen im Bereich von ≈ 100 pM benötigt, um in angemessener Zeit eine genügende Statistik zu erzeugen, sind für Messungen an immobilisierten Proben nur ≈ 10 pM nötig. Für diese Experimente wurde die Glasoberfläche des Probenhalters entsprechend dem **Protokoll A.4** präpariert. Den Probelösungen wurde wieder das entsprechende Redox- und sauerstoffzehrende System beigefügt. Um das hier untersuchte vollständige SAM-I-Riboschaltermolekül in den Kontext der bisherigen Ergebnisse am alleinigen Aptamer zu stellen, betrachtet man zunächst die magnesiumionenabhängige Faltung des RS_{AA} -Konstrukts (beide FRET-Labels sind am Aptamer angebracht). In Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen können zwei Populationen unterschieden werden (**Abb. 4.1.3 a**). Eine kleinere Population bei niedrigen FRET-Effizienzwerten um $\langle E \rangle \approx 0,1$ und eine größere Population bei $\langle E \rangle \approx 0,3$. Die Population mit $\langle E \rangle \approx 0,3$ wird bei steigender Mg^{2+} -Ionenkonzentration deutlich zu höheren FRET-Effizienzen verschoben. Bei einer Konzentration von 100 mM Mg^{2+} verschiebt sich diese Population auf einen FRET-Effizienzwert von $\langle E \rangle \approx 0,6$, was einem Abstand von $R \approx 49$ Å zwischen den Fluoreszenzmarkern entspricht. Diese signifikante Verkürzung des Donor-Akzeptor-Abstandes kann somit als strukturelle Verdichtung der Aptamerstruktur interpretiert werden (**Abb. 4.1.3 b**).

Wie in **Abb. 4.1.3 b** gezeigt, kann die Verschiebung der Population von $\langle E \rangle \approx 0,3$ zu $\langle E \rangle \approx 0,6$ als Faltung von einer offenen Aptamerstruktur Apt_U zu einer geschlossenen Struktur Apt_F interpretiert werden. Eine derartige Verdichtung der Molekülstruktur des Aptamers konnte bereits in einer vorangehenden Einzelmolekül-FRET-Studie bezüglich dem *Bacillus subtilis metI* SAM-I Aptamer-molekül (ohne Expressionsplattform) beobachtet werden, auch wenn einige Unterschiede festgestellt wurden. Diese werden im Folgenden näher erläutert [60].

Heppell et al. [60] untersuchten die magnesiumionen- und ligandenabhängige Faltung der alleinigen Aptamerdomäne eines SAM-I-Riboschalters mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Experimenten an immobilisierten Molekülen. Bei der Durchführung einer Mg^{2+} -Titrationsserie beobachteten sie in Abwesenheit von Magnesiumionen eine breite Population bei $\langle E \rangle \approx 0,3$. Durch sukzessive Erhöhung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration beobachteten sie eine leichte Verschiebung der Peak-Position dieser Population zu $\langle E \rangle \approx 0,4$ und eine zunehmende Population bei $\langle E \rangle \approx 0,7$. Sie interpretierten dies als Faltung, beginnend von einer ungefalteten Molekülstruktur mit $\langle E \rangle \approx 0,3$ (bei niedriger Mg^{2+} -Ionenkonzentration) hin zu einer vorgeformten Bindungstasche des Aptamers mit $\langle E \rangle \approx 0,4$ (bei hoher Mg^{2+} -Ionenkonzentration). Heppell et al. [60] ordneten durch die darauffolgenden Titrationsexperimente mit steigender Konzentration des Liganden SAM die Population $\langle E \rangle \approx 0,7$ dem ligandengebundenen Zustand zu, da mit sukzessiver Erhöhung der SAM-Konzentration diese Population dominierte.

Im Gegensatz zu den Experimenten eines vollständigen Riboschalters, wie sie in dieser Arbeit präsentiert werden, konnten Heppell et al. [60] keine Population bei FRET-Effizi-

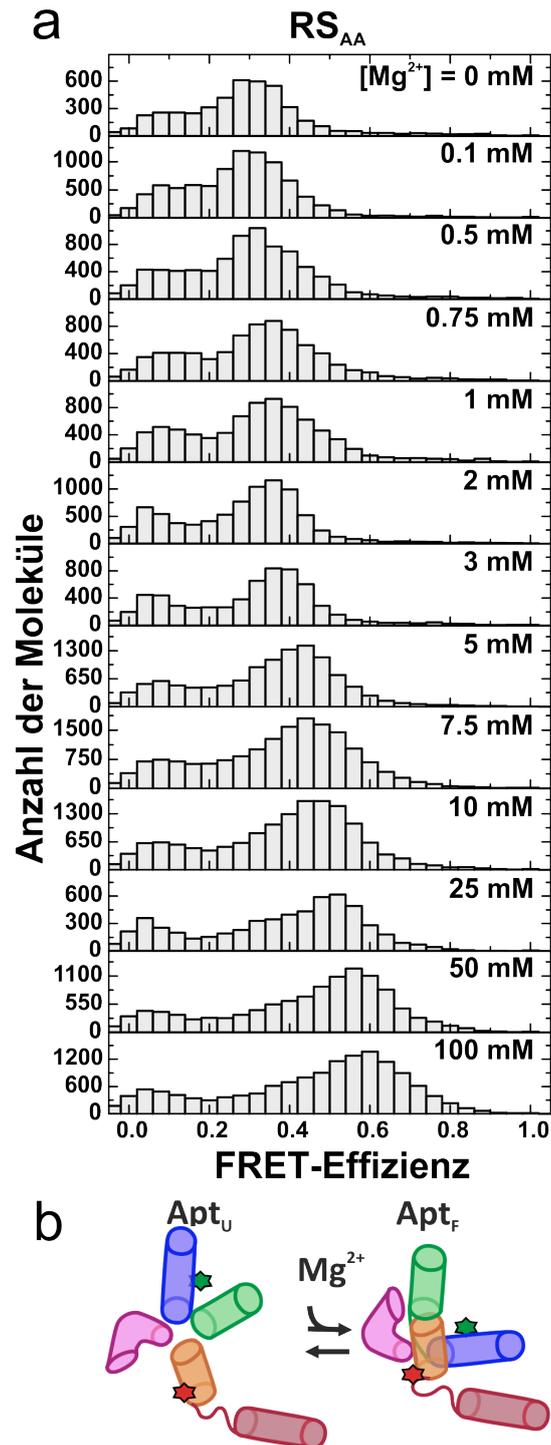


Abbildung 4.1.3: Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters. (a) Vollständige Messreihe mit RS_{AA} von 0 – 100 mM Mg^{2+} . (b) Schematische Darstellung der strukturellen Änderungen: Die magnesiumioneninduzierte Faltung des Konstrukts RS_{AA} erzeugt eine Verschiebung der Hauptverteilung zu höheren FRET-Effizienzen, die mit der Faltung der Aptamerstruktur von der offenen Apt_U - zur geschlossenen Apt_F -Konformation begründet werden kann.

enzen um $\langle E \rangle \approx 0,1$ messen. Dieser Unterschied ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Expressionsplattform Einfluss auf die Faltung der Aptamerdomäne nimmt. Für den vollständigen RS beobachtet man eine Population bei niedrigen FRET-Effizienzwerten mit $\langle E \rangle \approx 0,1$, was einem D-A-Abstand von $R = 76 \text{ \AA}$ entspricht, die selbst bei hohen Magnesiumionenkonzentrationen (**Abb. 4.1.3 a**) nicht verschwindet. Vermutlich induziert Mg^{2+} -Ionen eine strukturelle Verkleinerung des Aptamers, die mit einem Wechsel der T-Struktur zur AT-Struktur einhergeht (**Abb. 4.1.3 b**) [67, 180]. Dieser Wechsel benötigt eine teilweise bis komplette Auftrennung aller Watson-Crick-Basenpaare der P1-Helix. Solche strukturellen Veränderungen der Sekundärstruktur der RNS-Moleküle laufen nicht in einem Schritt ab, sondern durchlaufen einen Faltungsprozess, der durch ein Ensemble von semi-stabilen Intermediärzuständen dargestellt werden kann. Die Auftrennung wird eingeleitet durch eine konkurrierende Watson-Crick-Basenpaarung mit einem Teil der AT-Haarnadelstruktur. Diese Faltungszustände mit einer mindestens teilweise geöffneten P1-Helix erzeugen beim Konstrukt RS_{AA} größere Donor-Akzeptorabstände. Daher werden Zustände niedriger FRET-Effizienz gemessen, selbst bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen.

4.1.3 Magnesiumionenabhängige Faltung des Konstrukts RS_{EA1}

Zur Datenanalyse und Dateninterpretation für diese Arbeit wurden Burst-Messungen an frei diffundierenden Molekülen der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} , von A. Kobitski am Konfokalmikroskop (**Abb. 3.1.1**) durchgeführt, weiter verwendet. Es sei hier noch erwähnt, dass zwischen den Messungen von A. Kobitski und den selbst gemessenen Einzelmolekülintensitäten der Langpassfilter F_5 (siehe **Abb. 3.1.1**) ersetzt werden musste. In A. Kobitskis Messungen wurde außerdem ein Emissionsfilter (emitter Cy3/Cy5, AHF) verwendet, wohingegen die Vermessung der Moleküle in dieser Arbeit Probenhalter (siehe **Abb. 3.3.2 b**) verwendet wurden. Die detaillierten Beschreibungen beider Messmethoden finden sich in **Kapitel 3.4**.

Für die Datenanalyse in dieser Arbeit mussten die gemessenen Daten von A. Kobitski bezüglich der FRET-Effizienzwerte reskaliert werden. Im Vergleich der Histogramme von Messungen an frei diffundierenden und immobilisierten Molekülen bei vergleichbaren Ionen- und Ligandenkonzentrationen konnte eine globale Verschiebung der Histogramme der frei diffundierenden Moleküle von $\Delta E \approx 0,1$ festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung der Auswertestrategie der Daten konnte festgestellt werden, dass zur Korrektur der FRET-Effizienzen eine ES-Karte verwendet wurde. Diese Methode der iterativen Anpassung ist bei den vorliegenden Daten jedoch kritisch zu bewerten. Diese Methode liefert nur bei Histogrammen, welche eine diskrete Verteilung von zwei bis maximal drei Zuständen zeigen, eine ungefähre Abschätzung eines γ -Faktors. Zudem ist diese Art der γ -Faktorbestimmung nur kumulativ. Die Histogramme welche in dieser Arbeit hinzugezogen wurden, zeigen jedoch entweder nur einzelne oder sehr breite, strukturelose Zustandsverteilungen, sodass eine eindeutige γ -Faktorbestimmung kaum möglich ist. Da innerhalb dieser Arbeit auch immobilisierte Moleküle unter zum Teil vergleichbaren Pufferbedingungen gemessen wurden, deren Einzelmolekültrajektorien individuell mit dem γ -Faktor korrigiert wurden, konnten präziser bestimmte FRET-Effizienzhistogramme erstellt werden. Diese konnten dann als Referenz für die Verteilung der Histogramme der frei diffundierenden Moleküle herangezogen werden. Daher wurden die γ -Faktoren zur Korrektur

4 Ergebnisse und Diskussion

der FRET-Effizienzen der Messungen an frei diffundierenden Molekülen auf einen Wert von $\gamma = 1$ reskaliert, um die Zustandsverteilungen der Histogramme aufeinander anzupassen. Da die untersuchten Moleküle aus den Experimenten an frei diffundierenden und immobilisierten Molekülen aus derselben Charge stammen und unter vergleichbaren Präparationsschritten bis zur Einbringung in den Objektträger verarbeitet wurden, können die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden als vergleichbar angesehen werden.

Im nächsten Schritt kann die magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters zwischen Aptamer und Expressionsplattform betrachtet werden (siehe **Abb. 4.1.4**). Die

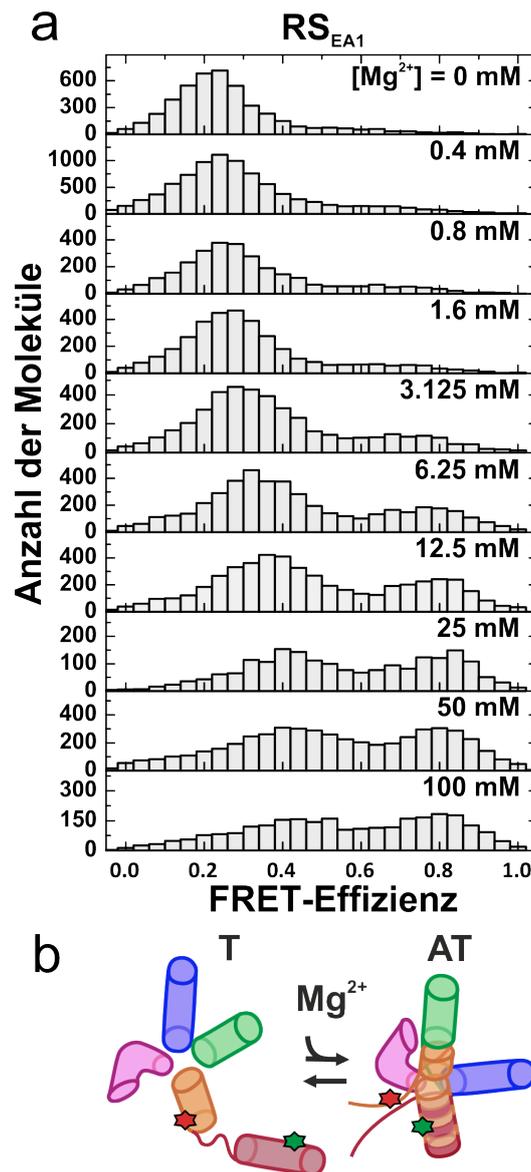


Abbildung 4.1.4: Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters. (a) RS_{EA1} mit der vollständigen Titrationsreihe von 0 – 100 mM Mg^{2+} . **(b)** Schematische Darstellung der strukturellen Änderungen: Die magnesiumioneninduzierte Faltung beim RS_{EA1} -Konstrukt zeigt die Verschiebung der anfangs stark populierten T-Struktur nach AT durch sukzessive Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration.

FRET-Histogramme des RS_{EA1} -Konstrukts, mit dem Donormarker an der Expressionsplattform und dem Akzeptormarker an der P1-Helix des Aptamers, sind in **Abb. 4.1.4 a** gezeigt. Bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen, unter welchen angenommen wird, dass der SAM-I-RS die T-Struktur einnimmt [67], findet man eine vorherrschende Population bei niedrigen FRET-Effizienzwerten mit $\langle E \rangle \approx 0,2$, was einem Abstand von $R = 67 \text{ \AA}$ entspricht. Diese Population besitzt den größten gemessenen Abstand zwischen beiden Farbstoffmolekülen. Folglich könnte diese Population eine Struktur mit einer zum Aptamer exponierten Expressionsplattform besitzen. Dies weist darauf hin, dass die Expressionsplattform eine Haarnadel-Struktur eingenommen hat, welche durch einen flexiblen RNS-Einzelstrang mit der P1-Helix verbunden ist (**Abb. 4.1.4 b**). Mit steigender Mg^{2+} -Konzentration erscheint eine weitere FRET-Effizienz-Population bei $\langle E \rangle \approx 0,6$. Eine solche Abstandsverkürzung deutet darauf hin, dass sich ein Teilstrang der Expressionsplattform mit der Aptamerdomäne verbunden haben muss. Hier sei nochmals daran erinnert, dass die sogenannte Schaltsequenz je nach Sekundärstruktur Teil der T- oder Teil der AT-Helix ist (siehe **Abb. 2.2.1**).

Boyapati et al. [68] ordneten diese kompakte Tertiärstruktur dem AT zu. Die AT-Haarnadelstruktur könnte dabei auf einer teilweise ausgebildeten P1-Helix gestapelt sein. Diese Struktur ergibt einen verkürzten Farbstoffabstand und ist vergleichbar zu den Beobachtungen, die eine Verschiebung zu erhöhten FRET-Effizienzen aufzeigen. In **Abb. 4.1.4 b** ist ein möglicher Sekundärstrukturwechsel von einer T- zu einer AT-Konformation durch die Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration gezeigt.

4.1.4 Magnesiumionenabhängige Faltung des Konstrukts RS_{EA2}

Um das beobachtete Faltungsverhalten der Riboschalter zu untermauern, wurden zusätzlich die gleichen Experimente an frei diffundierenden Molekülen mit dem Konstrukt RS_{EA2} durchgeführt (**Abb. 4.1.5 a**). Ohne divalente Mg^{2+} -Ionen beobachtet man eine dominierende Population bei $\langle E \rangle \approx 0,16$ ($R = 69 \text{ \AA}$) und eine breite Verteilung mit $\langle E \rangle \approx 0,7$ ($R = 46 \text{ \AA}$). Erhöht man nun schrittweise die Magnesiumionenkonzentration, erniedrigt sich die Population bei kleineren FRET-Effizienzen mit einer zusätzlichen Verschiebung zu $\langle E \rangle \approx 0,25$. Mit wachsender Erhöhung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration nehmen die Populationsanteile für Zustände hoher FRET-Effizienzen zu. Ebenso beobachtet man eine Verschiebung hin zu höheren FRET-Effizienz-Werten mit $\langle E \rangle \approx 0,8$.

Zieht man die Interpretationsergebnisse der Konstrukte RS_{AA} und RS_{EA1} heran, die bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen überwiegend T-Sekundärstrukturen einnehmen, so müssen die beiden gefundenen Populationen des RS_{EA2} , bei $\langle E \rangle \approx 0,16$ und $\langle E \rangle \approx 0,7$, ebenso Terminatorstrukturen angehören. Da bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen bevorzugt der AT-Zustand des SAM-I-Riboschalters eingenommen wird, lässt sich, wie beim Konstrukt RS_{EA1} , die Population bei $\langle E \rangle \approx 0,8$ als AT-Struktur interpretieren. Wie schon für das Konstrukt RS_{EA1} angenommen wurde, kann die Verdichtung der Molekülstruktur der Population bei $\langle E \rangle \approx 0,8$ dadurch erklärt werden, dass sich die P1-Helix und die AT-Helix aufeinander gestapelt haben. Da jedoch eine Überlagerung des AT-Zustands mit einem T-Zustand beim Konstrukt RS_{EA2} vorliegt, ist der Wechsel von T zu AT nicht so eindeutig wie beim Konstrukt RS_{EA1} .

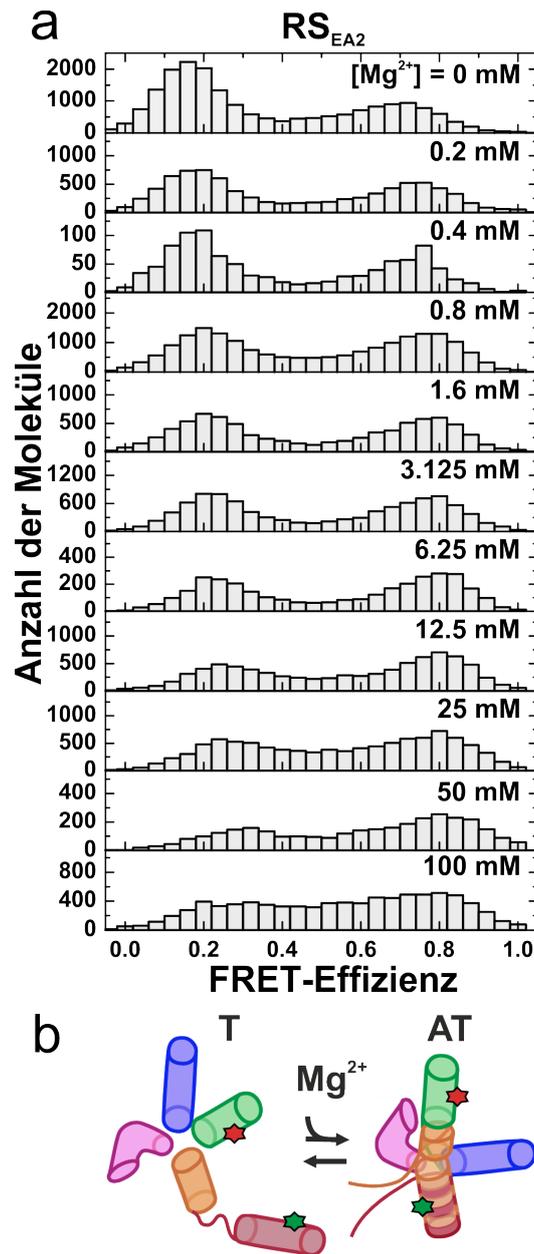


Abbildung 4.1.5: Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters. (a) RS_{EA2} mit 0 – 100 mM Mg^{2+} . (b) Schematische Darstellung der strukturellen Änderungen: Bei RS_{EA2} zeigt sich die magnesiumioneninduzierte Faltung von T nach AT durch die Erhöhung der Subpopulation bei höheren FRET-Effizienzen.

4.2 SAM-abhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters

Um zweifelsfrei die T-Zustände und die AT-Zustände des SAM-I-Riboschalters definieren zu können, wurden in dieser Arbeit Titrationsexperimente an frei diffundierenden RS -Molekülen mit dem Liganden SAM durchgeführt. Dafür wurden die FRET-Effizienzen der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} bei konstanter Magnesiumionenkonzentration von 20 mM am Konfokalmikroskop bestimmt. Die Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM wurde ge-

wählt, da es der Konzentration entspricht, bei welcher die Anteile beider Hauptpopulationen von T- und AT-Zuständen ungefähr gleich groß sind. Wieder wurden mit Hilfe der Burst-Analyse die Donor- und Akzeptorintensitäten tausender RS-Moleküle gemessen, daraus die FRET-Effizienzen berechnet und mit Binbreiten von 0,04 in FRET-Histogrammen aufgetragen. **Abb. 4.2.1 a** und **4.2.2 a** zeigen die Histogramme der SAM-abhängigen FRET-Populationen bei konstant gehaltener $[\text{Mg}^{2+}] = 20 \text{ mM}$. Die genaue Datenbasis ist im Anhang in **Tab. B.2** nachzulesen. Bekanntermaßen nimmt der SAM-I-RS bei Ligandenbindung den T-Zustand ein. Daher sollte man bei der sukzessiven Erhöhung der Ligandenkonzentration eine Verschiebung der Populationsanteile zu Gunsten der T-Zustände gegenüber den AT-Zuständen beobachten.

4.2.1 SAM-Titrationsexperimente des Konstrukts RS_{EA1}

Betrachtet man zunächst das Konstrukt RS_{EA1} , so stellt man bei steigender SAM-Konzentration eine deutliche Verringerung der Population bei $\langle E \rangle > 0,6$ fest. Dies bedeutet eine Vergrößerung der Farbstoffabstände, welche als Ausbildung eines T-Haarnadelschlaufe (**Abb. 4.2.1 b**) ausgelegt werden kann.

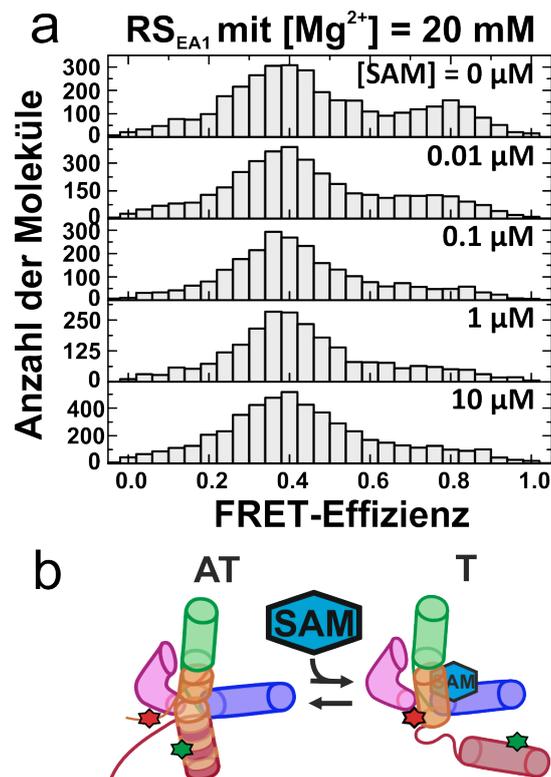


Abbildung 4.2.1: Ligandenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters. (a) FRET-Effizienzhistogramme des Konstrukts RS_{EA1} bei 0 – 10 μM des Liganden SAM bei konstant gehaltener Mg^{2+} -Konzentration von $[\text{Mg}^{2+}] = 20 \text{ mM}$. (b) Schematische Darstellung der strukturellen Änderungen des RS_{EA1} -Konstrukts. Die SAM-induzierte Faltung erzeugt eine Verschiebung der Verteilung von der kompakteren AT- zur T-Struktur mit exponierter T-Haarnadelschlaufe.

Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die Zustände mit hoher FRET-Effizienz $\langle E \rangle \approx 0,8$ der AT-Sekundärstruktur und solche mit niedriger FRET-Effizienz $\langle E \rangle \approx 0,4$ der T-Sekundärstruktur zugeordnet werden können, denn die Bindung von SAM favorisiert die Stabilisierung der T-Struktur [18]. Da diese Titrationsexperimente bei einer Ionenkonzentration von $[\text{Mg}^{2+}] = 20 \text{ mM}$ gemessen wurden, verschwinden die AT-Zustände bei $\langle E \rangle > 0,6$ nicht vollständig.

4.2.2 SAM-Titrationsexperimente des Konstrukts $\text{RS}_{\text{EA}2}$

Auch für das Konstrukt $\text{RS}_{\text{EA}2}$ wurden SAM-Titrationsexperimente mit $[\text{Mg}^{2+}] = 20 \text{ mM}$ durchgeführt. Hier beobachtete man unter sukzessiver Erhöhung der Ligandenkonzentration nur einen leichten Rückgang der Populationsanteile bei hohen FRET-Effizienzen um $\langle E \rangle \approx 0,8$. Deutlicher ist der Anstieg der Populationsanteile bei niedrigen FRET-Effizienzen mit $\langle E \rangle \approx 0,2$ (Abb. 4.2.2 a). Aus den Mg^{2+} -Titrationmessungen ist uns schon bekannt, dass beim Konstrukt $\text{RS}_{\text{EA}2}$ zwei Zustände bei niedrigen Magnesiumionenkonzentrationen existieren, welche vermutlich dem T-Zustand zuzuordnen sind. Eben-

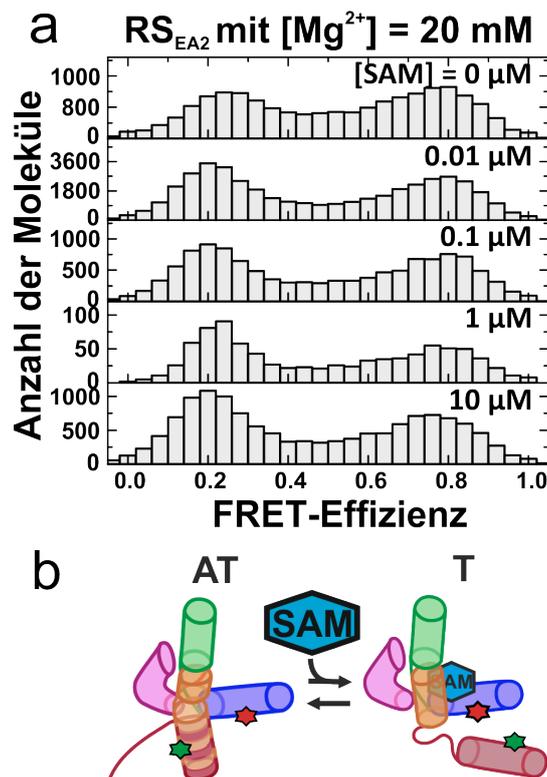


Abbildung 4.2.2: Ligandenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters. (a) FRET-Effizienzhistogramme des Konstrukts $\text{RS}_{\text{EA}1}$ bei 0 – 10 μM des Liganden SAM bei konstant gehaltener Mg^{2+} -Konzentration von $[\text{Mg}^{2+}] = 20 \text{ mM}$. Im Vergleich zum Konstrukt $\text{RS}_{\text{EA}1}$ ist keine deutliche Verschiebung der Populationsanteile von AT- zu T-Strukturen zu erkennen. (b) Schematische Darstellung der strukturellen Änderungen des RS-Konstruktes $\text{RS}_{\text{EA}2}$.

so ist bekannt, dass ein AT-Zustand mit $\langle E \rangle \approx 0,8$ existiert, welcher bei höherer Konzentration divalenter Ionen von einem T-Zustand überlagert ist. Somit ist das Verhalten bei RS_{EA2} wie erwartet wieder nicht so eindeutig wie bei RS_{EA1} . Jedoch untermauert das Nichtverschwinden der Population bei $\langle E \rangle \approx 0,8$, selbst bei hohen Ligandenkonzentrationen, die These, diese Population einer T-Struktur zuzuordnen.

4.3 Die Faltungsdynamik des SAM-I-Riboschalters

Um aus den breiten FRET-Histogrammen unterscheidbare Zustände herauszuarbeiten sowie die Kinetik der Faltung zwischen zwei Zuständen zu untersuchen, wurden FRET-Experimente an einzelnen RS-Molekülen in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Dazu wurden die Riboschaltermoleküle gemäß **Protokoll A.4** in einer Probenkammer immobilisiert. Da die Moleküldynamikmessung eine möglichst hohe zeitliche Auflösung der FRET-Effizienzmessung benötigt, wurden die Proben am Konfokalmikroskop untersucht, da hier Avalanche-Photodioden als Detektoren eingesetzt werden. Die Fluoreszenzintensitäten des Donors und des Akzeptors wurden jeweils mit einer zeitlichen Auflösung von $100 \mu\text{s}$ erfasst und für die HMM-Analyse jeweils in Intensitätstrajektorien mit einer zeitlichen Auflösung von 1 ms zusammengefasst. Zusätzlich wurden die gemittelten Hintergrundsignale des Donor- und des Akzeptorkanals bestimmt und für die HMM-Analyse bereitgestellt. Für diese Experimente wurde der Typ von Probenhalter verwendet, welcher in **Abb. 3.3.2 b** zu sehen ist. Mehrere hundert Moleküle wurden gemessen und aus deren Intensitätstrajektorien die FRET-Effizienztrajektorien bestimmt. Nach dem strikten Auswahlverfahren (siehe **Kapitel 3.4.5** und **3.5.3**) wurden acht bzw. neun Moleküle des RS-Konstrukts RS_{EA1} in Standard-RNS-Puffer mit 15 mM Mg^{2+} in Ab- bzw. Anwesenheit des Liganden SAM für die weitere HMM-Analyse ausgewählt. Damit wurden jeweils Gesamtlängen optimaler Fluoreszenztrajektorien von 310 s und 109 s in Ab- und Anwesenheit von SAM analysiert. Diese Intensitätstrajektorien wurden mit dem HMM-Analyse-Programm von Bettina Keller et al. [140] untersucht. Im Gegensatz zur konventionellen Histogrammanalyse, welche rein auf der Betrachtung spektroskopischer Informationen basiert, benutzt eine HMM-Analyse sowohl spektroskopische als auch temporale Informationen, um ein Modell zu erstellen. Dabei werden stochastische Wechsel zwischen einer diskreten Anzahl von Zuständen angenommen, die sich durch ihre gemittelten FRET-Effizienzen sowie ihre Lebensdauer definieren [136, 140, 170, 181]. Da das HMM eine Übergangsmatrixanalyse für eine diskrete Anzahl von Zuständen ansetzt, ist es ein exzellentes Werkzeug, um aus verrauschten, zeitabhängigen Emissionsintensitätsmessungen separate Zustände zu identifizieren. Dies ermöglicht die Berechnung von Übergangsratenkoeffizienten der Faltungszustände untereinander auf einer Zeitskala vom Submillisekunden- bis in den Sekundenbereich [140]. Daher eignet sich diese Datenanalysemethode auch sehr gut zur Analyse von Einzelmolekül-FRET-Messungen an Riboschalter-Molekülen. Zum einen existiert ein merklich wahrnehmbares Untergrundsignal, trotz großer Aufwände zur Vermeidung von Streulicht, wie dem Abdunkeln des Messlabors, dem Abdecken des gesamten Messaufbaus, der akribischen Auswahl an optischen Filtern und Detektoren, der Einstellung der Laseranregungsleistung bis hin zur Auswahl besonders reiner Chemikalien. Zum anderen nehmen Riboschalter-Moleküle durch

ihre Faltung diskrete, funktionale metastabile Zustände ein.

Zur Untersuchung der Faltungskinetik des RS_{EA1} -Konstrukts wurden die Pufferbedingungen (15 mM Mg^{2+} bei 0 und 10 μ M SAM) so gewählt, dass sie am geeignetsten für die Erfassung aller wichtigen Faltungszustände auf der Basis der FRET-Daten waren. Dabei wurden die Pufferbedingungen so eingestellt, dass Zustandsübergänge häufig beobachtet werden konnten. Daher ist die gewählte Magnesiumionenkonzentration von 15 mM um mehr als das Zehnfache höher als die typischen Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen *in vivo* im Mikromolarbereich [182, 183]. Unter physiologischen Magnesiumionenkonzentrationen im einstelligen Millimolarbereich konnten jedoch nur selten Zustandsübergänge zwischen T- und AT-Strukturen nachgewiesen werden. Betrachtet man die Histogramme unter physiologischen Magnesiumionenkonzentrationen von 400 μ M bis 1,6 mM (**Abb. 4.1.4**), so dominieren bei 80 % der Populationen Terminatorkonformationen, während die AT-Strukturen kaum vorhanden sind. Unter diesen Bedingungen wäre es kaum möglich, eine genügend große Zahl an Übergängen zu beobachten. Daher wurde die Magnesiumionenkonzentration so eingestellt, dass die Populationsanteile zwischen T- und AT-Zuständen noch vergleichbar groß waren (siehe **Abb. 4.1.4**) und ein häufiger Wechsel der FRET-Effizienzen und damit der Zustände beobachtbar war. Durch die Verwendung zweier Pufferlösungen mit einer Konzentration von jeweils 0 oder 10 μ M SAM wurden die Pufferbedingungen so eingestellt, dass entweder ligandenungebundene oder -gebundene Zustände die Population dominierten (siehe **Abb. 4.2.1**).

Um sicher zu gehen, dass die Hidden-Markov-Modelle der beiden Datensätze konsistent mit dem jeweiligen Datensatz sind, aus welchem sie parametrisiert wurden, und um zu überprüfen, ob jeder gefundene Zustand den Markov-Eigenschaften genügt, wurden die Datensätze der Validierungsprozedur unterzogen (siehe **Kapitel 3.5.3**). Die Konsistenz der Modelldaten und der gemessenen Daten wurden überprüft, indem Messdaten und Simulation miteinander verglichen wurden. Dazu wurden die gemessenen FRET-Effizienzdatenpunkte der einzelnen Trajektorien in 10, 50 und 250 ms Zeitfenstern zusammengefasst und als FRET-Effizienzhistogramme aufgetragen. Weiterhin wurden die simulierten FRET-Effizienzhistogramme der Modelldaten mit ihrem zugehörigen 95 % Konfidenzintervall zusammen mit den Messdaten in einem Histogramm geplottet. In **Abb. 4.3.1** sind diese Histogramme jeweils für die Pufferbedingungen bei 15 mM Mg^{2+} mit 0 μ M SAM und bei 15 mM Mg^{2+} mit 10 μ M SAM gezeigt. Die schwarzen Linien entsprechen den gemessenen Daten, die umgebenden grauen Linien zeigen die dazugehörigen 95 %-Konfidenzvalle. Die simulierten Daten aus den Hidden-Markov-Modellen sind in rot geplottet. Im darauffolgenden Schritt wird die Markov-Eigenschaft der einzelnen Zustände getestet. Dafür wurden die Lebensdauerverteilungen der gefundenen Zustände berechnet und logarithmisch über der Zeit aufgetragen. Nur solche Modelle, in denen jeder Zustand einem einfach exponentiellen Abfall folgt, sind mit der Markov-Eigenschaft konsistent und bestehen somit die Validierungsprozedur. In **Abb. 4.3.1** sind diese Lebensdauerverteilungen farblich sortiert nach den einzelnen Zuständen. Mit den beiden Modellen, welche die Validierung bestanden haben und zudem reproduzierbar waren, konnte dann die weitere Datenanalyse fortgeführt werden. Die erhaltenen FRET-Effizienzen des HMM wurden durch einen kumulativen γ -Faktor korrigiert, welcher aus dem Mittelwert der γ -Faktoren der einzelnen Trajektorien bestimmt wurde. Somit konnten den FRET-Effizienzen korrekte Markerabstände zugeordnet werden.

Die HMM-Analyse des RS_{EA1} mit Mg^{2+} in Abwesenheit des Liganden SAM ergab ein

Vier-Zustandsmodell, welches in **Abb. 4.3.2 a** dargestellt ist. Die Farben der Zustände entsprechen denen in **Abb. 4.3.1 b**. Die Zustände sind mit ihren zugeordneten Farben als Kreise dargestellt, deren Durchmesser mit den Zustandspopulationen skaliert sind, und deren Koordinaten sich aus ihren gemittelten FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ und ihrer Zustandslebensdauer τ bestimmen (**Abb. 4.3.2 b**). Die gemittelten FRET-Effizienzen der HMM-Analyse in Abwesenheit vom Liganden SAM wurden mit $\gamma = 1,63$ korrigiert. Die beiden Zustände hoher FRET-Effizienz (rot und orange) sind kompakten Konformationen mit kurzen Verweildauern im jeweiligen Zustand, also den AT-Konformationen, zu-

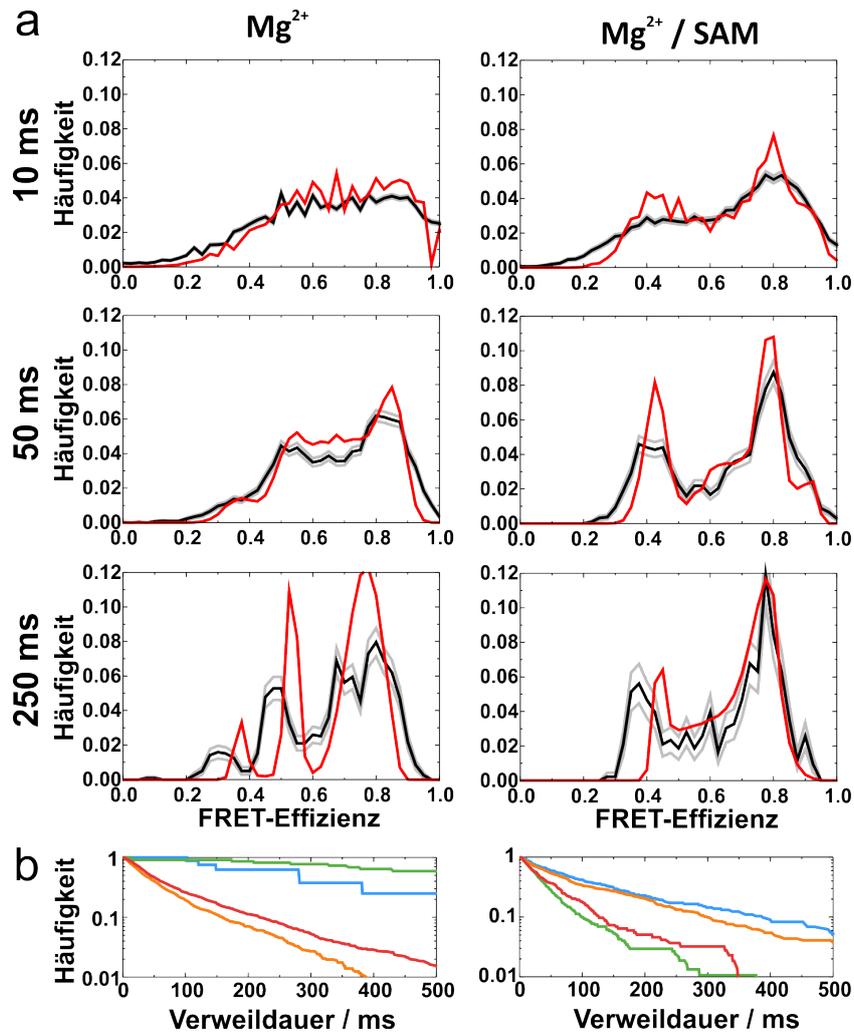


Abbildung 4.3.1: Validierung des Hidden-Markov-Modells. Das Schaubild zeigt die Validierung der Hidden-Markov-Modelle für zwei unterschiedliche Datensätze des Konstrukts RS_{EA1} , links in Standard-RS-Puffer mit 15 mM Mg^{2+} und rechts in Standard-RS-Puffer mit 15 mM Mg^{2+} und 10 μM SAM. (a) Vergleich der simulierten FRET-Histogramme (rote Linien) mit den gemessenen Daten (schwarze Linien) und dem dazugehörigen 95 % Konfidenzintervall (grau umrahmtes Gebiet) für verschiedene zeitliche Binbreiten (10, 50 und 250 ms). (b) Verteilung der Zustandslebensdauern, berechnet aus den Maximum-Likelihood-Pfaden. Die Farben der einzelnen Linien sind den einzelnen Zuständen zugeordnet.

zuordnen. Die zwei langlebigen Zustände niedriger FRET-Effizienzen (blau und grün) sind strukturell ausgedehnte Zustände, also T-Zustände. Mit Hilfe der bekannten Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den vier verschiedenen Zuständen beobachtet man [140, 184], dass die Faltungsdynamik zwischen beiden AT-Zuständen (AT_1 und AT_2) durch schnelles Wechseln auf der Millisekenskala dominiert (Abb. 4.3.2 c). Übergänge sowohl zwischen den T-Zuständen als auch zwischen T- und AT-Konformationen finden hingegen auf der Sekundenskala statt. Die Übergangsbarrieren der Gibbsschen freien Energielandschaft zwischen diesen Zuständen sind relativ hoch und deuten daher auf erhebliche Sekundärstrukturänderungen hin. Die HMM-Analyse der Einzelmolekül-FRET-Trajektorien der immobilisierten RS_{EA1} -Konstrukte mit 15 mM Mg^{2+} und 10 μ M SAM gelöst in Standardpuffer, sind in Abb. 4.3.3 dargestellt. Die vier gefundenen Zustände sind wieder farblich sortiert geplottet und dem Farbcode aus Abb. 4.3.1 b (rechte Spalte) angepasst. In Abb. 4.3.3 b sind die Zustände erneut zerlegt nach ihrem Populationsanteil (Kreisdurchmesser), ihrer gemittelten FRET-Effizienz $\langle E \rangle$ und ihrer Zustandsverweildauer τ . Die gemittelten FRET-Effizienzen der HMM-Analyse in Anwesenheit des Liganden SAM wurden mit $\gamma = 1,98$ korrigiert. Das kinetische Netzwerk des Hidden-Markov-

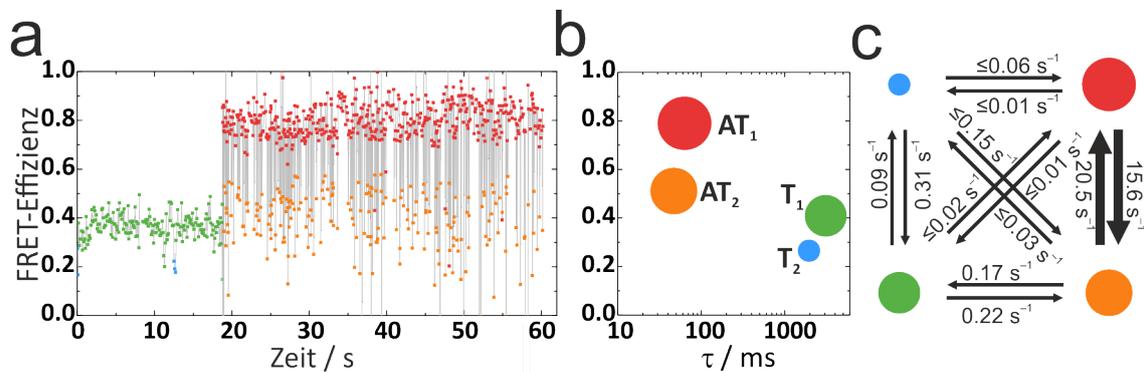


Abbildung 4.3.2: HMM-Analyse der Faltungsdynamik des SAM-I-Riboschalters des Konstrukts RS_{EA1} ohne Ligand. (a) Beispiel für eine typische Einzelmolekül-FRET-Messung eines immobilisierten RS-Moleküls in Standardpuffer und 15 mM Mg^{2+} . Basierend auf einer zeitlichen Auflösung der Intensitätsmessung der Fluoreszenz von 100 μ s, wurden 1000 Datenpunkte eines durch das HMM identifizierten Zustandes zu einem gemittelten FRET-Effizienzwert zusammengefasst. Somit wurden die Messdaten in Zeitintervallen von 100 ms gemittelt. Falls durch das HMM weniger aufeinanderfolgende Datenpunkte zum selben Zustand zugeordnet werden konnten, wurden entsprechend weniger Datenpunkte zu einem Wert gemittelt. (b) Zweidimensionaler Punktplot der vier durch das HMM identifizierten Zustände, dargestellt durch Kreise, deren Flächen proportional zu ihrer Population sind. Die Zustände sind mit ihrer gemittelten FRET-Effizienz über ihrer Zustandslebensdauer aufgetragen. (c) Kinetisches Netzwerk der Zustandsumwandlungen mit ihren mikroskopischen Ratenkoeffizienten, entnommen aus den Nebendiagonalelementen der Übergangsmatrix \hat{T} des zugrundeliegenden Hidden-Markov-Modells. Die unterschiedlichen Pfeildicken verdeutlichen die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen i und j , und skalieren mit der Größenordnung O der Ratenkoeffizienten k_{ij} der Gleichgewichtspopulationen, wobei $k_{ij} = O(10^{-1})$ (fett gedruckt), $k_{ij} = O(10^{-2})$ (mittelstark gedruckt) und $k_{ij} = O(10^{-3})$ s⁻¹ (dünn gedruckt) repräsentiert.

Modells ist in **Abb. 4.3.3 c** geplottet. In Anwesenheit des Liganden SAM verändert sich die Faltungsdynamik drastisch, was schon allein aus den gezeigten Einzelmolekül-FRET-Daten klar ersichtlich wird (**Abb. 4.3.3 a**). Ebenso findet man für diese Pufferbedingungen vier Faltungszustände: zwei AT-Zustände (**Abb. 4.3.3 b** rot und orange bei hohen FRET-Effizienzen) sowie zwei T-Zustände (**Abb. 4.3.3 c** blau und grün bei niedrigen FRET-Effizienzen). Für die beiden AT-Zustände (AT_1^{SAM} und AT_2^{SAM}) findet man vergleichbare Lebensdauern mit und ohne SAM. Dagegen wurden für die beiden T-Zustände in Anwesenheit von SAM wesentlich kürzere Lebensdauern gemessen. Die Übergangsdynamik in Anwesenheit des Liganden zwischen den beiden Zuständen gleicher AT-Sekundärstruktur AT_1^{SAM} und AT_2^{SAM} ist vergleichbar zur Übergangsdynamik in Abwesenheit von SAM. Bis auf die Übergangsdynamik der beiden AT-Sekundärstrukturen AT_1^{SAM} und AT_2^{SAM} und der Dynamik zwischen AT-Sekundärstruktur T_2^{SAM} und AT_2^{SAM} konnte eine deutliche Beschleunigung der gesamten Übergangsdynamik gemessen werden. Besonders auffällig sind dabei die Erhöhungen der Übergangsraten zwischen T- und AT-Zuständen von $> 50\times$. Eine Beschleunigung der Übergangsraten zwischen den Zuständen bedeutet, dass

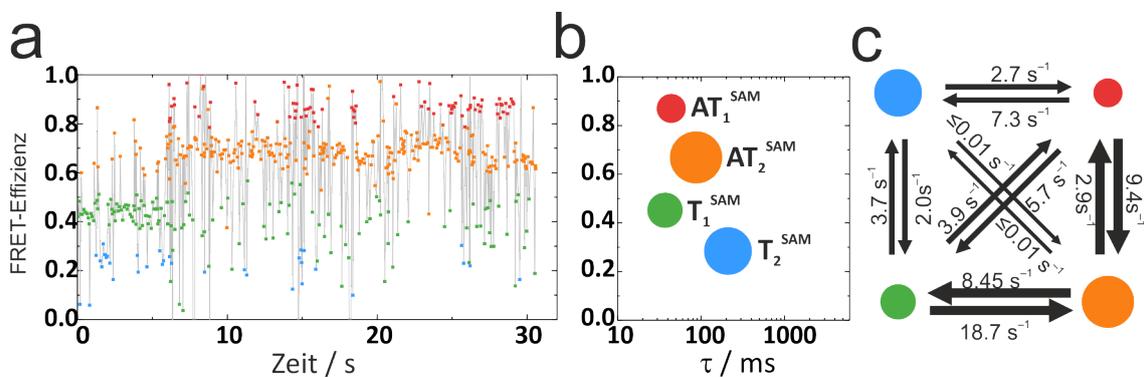


Abbildung 4.3.3: HMM-Analyse der Faltungsdynamik des Konstrukts RSEA1 in Anwesenheit des Liganden SAM. (a) Beispiel für eine typische Einzelmolekül-FRET-Messung eines immobilisierten RS-Moleküls in Standardpuffer mit 15 mM Mg²⁺ und 10 μM SAM. Basierend auf einer zeitlichen Auflösung der Intensitätsmessung der Fluoreszenz von 100 μs, wurden 1000 Datenpunkte eines durch das HMM identifizierten Zustands zu einem gemittelten FRET-Effizienzwert zusammengefasst. Somit wurden die Messdaten in Zeitintervallen von 100 ms gemittelt. Falls durch das HMM weniger aufeinanderfolgende Datenpunkte zum selben Zustand zugeordnet werden konnten, wurden entsprechend weniger Datenpunkte zu einem Wert gemittelt. (b) Zweidimensionaler Punktplot der vier durch das HMM identifizierten Zustände, dargestellt durch Kreise, deren Flächen proportional zu ihrer Population sind. Zustände sind mit ihrer gemittelten FRET-Effizienz über ihre Zustandslebensdauer aufgetragen. (c) Kinetisches Netzwerk der Zustandsumwandlungen mit ihren mikroskopischen Ratenkoeffizienten, entnommen aus den Nebendiagonalelementen der Übergangsmatrix \hat{T} des zugrundeliegenden Hidden-Markov-Modells. Die unterschiedlichen Pfeildicken verdeutlichen die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen i und j und skalieren mit der Größenordnung O der Ratenkoeffizienten k_{ij} der Gleichgewichtspopulationen, wobei $k_{ij} = O(10^{-1})$ (fett gedruckt), $k_{ij} = O(10^{-2})$ (mittelstark gedruckt) und $k_{ij} = O(10^{-3})$ s⁻¹ (dünn gedruckt) repräsentiert.

sich die Energiebarrieren zwischen den Zuständen abgesenkt haben. Diese Energiebarrieren trennen die Zustände in der Energielandschaft voneinander. So wird ein Wechsel zwischen beiden Faltungszuständen viel wahrscheinlicher.

Während die Populationsanteile der Zustände T_1^{SAM} und AT_2^{SAM} für beide Pufferbedingungen vergleichbar groß bleiben, beobachtet man eine deutliche Verschiebung der Anteile zwischen AT_1^{SAM} und T_2^{SAM} . Durch Zugabe des Liganden SAM erhöht sich die Population von T_2^{SAM} , während sich die Population von AT_1^{SAM} stark erniedrigt. Somit beobachtet man insgesamt eine Verschiebung durch Zugabe von SAM zugunsten der T-Zustände. Die Bindung des Liganden SAM bestimmt also nicht nur die Verschiebung der anteiligen Populationen hin zum T-Zustand und damit der relativen Gibbsschen freien Energieniveaus zueinander, sondern auch die Höhen der zu überwindenden Energiebarrieren. Somit wird ersichtlich, dass die Anwesenheit des Liganden SAM die Faltung des SAM-Riboschalters in den Terminatorzustand erzeugt.

4.3.1 Ergebnisdiskussion der Datenbasis von Einzelmolekültrajektorien für die HMM-Analyse

Eine Gesamtzahl von jeweils acht bzw. neun einzelnen Molekülen erscheint eine eher kleine Datenbasis zu sein, jedoch ist eine besonders strikte Auswahl der Trajektorien nötig, um zu verhindern, dass Messartefakte wie Bleichen und Blinken, fluoreszente Verunreinigungen oder fehlgefaltete Riboschaltermoleküle das Messergebnis verfälschen. Der Großteil aller Trajektorien wurde durch das Auswahlverfahren, beschrieben in **Kapitel 3.4.5.1**, verworfen. Neben Trajektorien, welche Blinken vorwiesen, mussten auch viele Trajektorien außer Acht gelassen werden, in welchen Donor- vor Akzeptorbleichen beobachtet wurde. Denn dann konnten diese FRET-Effizienzen nicht mit dem Gammafaktor korrigiert werden. Außerdem konnte so das Hintergrundsignal des Akzeptorkanals inklusive spektralem Übersprechen durch die Anwesenheit des Donors nicht bestimmt werden. Von den übriggebliebenen Molekülen musste ein weiterer großer Teil verworfen werden, da mit Hilfe der Korrelationsanalyse von Donor- und Akzeptorsignal (siehe **Kapitel 3.5.3**), keine Antikorrelation und somit kein FRET-Mechanismus nachgewiesen werden konnte.

Wichtiger für die Analyse der Faltungsdynamik ist nicht die absolute Anzahl der vermessenen Moleküle, sondern vor allem die Gesamtlänge der gemessenen Trajektorien und die Anzahl der beobachteten Zustandsübergänge. Mit einer kumulierten Gesamtlänge t_{gesamt} der selektierten Trajektorien von 310 s und 109 s in Ab- und Anwesenheit des Liganden SAM bei einer zeitlichen Auflösung von 1 ms ($10\times$ Zeitintervallen) konnten viele Datenpunkte erfasst werden. Mit den durch die HMM-Analyse bestimmten Gleichgewichtspopulationen π_i sowie den mittleren Lebensdauern τ_i der einzelnen Zustände kann die Anzahl der beobachteten Zustandsübergänge N_i geschätzt werden mit:

$$N_i = t_{\text{gesamt},i} \frac{\pi_i}{\tau_i}. \quad (4.1)$$

Somit konnten für schnelle Zustandsübergänge, wie sie in Anwesenheit des Liganden SAM zu beobachten sind, mehrere hundert Übergänge erfasst werden. Für die schnells-

ten Zustandsübergänge erhielt man bis zu 2000 Übergänge. Die genauen Werte sind in **Tab. 4.1** aufgelistet. Seltene Zustandsübergänge konnten trotz langer Trajektorien nicht oft beobachtet werden, sodass die Ratenkoeffizienten aus wenigen Ereignissen bestimmt wurden. Entscheidend ist hierbei das Wissen, dass genau die Raten seltener Übergänge um eine bis zwei Größenordnungen unterhalb der Ratenkoeffizienten der anderen Zustandsübergänge liegen. Sie geben somit Aufschluss auf das Faltungsverhalten des Riboschalters. Denn im Gegensatz zu Zustandsübergängen mit hohen Ratenkoeffizienten, welche im Allgemeinen mit nur kleinen Strukturänderungen in Verbindung zu bringen sind, weisen kleine Ratenkoeffizienten auf große Konformationsänderungen hin. Dies kann beispielsweise auf das Aufbrechen von WC-Basenpaaren und der damit verbundenen Änderung von Helices hindeuten, wie es bei der Faltung zwischen T- und AT-Strukturen vorkommt.

Tabelle 4.1: Datenbasis der HMM-Analyse der Datensätze in Ab- und Anwesenheit von SAM. Die Tabelle zeigt die durch die HMM-Analyse bestimmten Gleichgewichtspopulationen π_i sowie die mittleren Zustandslebensdauern τ_i . Mit $t_{gesamt,i} = \pi_i * t_{gesamt}$ ergibt sich eine kumulierte Gesamtlänge eines gemessenen Zustands. t_{gesamt} entspricht der Gesamtlänge der selektierten Trajektorien in Ab- und Anwesenheit des Liganden mit jeweils 310 s und 109 s Länge. N_i entspricht der errechneten Anzahl an beobachteten Übergängen.

Zustand	π_i	τ_i / ms	$t_{gesamt,i} / s$	N_i
RS_{EA1}, [Mg²⁺] = 15 mM				
T ₁	0,24	3087	74,4	24
T ₂	0,07	1946	21,7	11
AT ₁	0,39	63	120,9	1919
AT ₂	0,30	47	93	1078
RS_{EA1}, [Mg²⁺] = 15 mM / [SAM] = 10 μM				
T ₁ ^{SAM}	0,17	37	18,5	504
T ₂ ^{SAM}	0,32	210	34,9	163
AT ₁ ^{SAM}	0,12	44	13,1	292
AT ₂ ^{SAM}	0,39	87	42,5	475

4.4 Quantitative Analyse der FRET-Histogramme mit vier Zuständen

4.4.1 Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts RS_{EA1}

Mit Hilfe der HMM-Analyse der FRET-Trajektorien des RS_{EA1}-Konstrukts konnten in Abwesenheit des Liganden SAM vier Zustände identifiziert werden. Basierend auf diesen

vier Zuständen sollte es folglich möglich sein, dieses Vierzustandsmodell mit einem globalen Fit auf die Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente an frei diffundierenden Riboschaltermolekülen (**Abb. 4.1.4** und **4.2.1**) zu übertragen. Jeder i -te Zustand kann im FRET-Effizienzhistogramm durch eine Normalverteilung f_i beschrieben werden mit:

$$f_i(E|\langle E \rangle_i, \sigma_i) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} e^{-\frac{(E-\langle E \rangle_i)^2}{2\sigma_i^2}}. \quad (4.2)$$

Die Werte $f_i(E|\langle E \rangle_i, \sigma_i)$ der i -ten Gauß-Funktion bestimmen sich für jeden FRET-Effizienzwert E in Abhängigkeit des gemittelten FRET-Effizienzwertes des i -ten Zustands $\langle E \rangle_i$ und der Breite der Zustände σ_i . Für den globalen Fit werden daher vier Gauß-Verteilungsfunktionen angesetzt, deren Summe der Gesamtverteilung der gemessenen Moleküle entsprechen muss. Um einen sinnvollen globalen Fit zu bekommen, mussten folgende Fitparameter in ihrem Wertebereich eingeschränkt werden:

- Fläche der Funktion (anteilige Population)
- Position (gemittelte FRET-Effizienz $\langle E \rangle_i$)
- Breite der Funktion σ_i

Aus vorangegangenen Untersuchungen konnte sowohl beim SAM-I-Riboschalter [60] als auch bei anderen RNS-Molekülen [185, 186] beobachtet werden, dass sich die Abhängigkeit der anteiligen Populationen von der Magnesiumionenkonzentration durch eine Hill-Funktion darstellen lässt. Daher wurde den anteiligen Populationen des i -ten Zustandes erlaubt, innerhalb der Gauß-Fits in Abhängigkeit der jeweiligen Mg^{2+} -Konzentration mit einer empirischen Hill-Funktion, zu variieren. Ein häufig genutzter Ansatz, um Mg^{2+} -induzierte RNS-Faltung zu analysieren, ist die Annahme einer Zweizustandsreaktion (siehe **Gl. 3.25**), bei der eine bestimmte Anzahl von Mg^{2+} -Ionen an eine RNS-Struktur binden und damit eine Faltung dieser RNS-Struktur erzeugen. Diese Reaktion kann mit einer Hill-Gleichung modelliert werden, wobei der Hill-Koeffizient n_H oft als stöchiometrischer Koeffizient interpretiert wird, welcher der Anzahl von gebundenen Mg^{2+} -Ionen im gefalteten Zustand entspricht. Dabei berücksichtigt diese Interpretation des Bindungsmodells zwar die Möglichkeit einer direkten Bindung an die RNS-Struktur, aber nicht die Fähigkeit der Mg^{2+} -Ionen durch langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen Einfluss auf die Faltung und Stabilisierung der RNS-Struktur zu nehmen. Hinzu kommt, dass spektroskopische Untersuchungsmethoden wie beispielsweise FRET-Analysen die Bindung von Mg^{2+} -Ionen nicht direkt messen, sodass die Interpretation des Hill-Koeffizienten als die Anzahl an gebundenen Ionen hier nicht adäquat ist [187]. Daher benötigt man ein vervollständigtes Modell, in welchem alle Wechselwirkungen der Mg^{2+} -Ionen mit RNS berücksichtigt werden. In diesem wird der Hill-Koeffizient n_H eher als Bindungskoeffizient Γ_{2+} interpretiert (*engl. preferential interaction coefficient*), der ein Maß für die Wirkung an überschüssigen Mg^{2+} -Ionen im näheren Umfeld der RNS-Moleküle ist und somit die RNS-Struktur stabilisiert [179].

Jedoch ist dieses Modell an zwei Annahmen geknüpft: Erstens muss die Aktivität der Mg^{2+} -Ionen, bezogen auf die Faltung der RNS, unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration und zweitens der Bindungskoeffizient konstant sein. Lepply und Draper [179] zeigten,

dass die Annahme einer konzentrationsunabhängigen Aktivität der Mg^{2+} -Ionen dann gegeben ist, wenn ein genügend hoher Überschuss von monovalenten Cl^- -Ionen im Verhältnis zu Mg^{2+} -Ionen existiert. In diesem Fall bleibt die abschirmende Wirkung der Cl^- -Ionen trotz steigender Mg^{2+} -Konzentration während der Titrationsexperimente konstant. Die Pufferbedingungen, die für diese Arbeit gewählt wurden, bieten eben diesen nötigen Überschuss an Cl^- -Ionen (siehe **Kapitel 3.2**), sodass die erste Bedingung als erfüllt angesehen werden kann. Bezüglich der zweiten Bedingung gilt: Innerhalb der Untersuchungen dieser Arbeit konnte der Wert des Bindungskoeffizienten Γ_{2+} nicht direkt bestimmt werden, da nur die relativen Populationen der Riboschalterzustände miteinander verrechnet wurden. Stattdessen wurde die Differenz der Bindungskoeffizienten $\Delta\Gamma_{2+}$ zweier Zustände herangezogen. In dieser Arbeit wurde weiterhin angenommen, dass $\Delta\Gamma_{2+}$, also die Änderung der Gesamtmenge der an der Faltung beteiligter Ionen, als konstant angesehen wird. Inwieweit diese Annahme richtig ist, müsste innerhalb weiterer Experimente verifiziert werden. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Näherung durchaus valide ist [67, 179, 187]. Daher kam für diese Arbeit eine modifizierte Hill-Gleichung zur Analyse der Titrationsexperimente zum Einsatz:

$$X_i([\text{Mg}^{2+}]) = X_i(0) + \frac{\Delta X_i}{1 + \left(\frac{[\text{Mg}^{2+}]_{0,5,i}}{[\text{Mg}^{2+}]} \right)^{\Delta\Gamma_{2+}}}. \quad (4.3)$$

Dabei ist $[\text{Mg}^{2+}]_{0,5,i}$ die Konzentration des Übergangsmittelpunkts des i -ten Zustands. Mit $X_i(0)$ gehen die Startwerte der einzelnen anteiligen Populationen in Abwesenheit von Magnesiumionen (0 mM) in die Gleichung ein. Aus den Experimenten dieser Arbeit kann außerdem nicht unterschieden werden, ob verschiedene Faltungszustände unterschiedliche Mg^{2+} -Konfigurationen haben. Daher kann man nur annehmen, dass durch Zunahme an Mg^{2+} -Ionen innerhalb der Titrationsexperimente eine globale Umorientierung der RNS-Struktur verursacht wird, die auf ein Zusammenspiel von lang- und kurzreichweitigen Wechselwirkungen divalenter Ionen zurückzuführen sind. In allen Messungen des SAM-I-Riboschaltermoleküls betrug der Wert von $\Delta\Gamma_{2+}$ innerhalb der Fehler immer eins und wurde für alle Fits auf $\Delta\Gamma_{2+} = 1$ gesetzt. Somit geht man davon aus, dass die Gesamtmenge an der Faltung beteiligter Mg^{2+} -Ionen für das Bindungsmodell konstant ist. Das vereinfacht das Bindungsmodell zu einem bimolekularen Bindungsmodell.

Die Abhängigkeit der FRET-Mittelwerte $\langle E \rangle_i$ von den Konzentrationen der Magnesiumionen folgt erfahrungsgemäß einer Hill-Funktion. Die Erhöhung der Ionenkonzentration sorgt für eine kleine, jedoch messbare Verdichtung der Faltungszustände der RNS-Moleküle. Dies führt innerhalb der FRET-Effizienzhistogramme zu einer leichten Verschiebung der Zustandsmittelwerte hin zu höheren FRET-Effizienzen. Daher wurde den Mittelwerten der Gauß-Funktionen ebenso erlaubt, einer Hill-Funktion zu folgen. Hier wurde der Hill-Parameter als Bindungskoeffizient interpretiert, da sich die beobachtete Kompaktierung auf die Wirkung der Mg^{2+} -Ionen zurückführen lässt. Der Koeffizient wurde ebenso $\Delta\Gamma_{2+} = 1$ gesetzt. Vorangehende Untersuchungen mit dem SAM-I-Riboschalter, welche die Faltung des Aptamers des SAM-I-Riboschalters untersuchten, konnten auch Werte von $\simeq 1$ des empirischen Koeffizienten bestimmen [59, 67].

Die Halbwertsbreite der Gauß-Funktionen (*engl. Full Width Half Maximum, FWHM*)

wurde durch den Fitansatz festgelegt. Der globale Fit mit Gauß-Funktionen wurde durch den Übertrag der HMM-Ergebnisse auf die nächstgelegene Pufferbedingung der Magnesiumionentitrationen des Konstrukts RS_{EA1} durchgeführt. Für diesen Fit wurden sowohl die anteiligen Populationen als auch die FRET-Effizienzen der Zustände entsprechend des HMM-Ergebnisses als Startparameter vorgegeben. Dabei durften die Werte der anteiligen Populationen innerhalb von 10 % variieren. Aus dem erfolgten Fit konnten die Halbwertsbreiten der einzelnen Zustände bestimmt werden. Die zustandsabhängigen Halbwertsbreiten wurden innerhalb enger Variationsgrenzen festgehalten. Dies ist unter der Annahme möglich, dass die Photophysik eines Zustandes unabhängig von Untergrundsignal, Detektionseffizienz des Mikroskops, Resonanzenergietransfer und der Umgebungsbedingungen (Pufferbedingungen) ist. Weiterhin bedeutet die Einschränkung, dass keine Veränderung der Heterogenität eines gefundenen Faltungszustandes angenommen wird. Die Startparameter für den globalen Fit der Histogramme des Konstrukts RS_{EA1} sind in **Tab. 4.2** zu finden.

Tabelle 4.2: Startparameter des globalen Fits mit vier Gauß-Funktionen für das Konstrukt RS_{EA1} . Die mittleren FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle$ und die daraus berechneten Farbstoffabstände $R_{\langle E \rangle}$ sind für $[Mg^{2+}] = 12,5$ mM angegeben. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilungen sind in der Spalte FWHM gegeben.

Zustand	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	FWHM
RS_{EA1}			
T_1	$0,36 \pm 0,03$	58	$0,21 \pm 0,09$
T_2	$0,17 \pm 0,03$	69	$0,16 \pm 0,07$
AT_1	$0,79 \pm 0,03$	42	$0,23 \pm 0,05$
AT_2	$0,55 \pm 0,03$	51	$0,21 \pm 0,07$

Anschließend konnten allen anderen Histogramme, basierend auf dem Vierzustandsmodell, gefittet werden. Die Ergebnisse sind in **Tab. 4.3** zusammengefasst. Die globalen Fits beschreiben die Histogramme sehr gut (**Abb. 4.4.1 a**), denn sie zeigen die magnesiumionenabhängige Variation der Populationen der Zustände. Aus dem globalen Fit resultieren die anteilige Populationen der einzelnen Zustände in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration (**Abb. 4.4.1 b**) sowie die Verdichtung der Struktur bei steigender Ionenstärke (**Abb. 4.4.1 c**). In Abwesenheit von SAM und Mg^{2+} -Ionen kann die dominierende Population bei niedrigen FRET-Effizienzen durch die zwei Gauß-Funktionen der beiden Terminatorzustände T_1 mit $\langle E \rangle = 0,24$ und T_2 mit $\langle E \rangle = 0,13$ gefittet werden. Beide Zustände, jedoch beim Zustand T_2 deutlich ausgeprägter als beim Zustand T_1 , zeigen bei steigender Magnesiumionenkonzentration eine Verschiebung hin zu höheren FRET-Effizienzen (**Abb. 4.4.1 c**). Bei Konzentrationen von > 100 mM Magnesiumionen erreichen die FRET-Effizienzen der beiden Terminatorzustände Werte von $\langle E \rangle = 0,40$ für T_2 und $\langle E \rangle = 0,18$ für T_1 . Dieses Verhalten ist der vermuteten strukturellen Verdichtung des Riboschalters, aufgrund der steigenden Ionenstärke, zuzuschreiben. Die nicht verschwindenden Beiträge hoher FRET-Effizienzen, selbst bei 0 mM Mg^{2+} , können durch den globalen Fit den beiden Antiterminatorzuständen AT_1 und AT_2 zugeordnet werden.

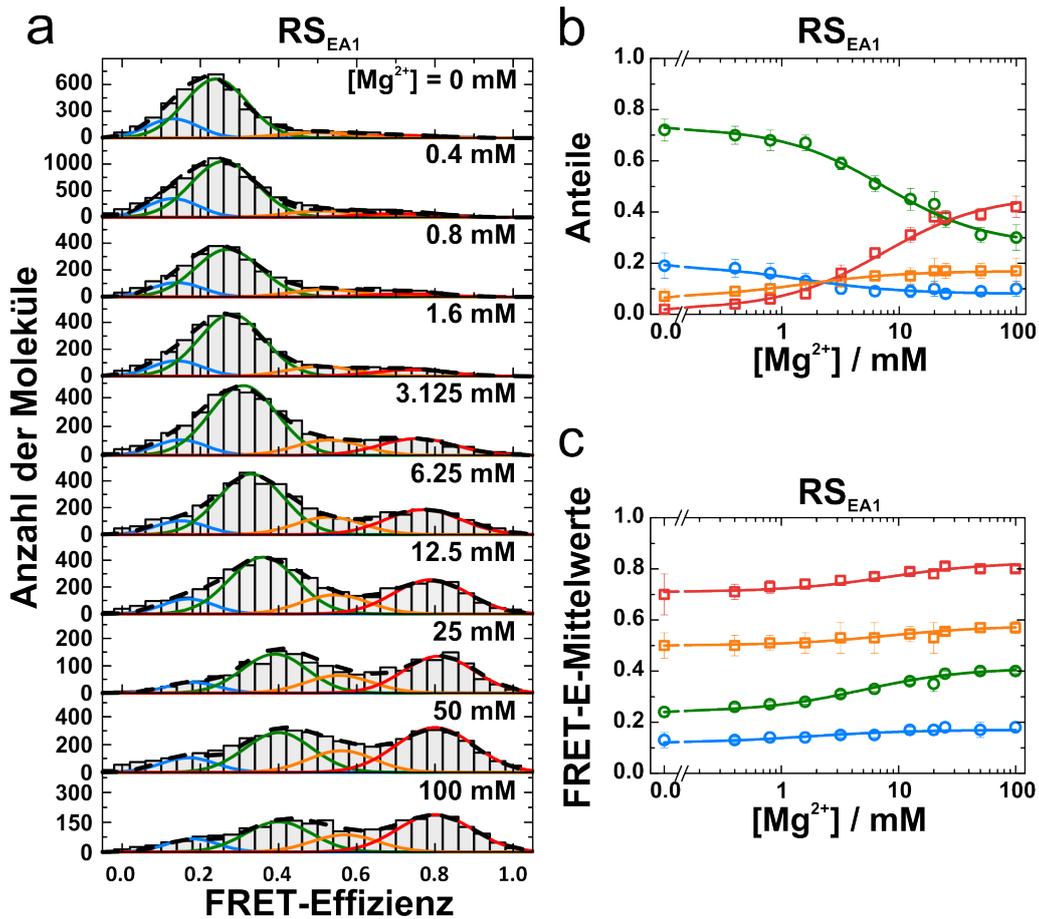


Abbildung 4.4.1: Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{EA1} -Konstrukts. (a) Einzelmolekül-FRET-Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente mit Plots der am besten passenden Gauß-Fit-Modelle der einzelnen Zustände (farbige Linien) und ihrer Summen (gestrichelte schwarze Linien). (b) Anteilige Populationen der Zustände in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration, welche aus den Fits (gezeigt in (a)), gewonnen wurden. (c) Die FRET-Effizienzmittelwerte der jeweiligen Gauß-Fit-Funktionen der einzelnen Zustände in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration. (a-c) Das Vier-Zustandsmodell ist durch die Ergebnisse der HMM-Analyse festgelegt und global für die Daten des RS_{EA1} -Konstrukts gefittet: T₁ (grün), T₂ (blau), AT₁ (rot) und AT₂ (orange).

Auch hier ist der Einfluss der zunehmenden Ionenstärke auf die Riboschalterstruktur messbar. Mit einem Unterschied von $\Delta\langle E \rangle \approx 0,07$ für beide Antiterminatorstrukturen verschiebt sich der Mittelwert der FRET-Effizienz des Zustands AT₁ auf $\langle E \rangle = 0,80$ und der des Zustands AT₂ auf $\langle E \rangle = 0,57$. Alle Verschiebungen in Abhängigkeit der Magnesiumionen lassen sich jeweils mit einer Hill-Funktion mit Übergangsmittelwertwerten von jeweils $[Mg^{2+}]_{0,5} = 8 \pm 1 \text{ mM}$ fitten. Durch iteratives Anpassen der Fitparameter konnte festgestellt werden, dass die anteiligen Populationen der Zustände T₁ und AT₁ einer Hill-Funktion mit einem Übergangsmittelwertwert von $[Mg^{2+}]_{0,5} = 8 \text{ mM}$ folgen. Die anteiligen Populationen der Zustände T₂ und AT₂ folgen einer Hill-Funktion mit $[Mg^{2+}]_{0,5} = 2 \text{ mM}$. Die Fitergebnisse sind in **Tab. 4.3** zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Ergebnisparameter des globalen Fits mit vier Gauß-Funktionen der gefundenen Zustände für das Konstrukt RS_{EA1} . Die mittleren FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle$ und die daraus berechneten Farbstoffabstände $R_{\langle E \rangle}$ sind für $[Mg^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$ und $[Mg^{2+}] > 20 \text{ mM}$ angegeben. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilungen sind in der Spalte FWHM gegeben. Die Übergangsmittelpunktwerte der Hill-Funktion bezüglich der anteiligen Populationen sind in $[Mg^{2+}]_{0,5}$ eingetragen.

Zustand	$[Mg^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$		$[Mg^{2+}] > 20 \text{ mM}$		$[Mg^{2+}]_{0,5}$	FWHM
	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$		
RS_{EA1}						
T_1	$0,24 \pm 0,03$	64	$0,40 \pm 0,03$	57	8 ± 1	$0,21 \pm 0,09$
T_2	$0,13 \pm 0,04$	73	$0,18 \pm 0,04$	68	2 ± 1	$0,16 \pm 0,07$
AT_1	$0,73 \pm 0,03$	45	$0,80 \pm 0,03$	42	8 ± 1	$0,23 \pm 0,05$
AT_2	$0,50 \pm 0,03$	53	$0,57 \pm 0,03$	51	2 ± 1	$0,21 \pm 0,07$

4.4.2 Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts RS_{AA}

Es wurde davon ausgegangen, dass die vier gefundenen Zustände des Konstrukts RS_{EA1} auch auf das Konstrukt RS_{AA} übertragbar sein sollten, mit identischen anteiligen Populationen entsprechend den jeweiligen Magnesiumionenkonzentrationen. Zwar sind die Labelpositionen der Fluoreszenzmarker beider Konstrukte verschieden, jedoch handelt es sich nach wie vor um dasselbe Riboschaltermolekül. Daher wird angenommen, dass die unterschiedlichen Fluoreszenzmarker keinen merklichen Einfluss auf die Energielandschaft der Zustände haben. Die Normalverteilungen und damit die Form der FRET-Histogramme können auf Grund der unterschiedlichen Markerpositionen sehr verschieden sein. Ebenso ist es denkbar, dass zwei Zustände, welche in einem bestimmten Konstrukt klar voneinander unterscheidbar sind, bei einem anderen Konstrukt ähnliche bis gleiche Werte für diese FRET-Effizienz liefern und daher im Histogramm miteinander verschmelzen.

Beim Konstrukt RS_{AA} konnte innerhalb dieser Arbeit ein Zusammenfallen zweier Zustände ähnlicher FRET-Effizienz beobachtet werden. Deshalb scheiterte die Übertragung des Vierzustandsmodells auf das Konstrukt RS_{AA} . Stattdessen gelang es durch den Ansatz von drei Gauß-Verteilungen, die gesamte Magnesiumionentitrationsreihe des Konstrukts RS_{AA} zu fitten. In **Abb. 4.4.2** ist erkennbar, dass die Population mit einem Mittelwert der FRET-Effizienz von $\langle E \rangle \approx 0,1$ zum einen eine gleichbleibende, anteilige Population über die gesamte Titrationsreihe aufweist (**Abb. 4.4.2 b**). Zum anderen konnte man keine Verschiebung der FRET-Effizienzmittelwerte in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Konzentration beobachten (**Abb. 4.4.2 c**). Für jede Magnesiumionenkonzentration stimmen die Populationsanteile der Gauß-Funktionen bei $\langle E \rangle \approx 0,1$ mit der Summe der Populationsanteile der Zustände T_2 und AT_2 des Konstruktes RS_{EA1} überein. Dies deutet darauf hin, dass diese beiden Zustände beim Konstrukt RS_{AA} nicht einzeln beobachtet werden konnten.

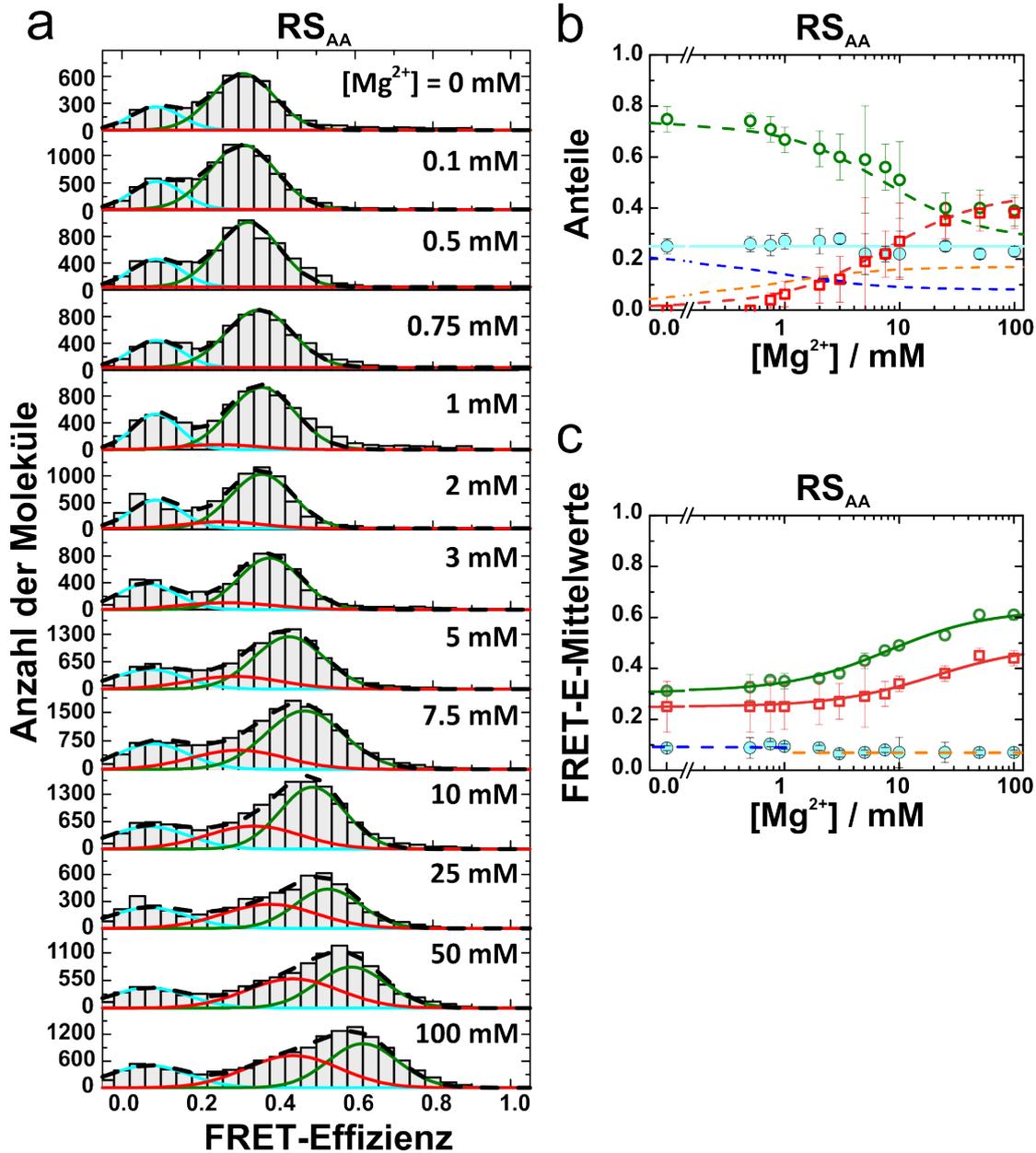


Abbildung 4.4.2: Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{AA} -Konstrukts. (a) Einzelmolekül-FRET-Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente mit Plots der am besten passenden Gauß-Fit-Modelle der einzelnen Zustände (farbige Linien) und ihrer Summen (gestrichelte schwarze Linien). (b) Anteilige Populationen der Zustände in Abhängigkeit von Magnesiumionen, welche aus den Fits (gezeigt in a)) gewonnen wurden. (c) Die FRET-E-Mittelwerte der entsprechenden Gauß-Fit-Funktionen der einzelnen Zustände in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration. Die gemittelten FRET-Effizienzwerte von 0,09 und 0,07 bei niedrigen (< 1.5 mM, blau gestrichelt) und bei hohen (> 1.5 mM, orange gestrichelt) Magnesiumionenkonzentrationen für die beiden summierten Zustände T_2 und AT_2 (cyan). (a-c) Drei-Zustandsmodell für die Daten des RS_{AA} -Konstrukts, gefittet auf der Grundlage der Fit-Ergebnisse des Konstrukts RS_{EA1} : T_1 (grün), AT_1 (rot), die Summe von T_2 und AT_2 (cyan). Die gestrichelten Linien (orange und blau, in (b)) zeigen die Populationsanteile der Zustände von RS_{EA1} aus 4.4.1 b. Die cyan-farbene Linie ergibt sich aus der Summe der orange- und der blaugestrichelten Linie.

Um einen vollständigen Satz an Zuständen zu erhalten, welcher die Histogramme der Magnesiumionentitration des Konstrukts RS_{AA} beschreibt, wurden die Populationsanteile der Zustände aus RS_{EA1} (T_1 – grüner Zustand und AT_1 – roter Zustand) den Populationsanteile im Fit der Histogramme für das Konstrukt RS_{AA} gleichgesetzt. Diese Fit-Kurve sowie die Ergebnisse der Fit-Parameter sind in **Abb. 4.4.2 a, b** dargestellt. Der Austausch der Zustände T_1 und AT_1 ergab vergleichbare Werte mit $[Mg^{2+}]_{0,5} \approx 8$ mM. Die dominierende Population bei $\langle E \rangle \approx 0,3$ wurde in Abwesenheit von Magnesiumionen dem Zustand T_1 zugeordnet. Sein FRET-Effizienzmittelwert verschiebt sich bei steigender Magnesiumionenkonzentration auf einen Wert von $\langle E \rangle = 0,61$. Für den Zustand AT_1 des Konstrukts RS_{AA} konnte in Abwesenheit von Mg^{2+} ein FRET-Effizienzmittelwert von $\langle E \rangle = 0,24$ und bei Magnesiumionenkonzentrationen von $Mg^{2+} > 20$ mM ein FRET-Effizienzmittelwert von $\langle E \rangle = 0,44$ bestimmt werden. Die Werte der FRET-Effizienzen der Zustände T_1 und AT_1 verschieben sich also mit Zunahme der divalenten Ionen. Die Verschiebungen lassen sich jeweils mit Hill-Funktionen mit $[Mg^{2+}]_{0,5} = 8 \pm 1$ mM und $[Mg^{2+}]_{0,5} = 15 \pm 2$ mM quantifizieren (**Abb. 4.4.2c**). Die Fitparameter für niedrige und hohe Magnesiumionenkonzentrationen sind in **Tab. 4.4** zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Parameter der globalen Fit-Prozedur der drei Gauß-Funktionen, gefunden für das Konstrukt RS_{AA} . Die mittleren FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle$ und die daraus berechneten Farbstoffabstände $R_{\langle E \rangle}$ sind für $[Mg^{2+}] < 0,1$ mM und $[Mg^{2+}] > 20$ mM angegeben. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilungen (FWHM) sowie die Übergangsmittelpunktwerte der Hill-Funktion der anteiligen Populationen ($[Mg^{2+}]_{0,5}$) sind in den beiden rechten Spalten eingetragen.

Zustand	$[Mg^{2+}] < 0,1$ mM		$[Mg^{2+}] > 20$ mM			
	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	$[Mg^{2+}]_{0,5}$	FWHM
RS_{AA}						
T_1	$0,31 \pm 0,04$	61	$0,61 \pm 0,04$	49	8 ± 1	$0,19 \pm 0,10$
T_2	$0,09 \pm 0,05$	78	nd	nd	nd	$0,16 \pm 0,10$
AT_1	$0,24 \pm 0,05$	64	$0,44 \pm 0,05$	55	8 ± 1	$0,24 \pm 0,10$
AT_2	nd	nd	$0,07 \pm 0,05$	81	nd	$0,16 \pm 0,10$

4.4.3 Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts RS_{EA1} in Anwesenheit des Liganden SAM

Für die Daten in Anwesenheit des Liganden SAM müssten für eine richtige Beschreibung der SAM-Titrationshistogramme vier zusätzliche Zustände eingeführt werden, was letztlich nicht praktikabel ist. Denn für eine vollständige Beschreibung der Daten in Anwesenheit des Liganden müsste ein thermodynamisches Modell erstellt werden, das die vier gefundenen Zustände aus den Messungen ohne Ligand mit den vier Zuständen aus den Messungen mit Ligand vereint.

Bei mittleren Ionen- und Ligandenkonzentrationen koexistieren alle acht Zustände simultan. Daher wurde die Auswertung auf das Histogramm mit Standardpuffer plus 20 mM Mg^{2+} und 10 μM SAM beschränkt (**Abb. 4.4.3**). Bei solch hohen Ligandenkonzentrationen ist immer ein SAM am RS gebunden. Aus früheren Messungen ist bekannt, dass der Übergangsmittelpunktswert bei ca. 36 nM liegt [67].

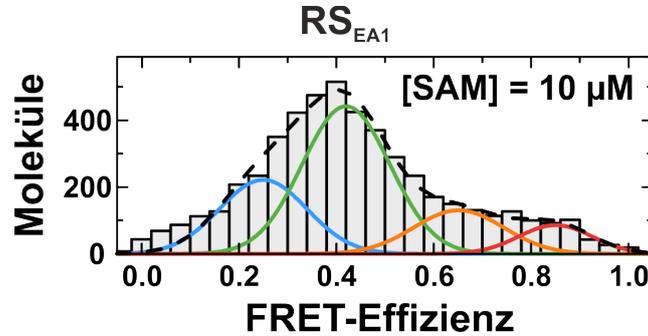


Abbildung 4.4.3: Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{EA1} -Konstrukts mit SAM. Einzelmolekül-FRET-Histogramm bei 20 mM Mg^{2+} und 10 μM SAM mit Plots der am besten passenden Gauß-Fit-Modelle der einzelnen Zustände (farbige Linien) und ihrer Summen (gestrichelte schwarze Linien). Das gezeigte Vier-Zustandsmodell ist durch die Ergebnisse der HMM-Analyse (**Abb. 4.3.3**) festgelegt und für die Daten des RS_{EA1} -Konstrukts gefittet: T_1 (P1_F) (grün), T_2 (P1_U) (blau), AT_1 (P1_F) (rot) und AT_2 (P1_U) (orange).

Für den Fit wurden die Werte bezüglich der FRET-Effizienzen der einzelnen Zustände aus der HMM-Analyse in Anwesenheit von SAM entnommen. Somit kann gezeigt werden, dass die Ergebnisse der HMM-Analyse der immobilisierten Moleküle auf die Ergebnisse der Messung an frei diffundierenden Molekülen, gemessen mit Hilfe der Burst-Analyse, übertragen werden können. Das Vier-Zustandsmodell aus den Zuständen T_1 (grün), T_2 (blau), AT_1 (rot) und AT_2 (orange) beschreibt die Verteilung der FRET-Effizienzen sehr gut. Wie erwartet überwiegen in Anwesenheit des Liganden SAM die Anteile der T-Zustände. Die Fitparameter sind in **Tab. 4.5** aufgelistet.

Tabelle 4.5: Fitparameter mit vier Gauß-Funktionen für das Konstrukt RS_{EA1} in Anwesenheit des Liganden SAM ($[\text{SAM}] = 10 \mu\text{M}$) und 20 mM Mg^{2+} . Gezeigt werden die FRET-Effizienzmittelwerte $\langle E \rangle$ und die daraus berechneten Farbstoffabstände $R_{\langle E \rangle}$. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilungen sind in der Spalte FWHM gegeben.

Zustand	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	FWHM
$\text{RS}_{\text{EA1}} + \text{SAM}$			
T_1	$0,45 \pm 0,06$	55	$0,21 \pm 0,18$
T_2	$0,28 \pm 0,16$	62	$0,21 \pm 0,13$
AT_1	$0,87 \pm 0,12$	39	$0,17 \pm 0,14$
AT_2	$0,67 \pm 0,10$	47	$0,22 \pm 0,44$

4.4.4 Strukturbasierte Abstandsschätzungen

Um den gefundenen Zuständen entsprechende dreidimensionale Strukturen zuweisen zu können, wären präzise Vermessungen von vollständigen SAM-I-RS-Molekülkristallen mit Röntgenstrukturanalyse nötig. Jedoch sind momentan solche Messungen nur von SAM-I-Riboschaltern ohne Expressionsplattform verfügbar [56, 57]. Mit Hilfe einfacher Strukturmodellierungen können dennoch mögliche Faltungszustände und die daraus resultierenden Farbstoffabstände der jeweiligen Konstrukte errechnet werden. Durch den Vergleich von errechneten und gemessenen FRET-Effizienzwerten können den gemessenen Faltungszuständen modellierte Strukturen zugewiesen werden. Dies erlaubt, ein sinnvolles Faltungsmodell zu erstellen. In den **Abb. 4.4.4, 4.4.5, 4.4.6, 4.4.7** und **4.4.8** sind strukturelle Modelle von T- und AT-Konformationen der Konstrukte RS_{EA1} , RS_{AA} und RS_{EA2} skizziert sowie deren Abstandsabschätzungen angegeben. Die strukturellen Abschätzungen zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen beinhalten Abstandsberechnungen für aufgewickelte RNS (r_c), helikale RNS mit Farbstoffmarkern auf denselben Strangseiten (r_{hs}) oder (r_{hc}) auf gegenüberliegenden Strangseiten, und für strukturierte RNS (r_s). Mittlere Abstände aufgewickelter RNS-Segmente sind stark magnesiumionen-abhängig, weshalb für niedrige (cyan) und hohe (magenta) Ionenstärke zwei Werte angegeben sind. Für die T-Konformation wurden zwei Strukturen angenommen: Eine, bei der die P1-Helix geschlossen ist und eine andere, bei der die P1-Helix geöffnet ist.

Im Fall der AT-Konformation finden wir eine teilweise oder komplett geöffnete P1-Helix vor. Dabei gehen Teile der P1-Helix und der T-Helix aus der T-Konformation in die AT-Helix über. Eine offensichtliche AT-Struktur besteht dabei aus einer komplett geöffneten P1-Helix, sodass das 3'- und das 5'-Ende im Mittel gesehen weit voneinander entfernt sind.

Wenn man jedoch beachtet, dass die strukturellen Übergänge der AT-Zustände ineinander schneller sind als Übergänge zwischen den beiden T-Zuständen, dann erscheint es unwahrscheinlich, dass innerhalb der AT-Konformation die Übergänge von einer komplett geöffneten zu einer geschlossenen Helix aus nicht benachbarten Nukleotiden stattfindet. Bezüglich der beobachteten Übergangszeiten von einigen Zehntelsekunden sind Tertiärstrukturänderungen von RNS-Molekülen viel wahrscheinlicher [140, 148, 188].

Wie von Boyapati et al. [68] vorgeschlagen, wird angenommen, dass die AT-Helix durch koaxiales Stapeln die Bildung einer stabilen drei-Basenpaar-langen P1-Helix (als P1' markierte Struktur) ermöglicht. Weiterhin bilden vier Nukleotid-Paare des 3'- und des 5'-Endes eine Teilhelix (benannt P1''), welche sich wiederum mit den beiden anderen (AT und P1') zu einer Drei-Helixkreuzung formiert (**Abb. 4.4.4 d**).

Basierend auf diesen Modellen konnten die Abstände zwischen den C5-Atomen der Uridin-Basen, an welchen die Fluoreszenzmoleküle gebunden sind, aus den einzelnen diskreten Teilsegmenten berechnet werden.

Diese Teilsegmente sind:

- (i) Abstände, bestimmt aus der Kristallstruktur des SAM-I-Riboschalters; (PDB-ID: 4KQY) [56]
- (ii) ein RNS-Helixmodell;
- (iii) eine Gauß-Kette als Näherung für die Einzelstrangteile [189].

4.4 Quantitative Analyse der FRET-Histogramme mit vier Zuständen

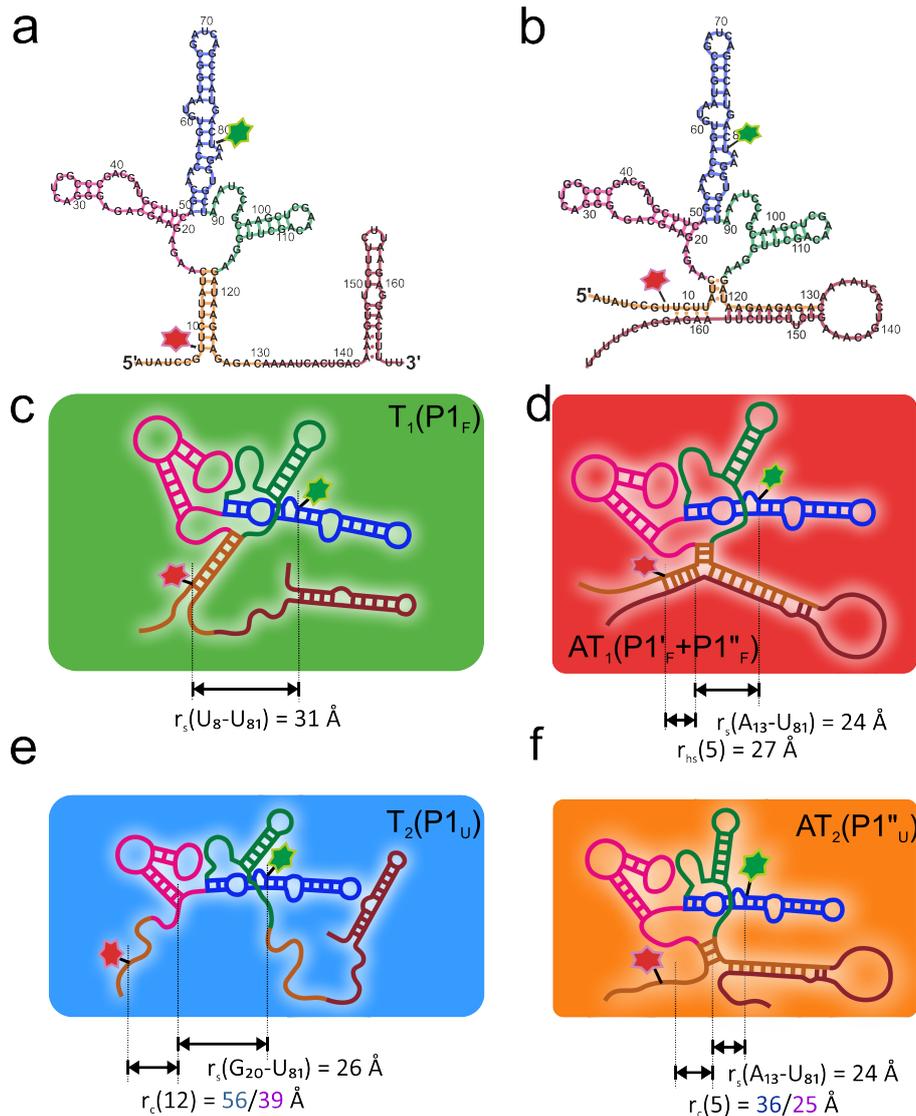


Abbildung 4.4.4: Strukturelle Modelle der T- und AT-Konformation des RS_{AA} -Konstrukts. Sekundärstrukturen des T- (a) und des AT-Zustands (b) mit den entsprechenden Markerpositionen der Fluoreszenzfarbstoffe. (c) Die $T_1(P1_F)$ -Struktur mit geschlossener $P1$ -Helix und ausgebildeter T-Haarnadelschleife sowie einer geschlossenen Aptamerstruktur; (d) $AT_1(P1'_F + P1''_F)$ besitzt geschlossene $P1'$ -, $P1''$ - und AT-Helices, welche zusammen eine Drei-Wege-Kreuzung bilden. Das Aptamer besitzt eine ausgebildete Bindungstasche. (e) $T_2(P1_U)$ besitzt im Gegensatz zu $T_1(P1_F)$ eine offene $P1$ -Helix und zeigt daher für das Konstrukt RS_{AA} die kleinste FRET-Effizienz. (f) Die $AT_2(P1''_U)$ -Konformation hat eine geformte $P1'$ - und AT-Helix.

Im Allgemeinen ist die Gauß-Kette eine gute Abschätzung der wurmartigen Kette (*engl. worm-like-chain, WLC*) für den Fall, dass die Konturlänge viel größer ist als die Persistenzlänge [190].

Zur Berechnung der Längen der RNS-Helices setzt man das in **Kapitel 2.2.4** beschriebene α -Helixmodell der DNS an. Für die Abstände zweier Nukleotide am gleichen Strang beziehungsweise am gegenüberliegenden Strang setzt man jeweils die **Gl. 2.24** beziehungs-

4 Ergebnisse und Diskussion

weise **2.25** an. Für die Berechnung von r_{hs} und r_{hc} wurde für die Bindungslänge $l = 6,3 \text{ \AA}$ angesetzt. Für die Persistenzlänge l_p , die stark abhängig ist von der Mg^{2+} -Konzentration der Pufferlösung, wurde für niedrige Konzentrationen ($< 0,1 \text{ mM}$) $l_p = 21 \text{ \AA}$ und für hohe Konzentrationen ($> 4 \text{ mM}$) $l_p = 10 \text{ \AA}$ angesetzt [190].

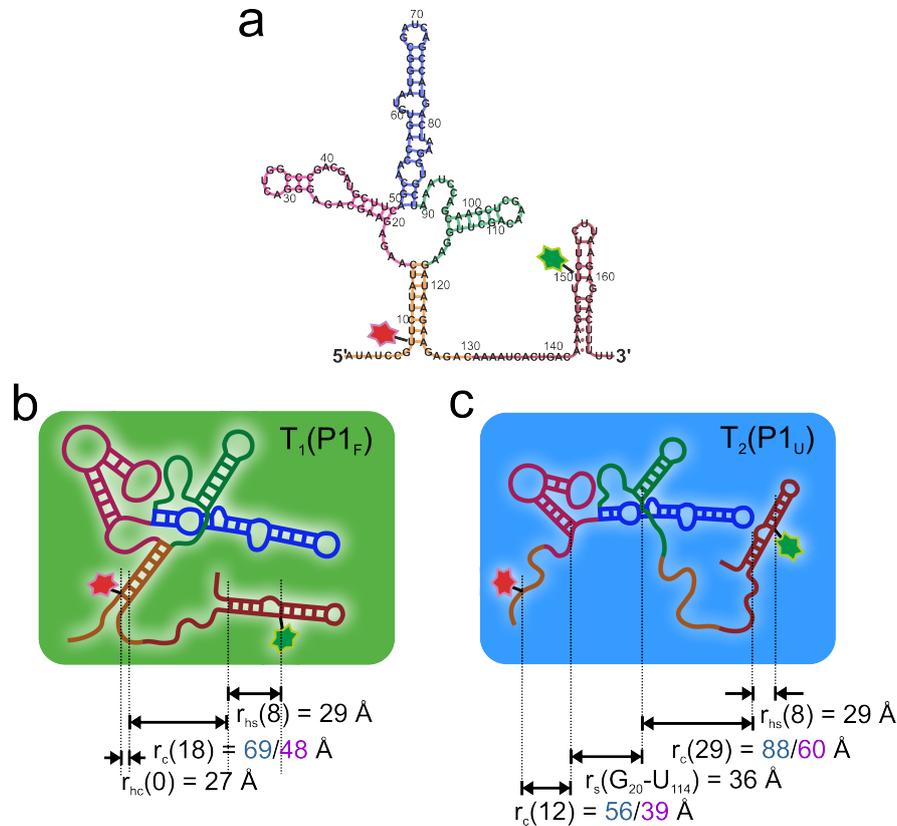


Abbildung 4.4.5: Strukturelle Modelle der T-Konformation des RSE_{EA1}-Konstrukts. (a) Sekundärstruktur des T-Zustands mit den entsprechenden Markerpositionen der Fluoreszenzfarbstoffe. (b) Die T₁(P1_F)-Struktur mit geschlossener P1-Helix und ausgebildeter T-Haarnadelschleufe sowie einer geschlossenen Aptamerstruktur. (c) T₂(P1_U) besitzt eine offene P1-Helix und erzeugt für das Konstrukt RSE_{EA1} die kleinsten FRET-Effizienzen.

Zusätzlich dazu muss beachtet werden, dass die C5-Position des Nukleotides mit dem Fluoreszenzfarbstoff über einen flexiblen Linker verbunden ist. Dieser aus 16 C-Atomen bestehende Linker wurde mit dem Abstand $r_{Linker} = 8,6 \text{ \AA}$ abgeschätzt, indem eine Gauß-Kette angesetzt wurde. Die durch den flexiblen Linker möglichen Bewegungen des Fluoreszenzfarbstoffes, gebunden an einen unstrukturierten RNS-Strang, erfolgen schneller als auf der Millisekundenskala messbar. Dies konnte durch Fluoreszenzanisotropiemessungen gezeigt werden [148, 191].

Die Fluoreszenzlinker werden daher als Verlängerung der RNS-Kette angesehen und sind in den Berechnungen berücksichtigt. Wenn ein Fluoreszenzmolekül an eine Doppelhelix gebunden ist, bewegt es sich ungefähr kugelförmig um seine Bindungsstelle hin und her.

4.4 Quantitative Analyse der FRET-Histogramme mit vier Zuständen

Daher mittelt sich der Längenbeitrag der Fluoreszenzlinker zur Berechnung der FRET-Paarabstände für den Fall, dass sich beide Fluoreszenzfarbstoffe auf der gleichen Helix-seite befinden [192].

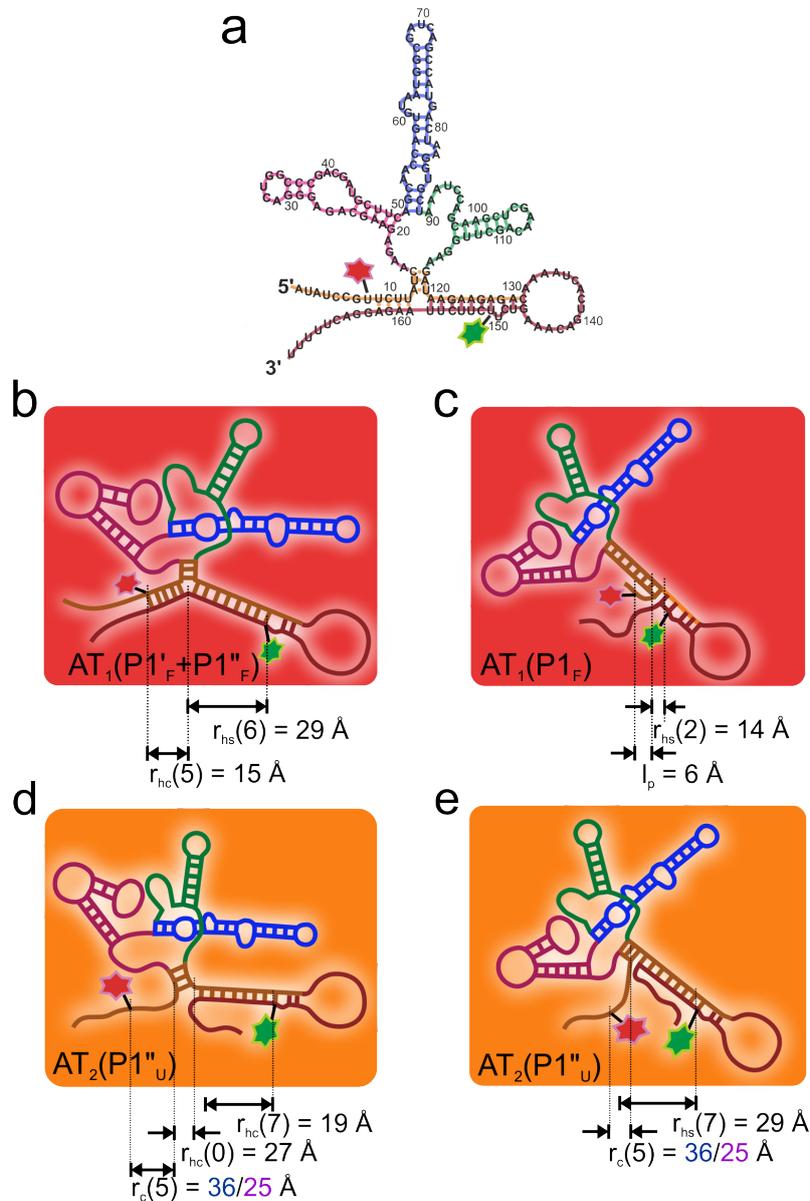


Abbildung 4.4.6: Strukturelle Modelle der AT-Konformation des RS_{EA1} -Konstrukts. (a) Sekundärstruktur des AT-Zustands mit den entsprechenden Markerpositionen der Fluoreszenzfarbstoffe. (b) $AT_1(P1'_F + P1''_F)$ besitzt eine geschlossene $P1'$ -, $P1''$ - und AT-Helix, welche zusammen eine Drei-Wege-Kreuzung bilden. Das Aptamer besitzt eine ausgebildete Bindungstasche. (c) Die $AT_1(P1_F)$ -Struktur besitzt eine geschlossene, kurze AT-Helix, gestapelt auf einer vollständig ausgebildeten $P1$ -Helix. (d) $AT_2(P1''_U)$ besitzt eine vollständige AT-Helix, eine geschlossene $P1'$ -Helix und eine offene $P1''$ -Helix. (e) Die $AT_2(P1''_U)$ -Konformation hat eine geformte $P1'$ -Helix, gestapelt auf einer vollständigen AT-Helix.

4 Ergebnisse und Diskussion

Sind jedoch beide Linker an gegenüberliegenden Seiten der Helix angebracht, so tragen deren Längen zum Gesamtabstand bei. Außerdem beschränken komplexe Tertiärstrukturen des RNS-Moleküls selbst den möglichen Aufenthaltsort der Fluoreszenzfarbstoffe [68]. In dieser Arbeit konnten durch strukturbasierte Abstandsschätzungen selbst mit einfachen Methoden wichtige Einblicke in das Faltungsverhalten des SAM-I-Riboschalters erlangt werden.

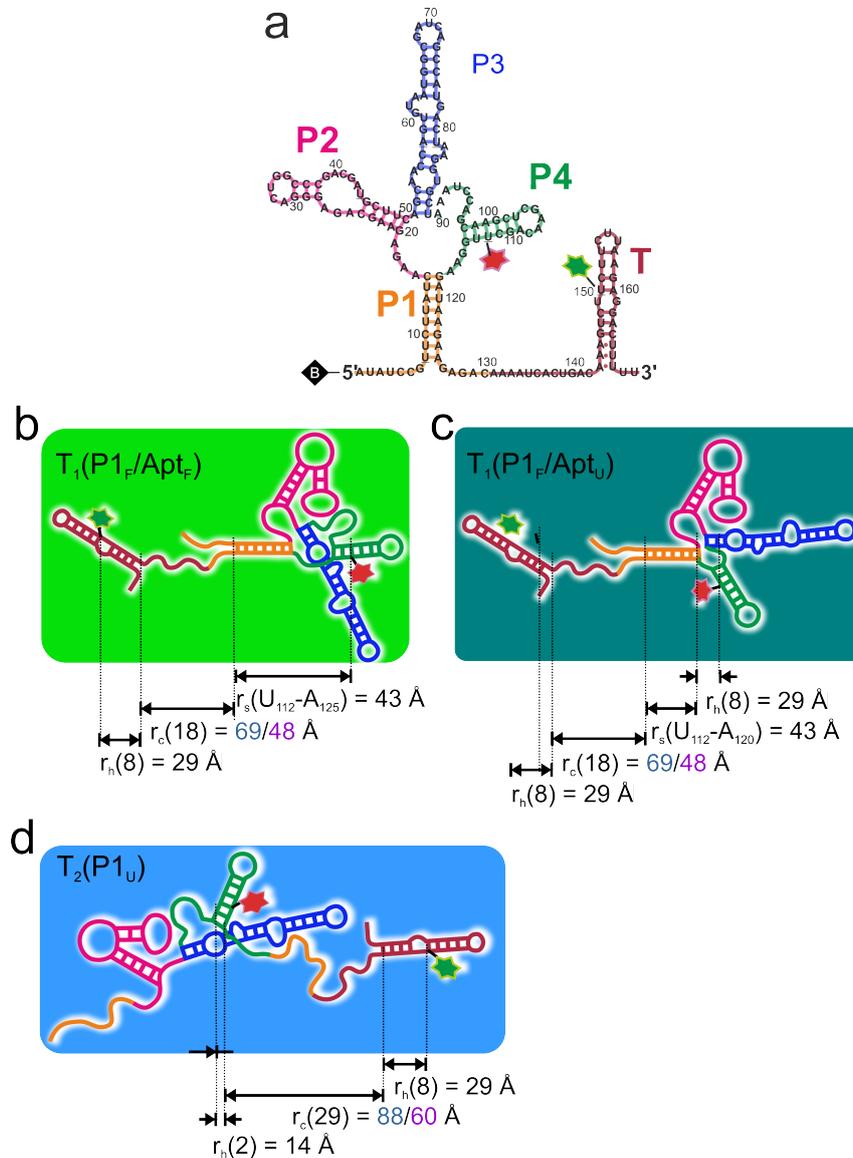


Abbildung 4.4.7: Strukturelle Modelle der T-Konformation des RSE_{A2}-Konstrukts. (a) Sekundärstruktur des T-Zustands mit den entsprechenden Markerpositionen der Fluoreszenzfarbstoffe. (b) T₁(P1_F/Apt_F)-Struktur mit geschlossener P1-Helix und ausgebildeter T-Haarnadelschleufe sowie einer geschlossenen Aptamerstruktur. (c) T₁(P1_F/Apt_U)-Struktur mit geschlossener P1-Helix und ausgebildeter T-Haarnadelschleufe sowie einem offenem Aptamer. (d) T₂(P1_U) besitzt im Gegensatz zu T₁(P1_F/Apt_F) eine offene P1-Helix.

4.4 Quantitative Analyse der FRET-Histogramme mit vier Zuständen

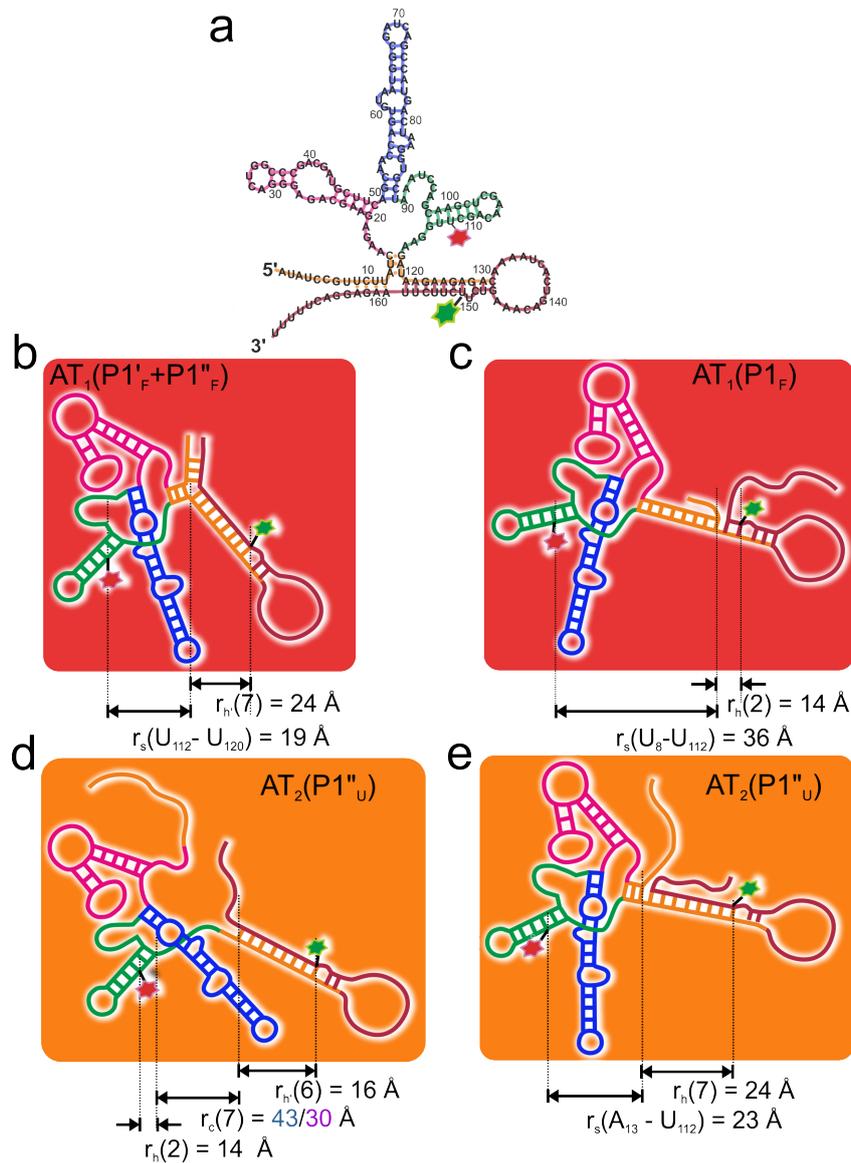


Abbildung 4.4.8: Strukturelle Modelle der AT-Konformation des RSE_{A2} -Konstrukts. (a) Sekundärstruktur des AT-Zustands mit den entsprechenden Markerpositionen der Fluoreszenzfarbstoffe. (b) $AT_1(P1'_F + P1''_F)$ besitzt geschlossene $P1'$ -, $P1''$ - und AT-Helices, welche zusammen eine Drei-Wege-Kreuzung bilden. Das Aptamer besitzt eine ausgebildete Bindungstasche. (c) $AT_1(P1_F)$ besitzt eine geschlossene $P1$ -Helix mit kurzer AT-Helix. Das Aptamer besitzt eine ausgebildete Bindungstasche. (d) Die $AT_2(P1''_U)$ -Konformation hat eine offene $P1'$ - und $P1''$ -Struktur mit vollständig ausgebildeter AT-Helix. (e) Die $AT_2(P1''_U)$ -Konformation hat eine geformte $P1'$ -Helix mit Einzelstranghälfte und einer vollständigen AT-Helix. Die $P1'$ - und die AT-Helix sind aufeinander gestapelt.

4.4.5 Interpretation und Diskussion der strukturellen und dynamischen Eigenschaften der SAM-I-Konformationen

Aus den anteiligen Populationen der einzelnen Zustände konnten die Differenzen der Gibbschen freien Energien ΔG für niedrige (0 mM) und hohe (15 mM) Magnesiumionenkonzentrationen sowie in Anwesenheit des Liganden SAM berechnet werden (siehe **Gl. 3.24**). Als Referenzzustand zur Berechnung von ΔG wurde der Terminatorzustand T_2 ausgewählt. Die daraus gewonnenen ΔG -Werte sind in **Abb. 4.4.9 a-c** zu sehen. Mit Hilfe des kinetischen Netzwerks (siehe **Abb. 4.3.2 c** und **Abb. 4.3.3 c**) und einer kinetischen Gruppenanalyse konnten auch die Werte der Equilibrierungszeiten τ_{eq} (**Gl. 3.24**) zwischen den Zuständen bestimmt werden. Diese hängen logarithmisch von Übergangsbarrrieren zwischen den ΔG -Werten der Zustände ab, welche während eines strukturellen Übergangs überwunden werden müssen (gezeigt in **Abb. 4.4.9 b, c**).

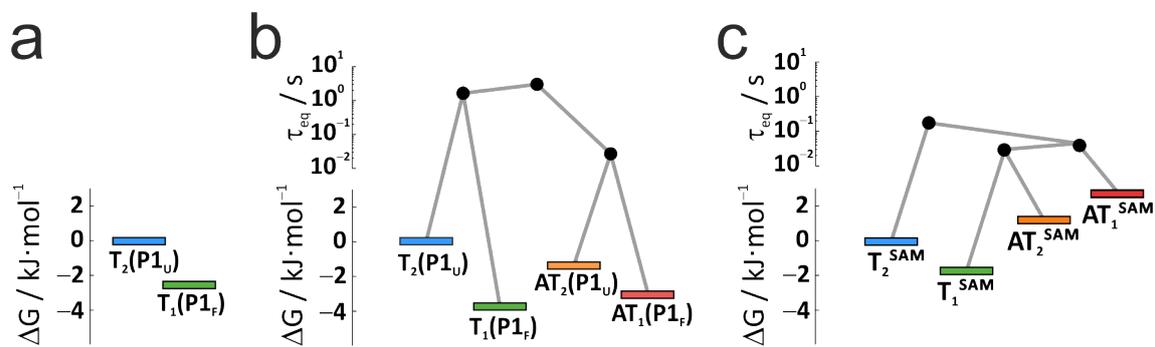


Abbildung 4.4.9: Energielandschaft des SAM-I-Riboschaltermoleküls. (a-c) Gibbsche freie Energien für unterschiedliche Pufferbedingungen: (a) 0 mM Mg^{2+} , (b) 15 mM Mg^{2+} und (c) 15 mM Mg^{2+} mit 10 μM SAM, welche aus den Populationsanteilen π_i (siehe **Gl. 3.24**) der einzelnen Zustände berechnet wurden, wobei der T_2 -Zustand jeweils als Referenzzustand festgelegt wurde. (b, c, oben) Equilibrierungszeiten zwischen den Zuständen, angeordnet im Zustandsübergangspfad, aufgetragen auf einer logarithmischen Skala.

Die FRET-Effizienz $\langle E \rangle$, welche die Abstände R zwischen zwei Fluoreszenzmarkern beschreibt, konnte ferner genutzt werden, um strukturelle Eigenschaften des RS-Moleküls zu erschließen. Ein genauer quantitativer Vergleich mit strukturellen Modellen konnte nicht durchgeführt werden, da nur gemittelte Strukturen (gemessen mit Röntgenstrukturanalyse) der alleinigen Aptamerdomäne mit und ohne Ligand existieren [56, 57]. Daher konnten die erstellten Modelle nur unter Annahme einfacher Strukturmodelle bezüglich der Expressionsplattform abgeschätzt werden. Die Berechnung der Abstände und die daraus resultierenden strukturellen Schätzungen sind in **Kapitel 4.4.4** gezeigt. Die Strukturen, welche am besten auf die Messergebnisse bezüglich Abstand und Dynamik passten, sind als ein schematisches Zustandsmodell in **Abb. 4.4.10** zusammengefasst.

In Abwesenheit von Magnesiumionen und SAM sehen sich die Histogramme von RS_{AA} und RS_{EA1} ähnlich (**Abb. 4.4.2 a** und **Abb. 4.4.1 a**). Beide Konstrukte haben ihren Akzeptor am U_8 -Nukleotid der P1-Helix gebunden (**Abb. 2.2.4**), jedoch sind die Positionen

4.4 Quantitative Analyse der FRET-Histogramme mit vier Zuständen

der Donormarker verschieden (siehe **Abb. 4.1.1**). Die Ähnlichkeit beider Histogramme lässt vermuten, dass sich die beiden gefundenen Zustände für jedes Konstrukt strukturell bezüglich der P1-Region unterscheiden. Diese Zustände besitzen eine offene (niedrige FRET-Effizienz) und eine geschlossene, kompakte Struktur (höhere FRET-Effizienz), welche hier jeweils als $T_2(P1_U)$ und $T_1(P1_F)$ bezeichnet werden (siehe **Abb. 4.4.9 a, b** und **Abb. 4.4.10 a, b**).

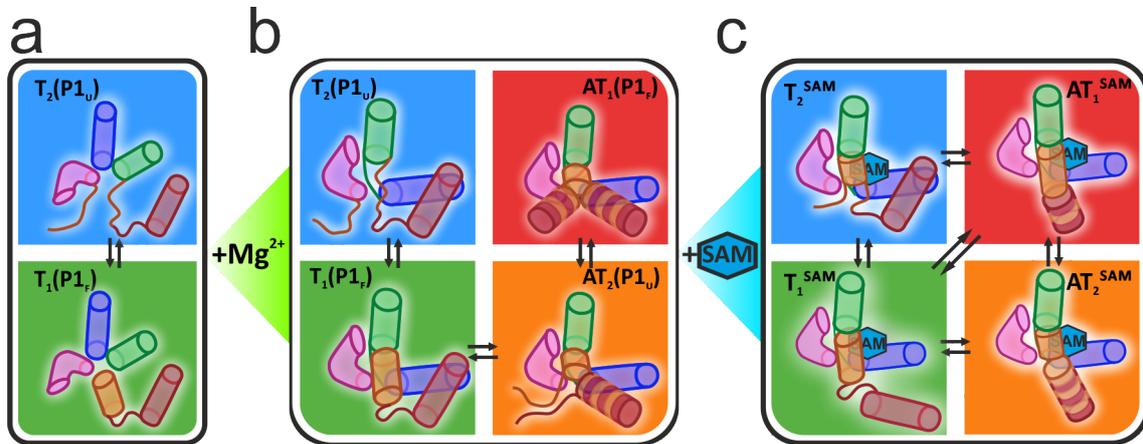


Abbildung 4.4.10: Die Faltungszustände des SAM-I-Riboschalters. (a-c) Schematische Darstellung der Konformationen und ihrer möglichen Übergänge, angedeutet durch schwarze Pfeile. (a) Bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen koexistieren zwei T-Zustände mit offener Aptamerdomäne. (b) Bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen beobachtet man eine kompaktere Aptamerstruktur, zusammen mit zwei AT-Zuständen im thermischen Gleichgewicht. (c) Bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen in Anwesenheit von SAM wird die Aptamerstruktur noch kompakter. Die AT- und T-Zustände können weiterhin im thermischen Gleichgewicht beobachtet werden.

Mit steigender Mg^{2+} -Konzentration wird einerseits $T_1(P1_F)$ gegenüber der $T_2(P1_U)$ -Struktur stabilisiert und andererseits erzeugt dies eine deutliche Verschiebung der FRET-Wertverteilung hin zu höheren Werten. Eine solche Verschiebung deutet auf eine Erhöhung der strukturellen Kompaktheit für den $T_1(P1_F)$ -Zustand für beide Konstrukte hin (**Abb. 4.4.2 c** und **Abb. 4.4.1 c**). Für $T_1(P1_F)$ des RS_{AA} -Konstrukts bedeutet dies konkret, dass man mit $\langle E \rangle = 0,61$ einen Markerabstand von $R = 49 \text{ \AA}$ erhält. Unter Einbeziehung der Tatsache, dass beide Fluoreszenzmarker mit flexiblen Linkern am Riboschalter angebracht sind, entspricht dieser Abstand der erwarteten kompakten Aptamerstruktur. Für $T_1(P1_F)$ des RS_{EA1} -Konstrukts findet man $\langle E \rangle = 0,4$ und damit $R = 61 \text{ \AA}$ bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen. Das heißt, es existiert eher eine kompakte Anlagerung eines Teils der Expressionsplattform an das Aptamer als eine vollständig ausgedehnte Struktur. Die vergleichsweise langsame Equilibrierungszeit zwischen den beiden Zuständen ($\tau_{eq} = 1,6 \text{ s}$) spricht für die niedrige Wahrscheinlichkeit, dass sich nicht angrenzende RNS-Teile zu einer vollständigen P1-Helix verbinden (**Abb. 4.4.10 b**).

Die Tatsache, dass der $T_2(P1_U)$ - sowie der AT_2 -Zustand für das Konstrukt RS_{AA} nicht getrennt voneinander beobachtet werden können (siehe **Abb. 4.4.2 a** und **Abb. 4.4.1 a**), muss bedeuten, dass das 5'-Ende der P1-Helix für beide Zustände eine ähnliche Anordnung

einnimmt. Da eine Übernahme der Watson-Crick-Basenpaarungen durch die Expressionsplattform im Zustand AT_2 die Ausbildung einer vollständigen P1-Helix ausschließt, wird die Annahme bekräftigt, dass für den T_2 ($P1_U$)-Zustand eine nur teilweise ausgebildete P1-Helix existiert. Möglicherweise wird die kurze P1-Helix ($P1''$), bestehend aus vier Basenpaaren, im Zustand AT_2 aufgebrochen, womit die AT-Helix teilweise auf die restliche P1-Helix gestapelt wird. Für diesen Zustand wurde bislang angenommen, dass er als transkriptioneller „AN“-Zustand wirkt [68]. Der andere AT-Zustand AT_1 besitzt höhere FRET-Werte und damit kleinere Markerabstände als AT_2 . Außerdem finden wir, dass AT_1 und AT_2 sehr schnell miteinander equilibrieren ($\tau_{eq} = 0,03$ s). Diese Zeitskalen sind typisch für Tertiär- oder kleinere Sekundärstrukturänderungen. Folglich wäre eine Struktur aus drei gekreuzten Helices von $P1'$, $P1''$ und der AT-Helix möglich (**Abb. 4.4.10 b, rot**). Die langsamsten Austauschzeiten findet man für die Übergänge zwischen den Zustandsgruppen T_1/T_2 und AT_1/AT_2 im Bereich von $\tau_{eq} = 3$ s. Zustandsübergänge auf diesen Zeitskalen sind typisch für größere Sekundärstrukturänderungen. Genau das ist der Fall bei der Faltung von T zu AT, da hier sowohl eine komplette Umorientierung der Expressionsplattform als auch der P1-Helix stattfinden muss.

In der SAM-gebundenen Form erwarten wir ähnliche T-Konformationen wie in dessen Abwesenheit, da der Ligand zwar die Faltung von AT- zu T-Zuständen beeinflusst, aber keinen direkten Einfluss auf die Expressionsplattform an sich ausübt. Aus (**Abb. 4.3.3** und **Abb. 4.4.10 c**) ist ersichtlich, dass die ΔG -Werte der T-Zustände mit SAM gegenüber den Zuständen ohne SAM reduziert sind. Weiterhin sind die $\langle E \rangle$ -Werte höher in Anwesenheit von SAM. Daraus lässt sich vermuten, dass durch eine stärkere Stabilisierung der Aptamerdomäne eine durch die SAM-Bindung verursachte Re-Orientierung der P1-Helix entsteht [57, 60]. Diese Re-Orientierung kommt durch die Zusammenführung der $U_{14} - A_{119}$ - und der $C_{15} - G_{118}$ -Basenpaare durch die dortige Bindung von SAM. Ebenso werden die ΔG -Werte der AT-Zustände gegenüber T_1 und T_2 angehoben. Dies könnte begründet werden mit der Stabilisierung der P1-Helix durch die Bindung des Liganden. Diese Stabilisierung ist auch für den AT_2^{SAM} -Zustand beobachtbar, dessen AT-Haarnadelschleife auf der P1-Helix gestapelt ist und dadurch höhere FRET-Effizienzwerte als AT_2 (0,67 vs. 0,57) besitzt. Die Struktur von AT_1^{SAM} und dessen kurze Labelabstände ($\langle E \rangle = 0,87$, $R = 42$ Å) können durch eine koaxiale Stapelung der AT- auf die P1-Helix begründet werden. Auffällig ist, dass die Equilibrierungszeiten zwischen jedem Zustandspaar von AT_1^{SAM} , AT_2^{SAM} und T_1^{SAM} mit $\tau_{eq} = 0,04$ s vergleichbar sind mit den Equilibrierungszeiten zwischen den AT-Zuständen ohne Liganden. Darüber hinaus sind die Equilibrierungszeiten in Anwesenheit des Liganden SAM zwischen T_2^{SAM} und den anderen drei Zuständen mit ($\tau_{eq} = 0,17$ s) im Vergleich zu den Zeiten in Abwesenheit des Liganden SAM deutlich kleiner. Der hier durch SAM induzierte beobachtete, erleichterte Wechsel zwischen den AT- und T-Strukturen kann durch eine RNS-Strang-Übernahme erklärt werden: Durch das Öffnen und Schließen der P1-Helix auf Grund der Bildung von Basenpaaren kann entweder die AT-Helix oder wieder die P1-Helix ausgebildet werden. Ein solcher Ablauf wurde schon häufig sowohl durch Simulationen gezeigt als auch durch Experimente bewiesen [68, 193, 194]. Huang et al. [194] konnten durch eine Molekulardynamik-Simulation zeigen, dass eine solche RNS-Strang-Übernahme, gestartet mit der AT-Helix, zur vollständigen Ausbildung der P1-Helix führt.

4.4.6 Analyse der FRET-Histogramme des Konstrukts RS_{EA2}

Der Ansatz, die vier gefundenen Zustände und deren Mg^{2+} -Abhängigkeit auf das RS_{EA2} -Konstrukt zu übertragen, hatte keinen Erfolg. **Abb. 4.4.11 a** hilft bei der Erklärung, weshalb man im Histogramm bei 0 mM Mg^{2+} deutlich zwei Subpopulationen erkennen kann, deren FRET-Effizienzmittelwerte bei $\langle E \rangle \approx 0,15$ und $\langle E \rangle \approx 0,7$ liegen. Ausgehend von den Populationsanteilen der quantitativen Analyse der magnesiumionenabhängigen RS_{EA1} -Histogramme in Abwesenheit des Liganden SAM könnte man in Versuchung kommen, diese Populationen als $T_1 (P_{1F})$ und $T_2 (P_{1U})$ zu interpretieren. Die Populationen mit FRET-Effizienzen $E > 0,5$ könnten den Zuständen $AT_1 (P_{1U})$ und $AT_2 (P_{1U})$ zugeordnet werden, da mit steigender Ionenkonzentration die Populationsanteile höherer FRET-Effizienzen zunehmen. Ein solcher Fitansatz würde jedoch dazu führen, dass die Breite der Gauß-Verteilung stark zunehmen müsste, um das Histogramm vernünftig zu fiten. Zusätzlich würden dann die Populationsanteile viel größer werden als im bisherigen Modell. Dieses Modell wäre dann jedoch inkonsistent mit dem Fitmodell des Konstrukts RS_{EA1} .

Stattdessen kann eine solche Verbreiterung mit einer Erhöhung der Heterogenität an Zuständen interpretiert werden. Dies deutet an, dass mit dem Konstrukt RS_{EA2} ein weiterer Zustand beobachtbar ist. Folglich müssten sich die Histogramme von RS_{EA2} mit einem Fünf-Zustandsmodell (fünf Gauß-Verteilungen) global fiten lassen. Die Verbreiterung der Populationen bei niedrigen FRET-Effizienzen lässt also vielmehr darauf schließen, dass die Subpopulation des $T_1 (P_{1F})$ -Zustandes des RS_{EA1} -Konstrukts in zwei Zustände aufgespalten werden kann. Um eine konsistente Beschreibung bezüglich der gefundenen Zustände aus RS_{EA1} zu bekommen, wurde der $T_1 (P_{1F})$ -Zustand bei RS_{EA2} in zwei Zustände aufgespalten.

Diese beiden Zustände können im Fall des RS_{EA1} -Konstrukts zwar nicht spektroskopisch voneinander aufgelöst werden, jedoch weisen die großen, stetigen Verschiebungen der Peak-Positionen mit steigender Mg^{2+} -Konzentration für RS_{EA1} und RS_{AA} auf die Existenz von zwei Zuständen hin. Um den Datensatz des RS_{EA2} -Konstrukts konsistent zu allen anderen Konstrukten zu beschreiben, wurden die Daten zunächst mit fünf Gauß-Verteilungen gefittet. Dann wurden die Populationsanteile des Zustandes $T_1 (P_{1F}/Apt_F)$ aus der Differenz von $T_1 (P_{1F})$ und $T_1 (P_{1F}/Apt_U)$ berechnet. Letztlich konnten die Histogramme der RS_{EA2} -Konstrukts mit fünf Zuständen global gefittet werden. Dafür wurden die Populationsanteile aller Zustände aus dem Fit-Modell des Konstrukts RS_{EA1} entnommen und diese eingeschränkt. Die Zu- beziehungsweise Abnahme der Populationsanteile wurden für das Fitmodell wieder den entsprechenden Hill-Funktion angepasst. Damit konnte sichergestellt werden, dass die Populationsanteile der Zustände $T_1 (P_{1F}/Apt_U)$ und AT_1 innerhalb ihrer Fitfehler einer Hill-Funktion mit $[Mg^{2+}]_{0,5} = 8$ mM folgten. Die Populationsanteile der Zustände T_2 und AT_2 wurden entsprechend dem Fitmodell des Konstrukts RS_{EA1} auf Hill-Funktionen mit jeweils $[Mg^{2+}]_{0,5} = 2$ mM beschränkt. Somit konnte eine konsistente Beschreibung in Abhängigkeit von Magnesiumionen ohne Ligand für alle Konstrukte erreicht werden. Die Fit-Resultate sind in **Abb. 4.4.11** zu sehen. Angefangen mit einem Vier-Zustandsmodell für RS_{EA1} , welches durch die HMM-Analyse aus kinetischen Daten festgelegt wurde, konnte man feststellen, dass die Zustände $T_2 (P_{1U})$ und $AT_2 (P_{1U})$ in den Histogrammen von RS_{AA} in einer Subpopulation zusammenfal-

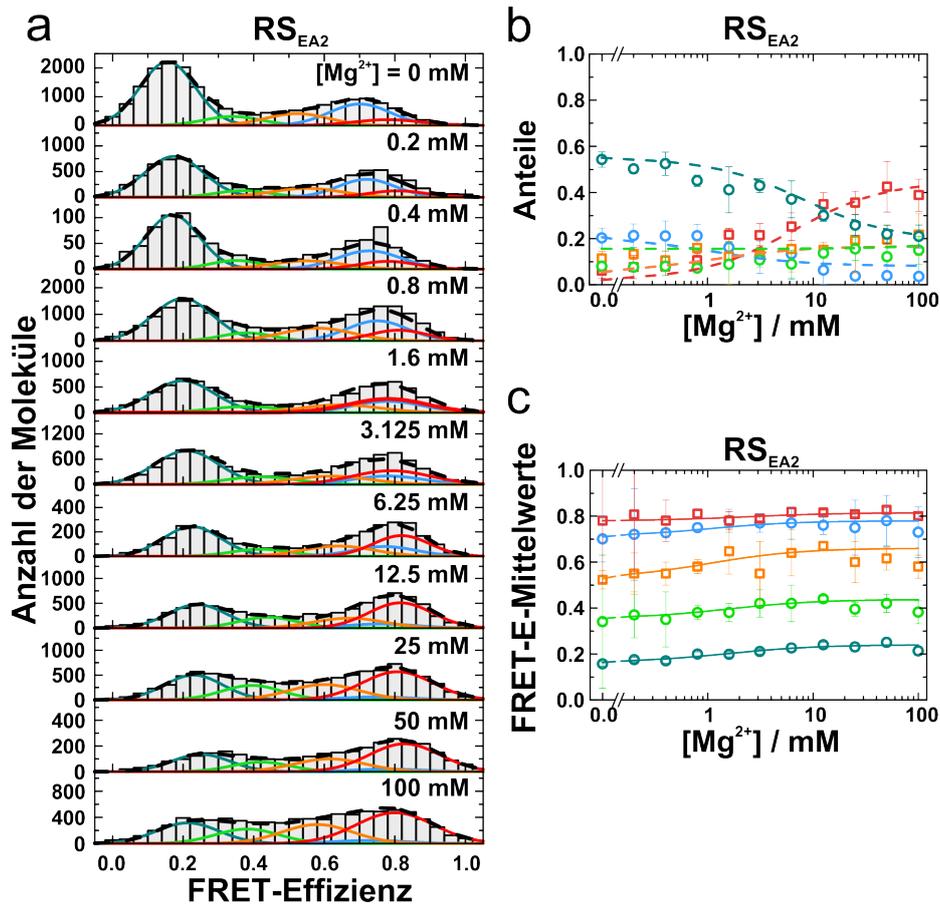


Abbildung 4.4.11: Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{EA2} -Konstrukts. (a) Einzelmolekül-FRET-Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente mit Plots der am besten passenden Gauß-Fit-Modelle der einzelnen Zustände (farbige Linien) und ihrer Summen (gestrichelte schwarze Linien). (b) Populationsanteile der Zustände in Abhängigkeit von Magnesiumionen, welche aus den Fits (gezeigt in (a)) gewonnen wurden. (c) Die FRET-E-Mittelwerte der entsprechenden Gauß-Fit-Funktionen der einzelnen Zustände in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration. (a-c) Das Fünf-Zustandsmodell des Konstrukts RS_{EA2} , gefittet auf der Grundlage der Fit-Ergebnisse des Konstrukts RS_{EA1} und RS_{AA} . Die Linien aus (a) zeigen die Gauß-Verteilungen der Zustände T_1 ($P1_F/Apt_U$) (dunkel-grün), T_1 ($P1_F/Apt_F$) (hellgrün), T_2 ($P1_U$) (blau), AT_1 ($P1_F$) (rot) und AT_2 ($P1_U$) (orange). Die gestrichelten Linien entsprechen den Populationsanteilen der Zustände, entnommen aus den Fits des Konstrukts RS_{EA1} . Die dunkel- und hellgrünen Linien ergeben summiert die Populationsanteile für den Zustand T_1 ($P1_F$). Wegen unterschiedlicher Farbstoffpositionen in der Riboschalterstruktur ist eine Trennung beim Konstrukt RS_{EA2} in die beiden untergeordneten Zustände T_1 ($P1_F/Apt_U$) und T_1 ($P1_F/Apt_F$) sichtbar.

len. Jedoch musste für RS_{EA2} eine Modellerweiterung vorgenommen werden, welche annimmt, dass für den Zustand T_1 ($P1_F$) eine Aufspaltung in eine offene Aptamerstruktur T_1 ($P1_F/Apt_U$) und in eine geschlossene Aptamerstruktur T_1 ($P1_F/Apt_F$) beobachtbar ist. Die Fitparameter werden in **Tab. 4.6** gezeigt.

Tabelle 4.6: Parameter der fünf Gauß-Funktionen zum Fitten der Histogramme des Konstruktes RS_{EA2} . Die mittleren FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle$ und die daraus berechneten Farbstoffabstände $R_{\langle E \rangle}$ sind für $[Mg^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$ und $[Mg^{2+}] > 20 \text{ mM}$ angegeben. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilungen sind in der Spalte FWHM gegeben. Die Übergangsmittelpunktswerte der Hill-Funktion bezüglich der Populationsanteile sind in $[Mg^{2+}]_{0,5}$ eingetragen.

Zustand	$[Mg^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$		$[Mg^{2+}] > 20 \text{ mM}$		$[Mg^{2+}]_{0,5}$	FWHM
	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$		
RS_{EA2}						
$T_1(P1_F/Apt^U)$	$0,16 \pm 0,02$	70	$0,25 \pm 0,02$	64	8 ± 1	$0,19 \pm 0,01$
$T_1(P1_F/Apt^F)$	$0,34 \pm 0,01$	59	$0,38 \pm 0,05$	58	nd	$0,19 \pm 0,03$
T_2	$0,70 \pm 0,10$	46	$0,73 \pm 0,10$	45	2 ± 1	$0,21 \pm 0,05$
AT_1	$0,78 \pm 0,02$	43	$0,80 \pm 0,02$	42	8 ± 1	$0,23 \pm 0,02$
AT_2	$0,52 \pm 0,02$	52	$0,61 \pm 0,05$	50	2 ± 1	$0,21 \pm 0,02$

4.5 Globaler Fit mit dem Fünf-Zustandsmodell

Die Experimente wurden mit der anfänglichen Vermutung, dass der SAM-I-Riboschalter lediglich zwischen zwei deutlich unterscheidbaren Konformationen T und AT hin und her faltet, gestartet. Im Gegensatz dazu wurden für alle Konstrukte hoch komplexe FRET-Effizienzhistogramme gemessen, welche nicht einfach in diskrete Subpopulationen unterteilt werden konnten. Wie im letzten Kapitel erörtert, hatte der Versuch, die vier gefundenen Zustände auf die Histogramme des Konstrukts RS_{EA2} zu übertragen, keinen Erfolg. Der Versuch, mit Hilfe eines Fünf-Zustandsmodells alle magnesiumionenabhängigen FRET-Histogramme für RS_{EA2} zu beschreiben, hingegen funktionierte. Die FRET-Messungen des Konstrukts RS_{EA2} scheinen einen Zustand preiszugeben, welcher im Falle der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{AA} nicht unterschieden werden konnte. Somit müssen Zustände ähnlicher FRET-Effizienz in den Histogrammen von RS_{EA1} und RS_{AA} existieren, deren Subpopulationen in einer Population zusammenfallen. Die Summe der anteiligen Populationen dieser Zustände sollten die Häufigkeit der auftretenden FRET-Effizienzen wiedergeben. Es wurden zunächst mehrere Fitansätze verfolgt, jedoch gelang es nur für einen Ansatz, nämlich der Unterteilung des Zustandes $T_1(P1_F)$ in zwei Subzustände, einen konsistenten Fit durchzuführen. Die Herangehensweise, mit der eine konsistente Beschreibung mit einem Fünfzustandsmodell für alle Konstrukte gelang, wird im folgenden Kapitel erläutert.

Die vorangehenden Histogrammanalyse legt den Schluss nahe, dass die drei Zustände $T_2(P1_U)$, AT_1 und AT_2 , welche aus der HMM-Analyse des Konstrukts RS_{EA1} hervorgingen, direkt auf das Konstrukt RS_{EA2} übertragbar sind. Somit sollten der vierte und fünfte Zustand jeweils Subzustände des Zustandes $T_1(P1_F)$ sein. Die beiden anteiligen Populationen der entdeckten Zustände müssten dann der anteiligen Population des Zustands $T_1(P1_F)$ des Konstrukts RS_{EA1} entsprechen. Ein weiterer Hinweis, der diesen Ansatz

stützt, ist die Beobachtung, dass der Zustand $T_1(P1_F)$ in den Fitmodellen der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{AA} bei steigenden Magnesiumionenkonzentrationen eine relativ große Verschiebung hin zu höheren FRET-Effizienzen zeigt. Eine solch große Verschiebung ist ein Anzeichen für eine größere strukturelle Vielfalt an Konformationen. Schon Heppell et al. [60] konnten in ihrer FRET-Studie mit der Aptamerdomäne des SAM-I-Riboschalters zwei unterschiedliche Aptamerstrukturen identifizieren. Im Folgenden werden daher die Subkonformationen dieses Zustandes als $T_1(P1_F/Apt^U)$ und $T_1(P1_F/Apt^F)$ bezeichnet. Dabei steht der Zusatz Apt^U für eine leicht geöffnete, ungefaltete Aptamerdomäne und der Zusatz Apt^F für eine kompaktere und geschlossene Aptamerdomäne.

Um nun eine konsistente Beschreibung für alle Konstrukte zu erlangen, muss das Fünf-Zustandsmodell in gleicher Weise auf alle Histogramme übertragbar sein. Zum einen bestimmt sich der globale Fit aus der Population eines Zustandes, also der Fläche unterhalb der Gauß-Verteilung, zum anderen aus den Mittelwerten der Gauß-Verteilung, die der gemittelten FRET-Effizienz $\langle E \rangle$ entspricht. Diese FRET-Effizienz beschreibt den Abstand der Farbstoffmoleküle und wird jeweils einem Faltungszustand zugeordnet. Der globale Fit wurde mit einem selbst geschriebenen Matlab-Skript (MathWorks) durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

- Kern der Fit-Prozedur ist die Optimierung der Hill-Parameter als differentieller Bindungskoeffizient, welche das Verhalten der Populationsanteile der Zustände in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration bestimmen. Als Startparameter wurden die aus **Kapitel 4.4** geschätzten Übergangsmittelwerte der Hill-Funktionen mit den dazugehörigen Startwerten gewählt. Die Startwerte $X_i(0)$ bestimmten sich aus der anteiligen Population bei $[Mg^{2+}] = 0$ mM sowie dem Differenzwert ΔX_i zur gesättigten Population bei hohen Ionenkonzentrationen von $[Mg^{2+}] \geq 100$ mM. Zur Berechnung der anteiligen Population der i Zustände eines Konstrukts wurde **Gl. 4.3** herangezogen. Der differentieller Bindungskoeffizient $\Delta\Gamma_{2+}$ wurde $\Delta\Gamma_{2+} = 1$ gesetzt, da für Magnesiumionen keine kooperative Bindung an den SAM-I-RS angenommen wurde.
- Für jede Pufferbedingung wurde ein Fünf-Zustandsmodell aus fünf Gauß-Funktionen erstellt. Die Startwerte der Peak-Positionen der Zustände $T_2(P1_U)$, AT_1 und AT_2 bestimmten sich aus den Werten der vorangegangenen Fits (siehe **Kapitel 4.4.1**, **4.4.2** und **4.4.6**). Durch die Ionenstärke der Mg^{2+} -Ionen, erfahren RNS-Moleküle bei steigenden Mg^{2+} -Konzentrationen eine strukturelle Verdichtung. Diese Verschiebung der Mittelwerte der FRET-Effizienzen kann ebenso durch eine Hill-Funktion genähert werden [148].
- Beim Festlegen der Mittelwerte für die beiden Subzustände des aufgeteilten Zustands $T_1(P1_F)$ wurden die magnesiumionenabhängigen Veränderungen der Histogramme miteinander verglichen. In Abwesenheit von Magnesiumionen konnte festgestellt werden, dass die rechte Flanke der dominanten Population aller Konstrukte bei niedrigen FRET-Effizienzen weniger stark abfällt als die linke Flanke. Somit wurden an diesen Stellen der linken und rechten Flanke die Positionen des vierten und fünften Zustandes vermutet.

- Die Breiten der Gauß-Verteilungen eines Zustandes sind unabhängig von den in dieser Arbeit verwendeten Pufferbedingungen. Daher wurden die Breiten einzelner Zustände wenn möglich aus Bedingungen bestimmt, welche klar abgetrennte Verteilungen aufzeigen. Diese wurden als Startparameter gewählt, wobei dem Fit-Algorithmus eine Breitenvariation der Gauß-Verteilungen von 5 % gewährt wurde.
- Schließlich wurden aus den anteiligen Populationen die Mittelwerte und die Breiten der Gauß-Funktionen für jeden Zustand, abhängig von dessen Mg^{2+} -Konzentration für jedes Konstrukt, entnommen. Diese Funktionen wurden der Methode der kleinsten Quadrate übergeben und bis zur Konvergenz der Hill-Parameter optimiert.

Das Ergebnis für jedes Konstrukt ist in **Abb. 4.5.1** zu sehen. Die einzelnen Zustände lassen sich wie folgt zuordnen: $T_1(\text{Apt}^U)$ – dunkelgrün, $T_1(\text{Apt}^F)$ – hellgrün, T_2 – blau, AT_1 – rot und AT_2 – orange. Die durch den globalen Fit optimierten Übergangsmittelpunktweite $[\text{Mg}^{2+}]_{0,5}$ sind in **Tab. 4.7** zusammengefasst. Gleichfalls finden sich dort die Ergebnisse der Mittelwerte der Gauß-Funktionen und die daraus berechneten Farbstoffabstände für niedrige ($[\text{Mg}^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$) und hohe ($[\text{Mg}^{2+}] > 20 \text{ mM}$) Magnesiumionenkonzentrationen. Die Halbwertsbreiten (FWHM) der einzelnen Funktionen, die für den globalen Fit angesetzt wurden, sind ebenso in **Tab. 4.7** aufgeführt.

Das Fünfzustandsmodell zeigt nur leichte Modifizierungen des Vierzustandsmodells. So finden sich für die Zustände $T_2(\text{P1}_U)$ – blau, AT_1 – rot und AT_2 – orange) vergleichbare Positionen der FRET-Effizienzmittelwerte (siehe **Tab. 4.5.2**). Damit kann dem Zustand $T_2(\text{P1}_U)$, wie schon im Vierzustandsmodell argumentiert, wieder eine Molekülstruktur zugeordnet werden, die einer Terminatorstruktur mit offener P1-Helix entspricht. Die Modellierung möglicher Molekülstrukturen des Zustandes $T_2(\text{P1}_U)$ mit Hilfe der struktur-basierten Abstandsabschätzungen (siehe **Abb. 4.4.4 e** für das Konstrukt RS_{AA} , **Abb. 4.4.5 c** für das Konstrukt RS_{EA1} und **Abb. 4.4.7 d** für das Konstrukt RS_{EA2}) bestärken, dass zu den gemessenen FRET-Effizienzen entsprechende Strukturen gefunden wurden. Im Fall des Konstruktes RS_{EA2} bekommt man die größten Abstände zwischen Terminatorhelix und dem 5'-Ende des RNS-Stranges mit Abständen $R > 80 \text{ \AA}$ bei einer geöffneten P1-Helix. Beim Konstrukt RS_{AA} sorgt eine offene P1-Helix für ebenso große Abstände zwischen beiden Fluoreszenzmarkern im Bereich $R \approx 80 \text{ \AA}$. Aus den Histogrammdaten des Konstrukts RS_{EA2} müsste basierend auf dem Vierzustandsmodell der Zustand $T_2(\text{P1}_U)$ einer Population hoher FRET-Effizienz $\langle E \rangle = 0,76$ zugewiesen werden, unabhängig von der Ionenkonzentration. $\langle E \rangle = 0,76$ entspricht jedoch einem viel kleineren Abstand von $R \approx 44 \text{ \AA}$ als aus den strukturellen Abschätzungen errechnet wurde. Zwar könnte die offene P1-Helix beim Konstrukt RS_{EA2} auch zu großen Abständen zwischen dem Donormarker am Terminator und dem Akzeptormarker an der P4-Helix führen, jedoch liegt es nahe, dass der flexible Einzelstrang eine durch Ionen induzierte Anlagerung der Terminatorhelix an die Aptamerstruktur ermöglicht [195]. Auch die Überlagerungen der Populationsanteile der Zustände $T_2(\text{P1}_U)$ und AT_2 bei den Histogrammen des Konstrukts RS_{AA} mit Mittelwerten von jeweils $\langle E \rangle = 0,08$ und $\langle E \rangle = 0,09$ der FRET-Effizienzen zeigen eine gute Übereinstimmung dieser konstant bleibenden Subpopulation. Das Zusammenfallen dieser beiden Populationen beim Konstrukt RS_{AA} kann durch eine ähnliche Struktur der P1-Helix erklärt werden: Durch die Antiterminatorstruktur des Zustandes AT_2 wird eine vollständige Ausbildung einer P1-Helix verhindert (siehe **Abb. 4.4.4 e**), folglich besitzt

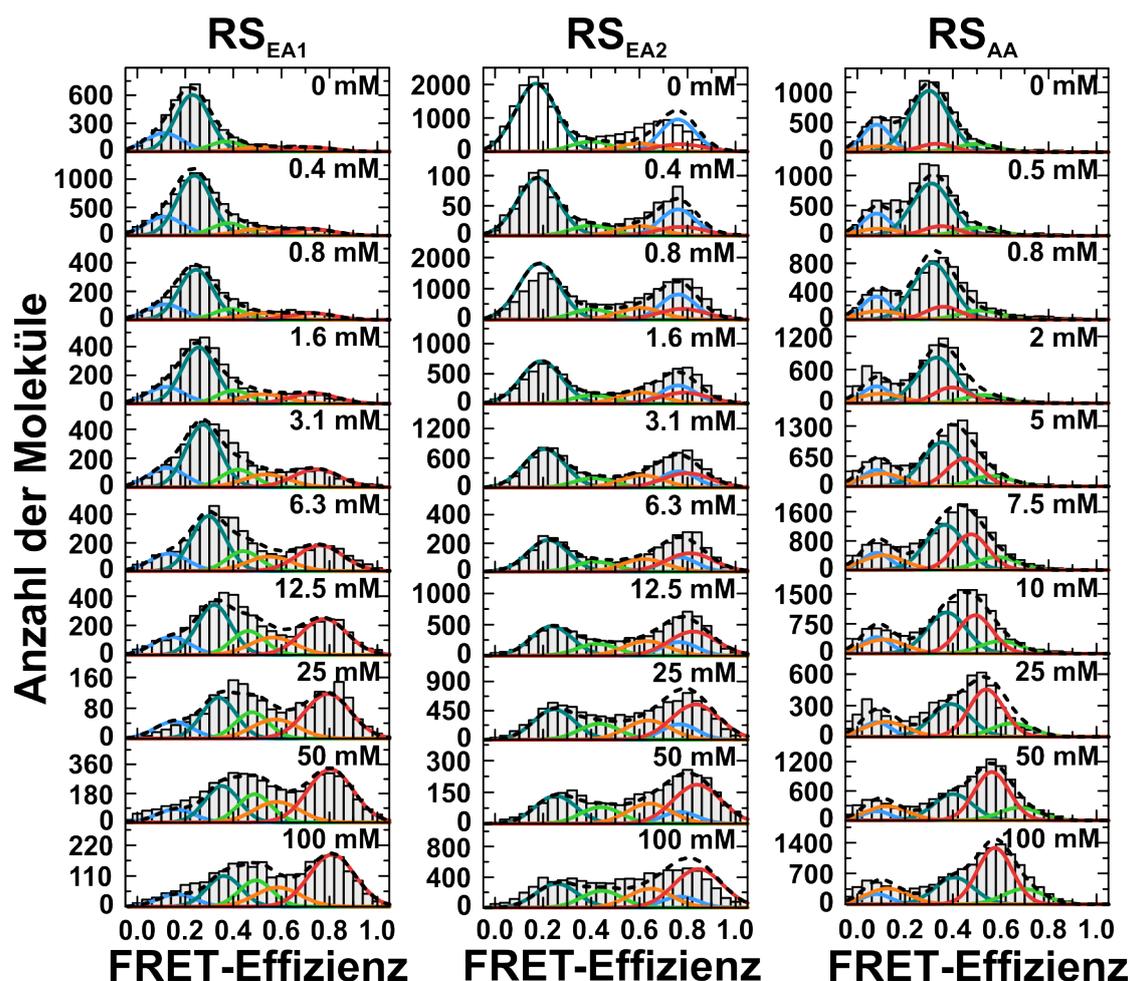


Abbildung 4.5.1: Globaler Fit der drei FRET-Konstrukte in Abhängigkeit ihrer Mg^{2+} -Konzentration. Einzelmolekül-FRET-Histogramme der Konstrukte RS_{EA1} , RS_{EA2} und RS_{AA} für unterschiedliche Mg^{2+} -Konzentrationen. Die Linien stellen das beste Fit-Modell mit fünf Gauß-Verteilungen dar. Die einzelnen Zustände lassen sich wie folgt zuordnen: $\text{T}_1(\text{Apt}^{\text{U}})$ – dunkelgrün, $\text{T}_1(\text{Apt}^{\text{F}})$ – hellgrün, T_2 – blau, AT_1 – rot und AT_2 – orange. Die Summen der Gauß-Verteilungen sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt.

der Zustand AT_2 eine Konformation mit zumindest teilweise geöffneter P1-Helix. Die Sequenzen A13 – C15 und G118 – U120 können trotzdem eine teilweise geschlossene P1-Helix (P1'-Helix, siehe **Abb. 4.1.1**) bilden, welche sich koaxial zur AT-Helix orientiert. Bei näherer Betrachtung der Einzelstrangsequenzen der P1- und der Antiterminatorhelix ist es ebenso denkbar, dass die Sequenzen U9 – U12 sowie A158 – A161 eine geschlossene P1-Helix ausbilden (P1''-Helix, siehe **Abb. 4.1.1**). Die berechneten Werte der Abstandsabschätzungen (**Abb. 4.4.4 f** für das Konstrukt RS_{AA} , **Abb. 4.4.6 d, e** für das Konstrukt RS_{EA1} und **Abb. 4.4.8 d, e** für das Konstrukt RS_{EA2}) für den Zustand AT_2 sind bei jedem Konstrukt vergleichbar mit den FRET-Effizienzwerten.

Die hohen FRET-Effizienzwerte des Zustandes AT_1 im Bereich von $\langle E \rangle = 0,72 - 0,82$ beim Konstrukt RS_{EA1} , $\langle E \rangle = 0,77 - 0,85$ beim Konstrukt RS_{EA2} und $\langle E \rangle = 0,33 - 0,59$

beim Konstrukt RS_{AA} deuten erneut auf eine Antiterminatorstruktur mit einer Helixkreuzung, bestehend aus $P1'$ -, $P1''$ - und AT -Helix, hin. Die Abstandsabschätzungen für alle drei Konstrukte (**Abb. 4.4.4 d** für das Konstrukt RS_{AA} , **Abb. 4.4.6 b, c** für das Konstrukt RS_{EA1} , und **Abb. 4.4.8 b, c** für das Konstrukt RS_{EA2}) belegen die jeweils kompakteste Konformation des SAM-I-Riboschalters und skalieren mit den gemessenen FRET-Effizienzen (siehe **Tab. 4.7**).

Tabelle 4.7: Parameter der globalen Fit-Prozedur mit fünf Gauß-Funktionen, unterteilt nach den drei Konstrukten und ihren fünf Zuständen. Die mittleren FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle$ und die daraus berechneten Farbstoffabstände $R_{\langle E \rangle}$ sind für $[Mg^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$ und $[Mg^{2+}] > 20 \text{ mM}$ angegeben. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilungen sind in der Spalte $FWHM$ gegeben. Die Übergangsmittelpunktswerte der Hill-Funktion bezüglich der anteiligen Populationen sind in $[Mg^{2+}]_{0,5}$ eingetragen.

Zustand	$[Mg^{2+}] < 0,1 \text{ mM}$		$[Mg^{2+}] > 20 \text{ mM}$		$[Mg^{2+}]_{0,5}$	$FWHM$
	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$	$\langle E \rangle$	$R_{\langle E \rangle} / \text{Å}$		
RS_{EA1}						
$T_1(P1_F/Apt^U)$	$0,23 \pm 0,01$	65	$0,37 \pm 0,01$	58	5 ± 1	$0,19 \pm 0,03$
$T_1(P1_F/Apt^F)$	$0,37 \pm 0,02$	58	$0,50 \pm 0,03$	53	12 ± 3	$0,17 \pm 0,03$
T_2	$0,11 \pm 0,01$	75	$0,17 \pm 0,04$	69	7 ± 4	$0,16 \pm 0,03$
AT_1	$0,72 \pm 0,01$	45	$0,82 \pm 0,01$	41	6 ± 1	$0,22 \pm 0,02$
AT_2	$0,51 \pm 0,02$	53	$0,59 \pm 0,03$	50	9 ± 5	$0,22 \pm 0,04$
RS_{EA2}						
$T_1(P1_F/Apt^U)$	$0,17 \pm 0,02$	69	$0,26 \pm 0,02$	63	5 ± 1	$0,17 \pm 0,01$
$T_1(P1_F/Apt^F)$	$0,40 \pm 0,02$	57	$0,45 \pm 0,02$	55	12 ± 3	$0,20 \pm 0,05$
T_2	$0,76 \pm 0,02$	44	$0,77 \pm 0,03$	43	7 ± 4	$0,20 \pm 0,03$
AT_1	$0,77 \pm 0,02$	43	$0,85 \pm 0,02$	40	6 ± 1	$0,21 \pm 0,03$
AT_2	$0,60 \pm 0,02$	49	$0,61 \pm 0,02$	49	9 ± 5	$0,23 \pm 0,04$
RS_{AA}						
$T_1(P1_F/Apt^U)$	$0,30 \pm 0,01$	61	$0,41 \pm 0,01$	56	5 ± 1	$0,16 \pm 0,02$
$T_1(P1_F/Apt^F)$	$0,50 \pm 0,03$	53	$0,72 \pm 0,05$	45	12 ± 3	$0,19 \pm 0,05$
T_2	$0,08 \pm 0,01$	80	$0,08 \pm 0,04$	79	7 ± 4	$0,20 \pm 0,05$
AT_1	$0,33 \pm 0,01$	59	$0,59 \pm 0,01$	50	6 ± 1	$0,17 \pm 0,01$
AT_2	$0,09 \pm 0,03$	78	$0,13 \pm 0,05$	72	9 ± 5	$0,21 \pm 0,05$

Daraus abgeleitet erweist sich die Aufspaltung des Zustandes $T_1(P1_F)$ aus dem Vierzustandsmodell des Konstrukts RS_{EA1} in die Zustände $T_1(P1_F/Apt^U)$ und $T_1(P1_F/Apt^F)$ als mögliches strukturelles Modell. Wie schon in **Kapitel 4.4** argumentiert, kann im Vierzustandsmodell die starke Verschiebung der FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle$ der Gauß-Verteilungen der einzelnen Zustände bei steigender Mg^{2+} -Konzentration darauf hindeuten, dass sich eine weitere Aufspaltung der Zustände anbieten würde. Im Fünf-Zustandsmodell erkennt

man nur noch eine leichte strukturelle Verdichtung, die der erhöhten ionischen Kraft zuzuordnen ist. Dies untermauert, dass ein Fünf-Zustandsmodell eine bessere globale Darstellung aller drei Konstrukte beschreibt. Die Aufspaltung des Zustandes $T_1(P1_F)$, welche zunächst aus den Daten für das Konstrukt RS_{EA2} vermutet wurde, lässt sich auch auf die Histogramme des Konstrukts RS_{AA} übertragen. Bei den Konstrukten RS_{EA1} und RS_{EA2} lassen sich die beiden Subzustände von $T_2(P1_U)$ problemlos in zwei benachbarte Subpopulationen aufspalten. Beide Subpopulationen weisen eine leichte strukturelle Kompaktierung bei Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration auf, welche jeweils geringer ist als der Positionsdrift, beobachtet für $T_2(P1_U)$ im Vierzustandsmodell. Beim Konstrukt RS_{AA} driftet der Zustand $T_1(P1_F/Apt^F)$ jedoch stärker in Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration. Die Beobachtung, dass gerade beim Konstrukt RS_{AA} , welches die reine Faltung der Aptamerdomäne wiedergibt, eine besonders ausgeprägte Mittelwertverschiebung auftritt, deutet auf eine strukturelle Verdichtung der Aptamerdomäne hin. Folglich unterscheiden sich die Subpopulationen $T_1(P1_F/Apt^U)$ und $T_1(P1_F/Apt^F)$ durch eine jeweils geöffnete bzw. geschlossene Aptamerstruktur. Es wurde davon ausgegangen, dass eine geschlossene Aptamerstruktur auch bei den Konstrukten RS_{EA1} und RS_{EA2} zu einer Verkleinerung der Abstände der Fluoreszenzmarker führt. Daher kann der Zustand $T_1(P1_F/Apt^F)$ der Subpopulation mit höheren FRET-Effizienzmittelwerten zugeordnet werden.

Die optimierten Hill-Funktionen des globalen Fits für das Fünfzustandsmodell sind in **Abb. 4.5.2** geplottet. Die anteiligen Populationen des globalen Fits weisen auf einen Austausch zwischen $T_2(P1_U)$ und AT_2 hin, da sich ähnliche Übergangsmittelpunkt看werte bei Ionenkonzentrationen von jeweils $[Mg^{2+}]_{0,5} = (7 \pm 4) \text{ mM}$ und $[Mg^{2+}]_{0,5} = (9 \pm 5) \text{ mM}$ ergeben. Wie schon im Vierzustandsmodell beobachtet wurde, zeigen die beiden Populationen $T_1(P1_U)$, hier mit $T_1(P1_F/Apt^U)$ und $T_1(P1_F/Apt^F)$, einen Austausch der Populationsanteile von AT_1 bei $[Mg^{2+}]_{0,5}$ -Werten der Hill-Funktion von jeweils $[Mg^{2+}]_{0,5} = (5 \pm 1) \text{ mM}$, $[Mg^{2+}]_{0,5} = (12 \pm 3) \text{ mM}$ und $[Mg^{2+}]_{0,5} = (6 \pm 1) \text{ mM}$.

4.6 Triangulierung zur Lokalisierung der Expressionsplattform

Mit den erhaltenen FRET-Effizienzwerten mehrerer Konstrukte kann nun versucht werden, eine Abschätzung zu treffen, wie die Expressionsplattform gegenüber dem Aptamer angeordnet ist. Zur Charakterisierung der Strukturen von Biomolekülen eignen sich mittels Röntgenkristallographie gemessene 3D-Informationen. Bislang konnte jedoch nur die Kristallstruktur der Aptamerdomäne gemessen werden [56]. Die hohe Flexibilität des kompletten SAM-I-Riboschalters verhindert vermutlich die Herstellung eines Kristalls mit ausreichend hoher Qualität. Dadurch weiß man nicht, wo sich die Expressionsplattform des SAM-I-Riboschalters aufhält. Jedoch können bestehende Puzzleteile aus Kristallstrukturdaten und Einzelmolekül-FRET-Daten zusammengesetzt werden, um ein besseres Verständnis über die komplexen Strukturen von Biomolekülen zu erlangen [196]. In **Abb. 4.6.1** wird eine Abschätzung des Aufenthaltsortes der Expressionsplattform, im speziellen Fall der ausgebildeten T-Konformation, gegenüber der Aptamerdomäne

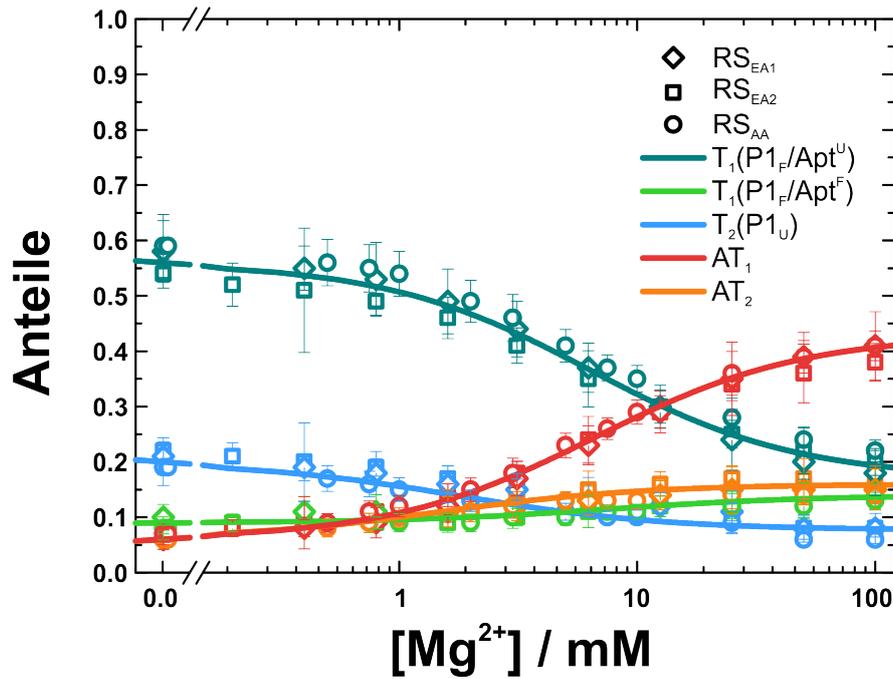


Abbildung 4.5.2: Ergebnisse des globalen Fünf-Zustandsmodells. Gezeigt sind die Populationsanteile der Gauß-Funktionen des globalen Fits. Die Farben der Linien entsprechen wie schon in **Abb. 4.5.1** den einzelnen Zuständen: $T_1(P1_F/Apt^U)$ – dunkelgrün, $T_1(P1_F/Apt^F)$ – hellgrün, $T_2(P1_U)$ – blau, AT_1 – rot und AT_2 – orange. Die Symbole der Datenpunkte sind den Konstrukten zugeordnet: Raute – RS_{EA1} , Rechteck – RS_{EA2} und Kreis – RS_{AA} .

gezeigt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Ausgangspunkt sind die Mittelwerte der FRET-Effizienzen des Zustandes $T_1(P1_F/Apt_F)$ der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} , die aus den Fits des Fünf-Zustandsmodells entnommen wurden. In **Abb. 4.6.1 a** sind die beiden Populationen der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} des Zustandes $T_1(P1_F/Apt_F)$ bei einer Magnesiumionenkonzentration von 3,1 mM in grün hervorgehoben. Die globale Fit-Prozedur ist in **Kapitel 4.5** beschrieben. Der Zustand $T_1(P1_F/Apt_F)$ besitzt vermutlich eine geschlossene P1-Helix und eine gefaltete Aptamerstruktur. Somit ist diese Struktur ähnlich zur ligandengebundenen Kristallstruktur, welche durch Lu et al. [56] (PDB ID: 4KQY) mit Röntgenbeugungsexperimenten vermessen wurde. Lu et al. [56] führte den Kristallisationsprozess mit $[Mg^{2+}] = 5$ mM durch. In dieser Arbeit konnten die Abstände der Fluoreszenzmarker des Zustandes $T_1(P1_F/Apt_F)$ der Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} bei einer Konzentration von $[Mg^{2+}] = 5$ mM aus den Hill-Funktionen der Zustandspopulationen des globalen Fits (**Abb. 4.5.2**) entnommen werden. Nach **Gl. 2.52** konnten dann die Abstände der Fluoreszenzmarker zueinander aus den FRET-Effizienzen berechnet werden. Für beide Konstrukte erhält man einen Abstand von 56 Å. Da eine dreidimensionale Faltung des Moleküls angenommen wird, müssen Kugelschalen dieser Abstände berechnet werden, um alle möglichen Aufenthaltsorte abzudecken. Die Radien der Kugelschalen bestimmen sich aus den $\langle E \rangle$ -Werten des Zustandes $T_1(P1_F/Apt_F)$ für das jeweilige Konstrukt als jeweils 56 Å. Die Breiten der Kugelschalen bestimmen sich aus der Messunsicherheit der $\langle E \rangle$ -Werte, die sich aus den Breiten der Normalver-

teilungen des globalen Fits bestimmen. Da die Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} bezüglich ihrer FRET-Paare die gleiche Donorposition (U_{150}) in der Expressionsplattform teilen, jedoch über unterschiedliche Akzeptorpositionen in der Aptamerdomäne verfügen (U_8 und U_{112}), konnten dann aus den beiden Abständen bezüglich eines selbst gesetzten Fixpunktes bei U_{150} Schnittstellen der Kugelschalen berechnet werden. In **Abb. 4.6.1 c** sind die Radien als grüne Linien eingezeichnet und die Breiten der Kugelschalen als transparenter, grünlicher Ring skizziert. Aus dem Schnitt der Kugelschalen ergibt sich ein Schnittvolumen, welches die wahrscheinlichen Aufenthaltsorte des Donorfarbstoffes, befestigt an der Expressionsplattform, ergibt. Um die Triangulation durchzuführen, wurde angenommen, dass im Zustand T_1 ($P1_F/Apt_F$) die P1-Helix geschlossen ist und die Expressionsplattform eine geschlossene Terminatorhelix einnimmt. Daraus ergibt sich für den Abstand zwischen dem U_{150} -Nukleotid und dem A_{125} -Nukleotid eine weitere Einschränkung: Der Abstand zwischen C_{125} und C_{142} kann als wurmartige Kette (siehe **Gl. 2.23**) genähert werden. Das verbleibende Stück zwischen C_{142} und C_{150} ist Teil der T-Helix und wird daher durch **Gl. 2.24** berechnet (siehe **Abb. 4.6.1 b**). Zur Berechnung der Abstände wurde die empirisch bestimmte Konturlänge eines einzelnen Nukleotids von $l_c = 6,3 \text{ \AA}$ herangezogen [189]. Die Persistenzlänge l_p ist abhängig von der Magnesiumionenkonzentration und nimmt für Konzentrationen von $[Mg^{2+}] > 4 \text{ mM}$ eine Länge von 10 \AA ein [190]. Die charakteristischen Werte zur Berechnung der Helix entsprechen einer A-DNS und können der **Tab. 2.1** entnommen werden. Die Länge der Verbindungsmoleküle zwischen Fluoreszenzfarbstoff und RNS, dem sogenannten Linker, kann ebenso mit Hilfe der Gaußkette berechnet werden und bestimmt sich zu $l_{Linker} = 8,6 \text{ \AA}$. Für die Farbstoffmoleküle am Ende eines solch langen und flexiblen Linkers kann man annehmen, dass sie sich frei bewegen können. Die Farbstoffmoleküle werden in ihrer Bewegung räumlich durch die RNS-Helix eingeschränkt, an welcher der Linker befestigt ist. Daher können sie sich nur innerhalb einer Halbkugel frei bewegen. Wie aus vorangehenden Untersuchungen eines solchen Linker-Farbstoffpaares hervorgeht, orientieren sich die Farbstoffmoleküle auf der Submillisekundenskala um, sodass man davon ausgehen kann, dass keine Anisotropie der Farbstoffmoleküle vorliegt [148, 197].

Für die Aptamerdomäne im gefalteten Zustand wurde die Kristallstruktur in seiner ligandengebundenen Form verwendet (PDB ID: 4KQY [56]). Somit geht aus der Berechnung der wurmartigen Kette zwischen C_{125} und C_{142} ein Abstand von 48 \AA und aus der Berechnung des Helixstücks zwischen C_{142} und C_{150} ein Abstand von 29 \AA in die Abschätzung ein. Die beiden Größen fließen in der Triangulation zusammen ebenso als Kugelschale ein, welche in **Abb. 4.6.1 c** in rot gezeigt ist. Die breite rötliche Fläche bestimmt sich durch das steife Helixstück und der Radius (dunkelrote Linie) aus der Länge der flexiblen, wurmartigen Kette. Dabei wurde die Möglichkeit einer Molekülstruktur mit offener P1-Helix sowie offener AT-Helix ausgeschlossen, denn bei einer solchen Struktur existierte kein Schnittvolumen der Kugelschalen, gebildet aus den FRET-Effizienzen von RS_{EA1} , RS_{EA2} und den berechneten Abständen eines Einzelstrangs der Expressionsplattform (offene AT-Helix ab dem 126. Nukleotid). Ebenso kann man ausschließen, dass die T-Helix auf die flexible RNS-Einzelstrangsequenz zurückfaltet, da sonst Abstände kleiner 48 \AA auftreten müssten. Da nur die 3D-Kristallstruktur des Aptamers existiert, wurde mit Hilfe der Simulationssoftware „MacroMoleculeBuilder“ (MMB, SimTK, National Institutes of Health (NIH)) eine T-Struktur modelliert, um diese Abschätzung weiter zu detaillieren.

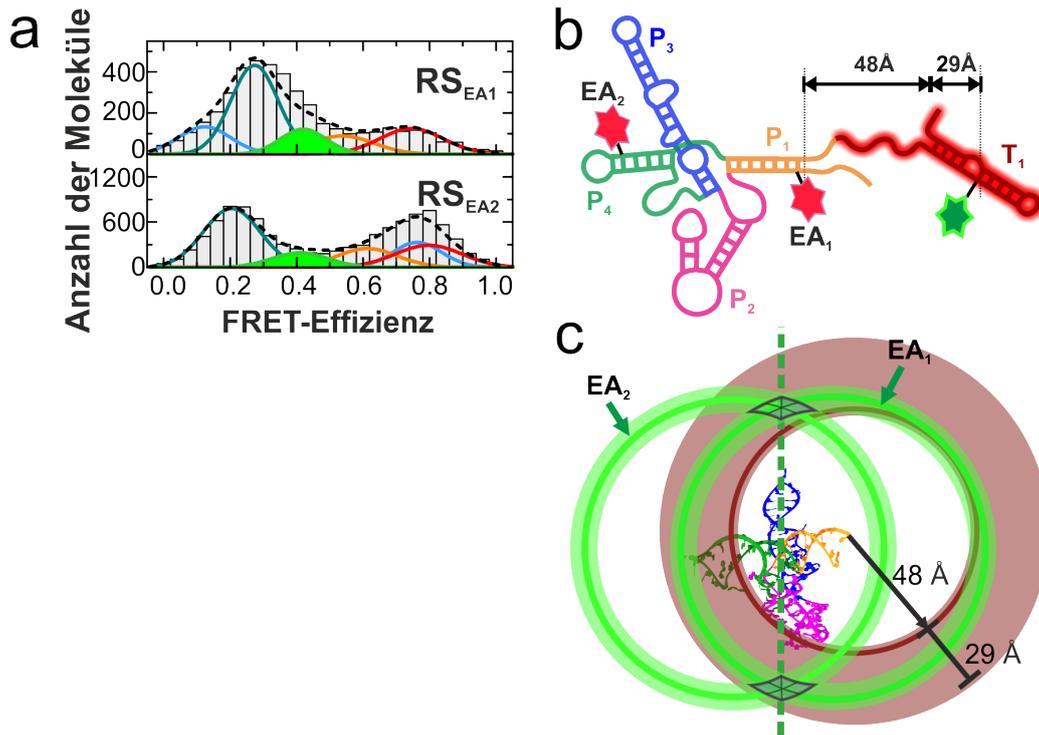


Abbildung 4.6.1: Triangulierung möglicher Positionen der Terminatorstruktur. (a) Einzelmolekül-FRET-Effizienz-Histogramme von RS_{EA1} und RS_{EA2} bei einer Mg²⁺-Konzentration von 5 mM. Die farbigen Linien entsprechen den Ergebnissen aus der globalen Fit-Prozedur. Die grünen Flächen der Gauß-Verteilungen sind in beiden Histogrammen jeweils dem Zustand T₁ (P_{1F}/Apt^F) zugeordnet. (b) Schematische Darstellung der modellierten T-Struktur. Hier wird angenommen, dass die T- sowie die P₁-Helix ausgebildet sind. Ebenso eingezeichnet sind die berechneten Abstände zwischen den Enden der P₁-Helix (links) und der T-Helix (mit einem mittleren Abstand von 48 Å) sowie zwischen dem Ende der T-Helix und der Linkerposition des Akzeptorfarbstoffes (29 Å). (c) Abschätzung möglicher Positionen des Donormoleküls aus der Kristallstruktur des gefalteten Aptamers. Die Sichtebene ist definiert durch die Donor- und Akzeptorlabelposition (U₈ und U₁₁₂) sowie durch das Ende der P₁-Helix (U₁₂₅), festgelegt durch das 3D-Programm für Molekülstrukturen VMD (Version 1.9.3, University of Illinois of Urbana-Champaign, Urbana, IL). Die grünen Kreise entsprechen den D-A-Abständen, bestimmt durch die Hill-Funktionen des globalen Fits mit jeweils 56 Å für die Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2}. Die gestrichelte Kreislinie entspricht der Schnittebene der einzelnen Kreisringe. Der rote Ring mit einem Radius von 48 Å (schwarzer Pfeil) zeigt den Kugelschnitt der mittleren Abstände um das C3'-Atom des Nukleotids A125 und das Ende der P₁-Helix. Der Kugelschnitt zeigt daher die gemittelten Abstände des T-Helix-Endes. Der aufaddierte Ring mit einer Dicke von 29 Å deckt alle zusätzlichen Abstandsvariationen ab, welche durch das Teilstück zwischen T-Helix-Ende und Donor entstehen.

Der Software wurde die RNS-Sequenz der Expressionsplattform übergeben. Weiterhin wurde der Software vorgegeben, welche WC-Basenpaare eine Helix bilden und welche Nukleotide ungebunden als Einzelstrang vorliegen. Somit konnte ein 3D-Modell ei-

ner Terminatorstruktur erstellt werden. Mit Hilfe der 3D-Modellierungssoftware Blender (Version 2.78) wurde dann die gemessene Kristallstruktur und die simulierte Expressionsplattform zusammengefügt. Schließlich wurden alle Kugelschnitte berechnet, diese sind in **Abb. 4.6.2** als grüner Torus gezeigt. Der fehlende Teil des grünen Torus ergibt sich aus einem Kegelschnitt, welcher alle Aufenthaltsorte des Torus wegschneidet, die nicht durch die T-Helix erreicht werden können, da sie im Schatten der P2-Helix liegen und daher nicht von der Expressionsplattform im T-Zustand erreicht werden können.

Durch die Triangulation konnte kein besonders stark eingeschränktes Aufenthaltsvolumen berechnet werden. Ein Hinweis auf den Aufenthaltsort der T-Helix findet sich bei der Betrachtung des Konstrukts RS_{EA2} . Der Abstand von 56 Å zwischen Donor und Akzeptor des Zustands T_2 lässt vermuten, dass sich die T-Helix in der Nähe der P4-Helix aufhalten muss. In **Abb. 4.6.2** sieht man, dass die T-Helix parallel zur P4-Helix ausgerichtet ist. Eine solche Struktur wäre durch die Stabilisierung von Magnesiumionen der beiden sich gegenüberliegenden, negativ geladenen RNS-Rückgrate denkbar. Um diese strukturelle Abschätzung zu untermauern, müssten zusätzlich 3D-Simulationen mit integrierten Fluoreszenzmarkern durchgeführt werden. Ebenso sind Untersuchungen mit weiteren FRET-Konstrukten nötig, um neue Einschränkungen zu erhalten. Besonders aufschlussreich wären Vermessungen hochwertiger, stabiler Riboschalterkristalle des vollständigen SAM-I-Riboschalters. Dies ist derzeit nur mit erheblichem Aufwand umsetzbar.

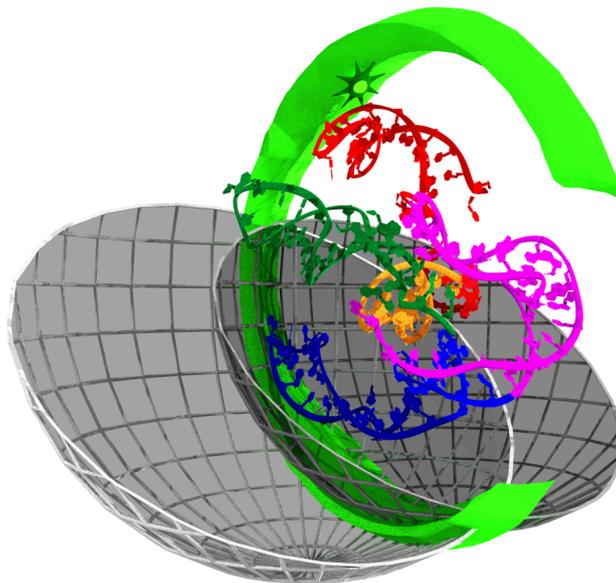


Abbildung 4.6.2: 3D-Triangulierung möglicher Positionen der Terminatorstruktur. Gezeigt ist die Kristallstruktur, ergänzt um eine simulierte Expressionsplattform in der T-Struktur. Der grün, leuchtende Stern markiert die Donorposition. Die grüne torusförmige Struktur ist das simulierte Schnittvolumen der drei „Abstandskugeln“. Der Ring zeigt alle Aufenthaltsorte, die laut dieser Arbeit für den Donormarker am Terminator in Frage kommen.

4.6.1 Diskussion

In dieser ersten Einzelmolekül-FRET-Studie eines vollständigen SAM-I-Riboschaltermoleküls konnten sowohl über einen großen Bereich von Magnesiumionen- als auch Ligandenkonzentrationen komplexe FRET-Histogramme im thermischen Gleichgewicht beobachtet werden. Die Auswertung der aus den Messdaten erstellten Histogramme ist jedoch in der Zustandsunterscheidung limitiert, wenn mehr als drei Zustände existieren. Die Ergebnisse konnten erst aufgedeckt werden, indem zusätzliche Messungen an immobilisierten Molekülen in An- und Abwesenheit des Liganden SAM durchgeführt und einer HMM-Analyse unterzogen wurden [140], welche die Faltungskinetik zwischen den Zuständen ermittelte. Somit konnten zunächst vier Faltungszustände aufgedeckt werden. Der Vergleich der Energielandschaften von ligandengebundenen und ligandenfreien Zuständen und deren Dynamik zeigten nur kleinere Unterschiede: Beide AT-Zustände werden durch Bindung des Liganden SAM zu höheren Energien verschoben (siehe **Abb. 4.4.9 b, c**). Interessant dabei ist, dass der T₂-Zustand, unabhängig davon, ob SAM gebunden ist oder nicht, am stabilsten ist.

Das Ergebnis zeigt, dass nur kleinere Faltungsänderungen nötig sind, damit der SAM-I-Riboschalter als regulatorisches Element bei der DNS-Transkription wirken kann. Die beobachteten kleinen, strukturellen Änderungen des SAM-I-Riboschalters, welche die regulierende Wirkung ermöglicht, unterstützt die Annahme von Baird et al. [198], dass die regulierende Funktion nicht wie beim Umlegen eines Schalters, sondern eher wie beim Verstellen eines Dimmers zustande kommt. Qualitativ ähnliche Ergebnisse bezüglich eines FMN-Riboschalters zeigen, dass durch das Binden des Liganden (FMN) nur begrenzte strukturelle Änderungen auftreten [199].

Die strukturelle Energielandschaft des SAM-I-Riboschalters wird stark durch die divalenten Mg²⁺-Kationen beeinflusst. Die Bindung des Liganden SAM ruft zusätzliche tertiäre Änderungen hervor, welche das Aptamer, im Speziellen die Bindungsstellen der P1-Helix, stabilisieren. Kürzlich konnten durch Einzelmolekül-FRET-Experimente mit einem viel kleineren preQ₁-Riboschalter [197] mechanistische Details aufgedeckt werden, die zeigen, wie Mg²⁺ und spezifische Liganden die Energielandschaft formen und im Einklang mit den hier gezeigten Daten sind (siehe **Abb. 4.4.9**). Bei niedrigen Mg²⁺-Konzentrationen wurde eine offene, schnell fluktuierende Riboschalterstruktur nachgewiesen. SAM kann an diese Riboschalterstrukturen binden und stabilisiert daraufhin solche Strukturen, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit dem gebundenen SAM eingehen („faltungseinleitendes Konzept“, *engl. induced-fit model*). Bei hohen Mg²⁺-Konzentrationen wird also durch die Anlagerung der Mg²⁺-Kationen an das RNS-Molekül die Riboschalterstruktur kompakter und stabiler. Viele Sekundärstrukturen von T und AT bilden eine Koexistenz, wohingegen SAM bevorzugt an die Gruppe von Konformationen bindet, die schon einen bindungsähnlichen Zustand, zum Beispiel aufeinander gestapelte P1- und P4-Helices, eingenommen haben („strukturbasierte Auswahl“, *engl. conformational selection*).

Im Millimolarbereich von Mg²⁺-Ionen in Abwesenheit von SAM ist die T-Konformation vorherrschend, obwohl dennoch AT-Zustände existieren. Ebenso beobachtet man Zustandsübergänge zwischen T und AT (siehe **Abb. 4.4.1, 4.4.2** und **4.4.11**), deren Übergangszeiten im charakteristischen Sekundenbereich liegen. Da Riboschalter, welche auf

transkriptioneller Ebene als Regulatoren fungieren, die Anwesenheit von Liganden während der Transkription detektieren und daran binden, könnten nicht nur den thermodynamischen Eigenschaften eine wichtige biologische Funktion zukommen, sondern auch die Faltungsdynamik eine tragende Rolle spielen. Die RNS-Polymerase erstellt ein Transkript mit einer Geschwindigkeit von 40 bis 90 Nukleotiden pro Sekunde, das jedoch auch durch das Auslesen von Stopp-Sequenzen beeinflusst sein kann. Es existiert also nur ein kurzes Zeitfenster während der Transkription des Riboschalters, in dem er als RNS-Schalter wirken kann [200].

Bislang wurde stets argumentiert, dass die Faltung in die AT-Konformation bevorzugt geschieht, da die Formation von sich naheliegenden Nukleotiden zu Watson-Crick-Basenpaaren wahrscheinlicher ist als die Bildung von solchen, welche sequenziell weit auseinander liegen [48, 68, 201]. Die T-Struktur-stabilisierenden Nukleotide des SAM-I-Riboschalters werden erst ab A₁₅₈ produziert (siehe **Abb.3.3.1**). Zu diesem Zeitpunkt hat sich die AT-Helix (A₁₂₁ – U₁₅₆) bereits ausgebildet. Damit kann das Argument, dass die AT-Struktur während der mRNS-Transkription bevorzugt eingenommen wird, bestärkt werden. Die durchgeführten Messungen zeigen, dass Zustandsübergänge zwischen AT und T in Abwesenheit des Liganden im Sekundenbereich liegen. Das bedeutet, dass sich der Riboschalter während der Transkription im AT-Zustand also im „AN“-Zustand befinden muss. Bindet SAM schon im frühen Transkriptionsstadium, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Expressionsplattform in die T-Konformation faltet. Sollte sich zunächst eine AT-Struktur ausbilden, wäre durch die stark beschleunigte Faltungsdynamik (im Bereich von Millisekunden) in Anwesenheit von Liganden ein Wechsel zu T immer noch schnell genug, damit der RS den „AUS“-Zustand einnehmen kann. Daher scheint beim SAM-I-Riboschalter die Beschleunigung der gesamten Faltungsdynamik in Anwesenheit des Liganden eine biologische Schlüsselfunktion zu sein.

Durch die Einbeziehung des weiteren Konstrukts RS_{EA2}, das wie RS_{EA1} seinen Donormarker an der Expressionsplattform hat, jedoch eine unterschiedliche Position des Akzeptormarkers (P4-Helix, U112) aufweist, konnten innerhalb der T₁-Struktur zwei Subzustände aufgelöst werden: T₁ (Apt^U) und T₁ (Apt^F). Diese überlappen in den anderen beiden Konstrukten RS_{AA} und RS_{EA1} stark. Mit strukturbasierten Abstandsberechnungen konnte die Aufspaltung in zwei Subzustände dadurch erklärt werden, dass die T₁-Konformation sowohl mit einem geöffneten Aptamer T₁ (Apt^U) als auch mit einem gefalteten Aptamer T₁ (Apt^F) existiert. Mit diesem erweiterten Fünf-Zustandsmodell konnte schließlich erfolgreich ein konsistenter globaler Fit gefunden werden, der die magnesiumabhängige Faltung aller Konstrukte erklärt.

Durch die gleiche Donorposition der beiden Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} konnte eine Triangulierung angesetzt werden, die eine Modellierung der Gesamtstruktur erlaubt. Die Triangulierung deckte einen torusförmigen Bereich auf, der die möglichen Aufenthaltsorte der T-Struktur einschränkte. Um zusätzliche Eingrenzungen bezüglich der möglichen Aufenthaltsorte machen zu können, müssten weitere FRET-Konstrukte synthetisiert und untersucht werden.

4.7 RS-Faltung unter Einfluss von SAH

Eine der zentralen regulatorischen Fähigkeiten des SAM-I-Riboschalters ist es, den Botenstoff SAM eindeutig von SAH zu unterscheiden. Dabei sind sich beide Moleküle sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich durch eine zusätzliche Methylgruppe am Schwefelatom von SAM, welche zu einer positiven Nettoladung des Schwefels führt. Trotz dieses geringen Unterschieds bindet der SAM-Riboschalter SAM mit einer mehr als hundertfach höheren Affinität als SAH [38]. Der RS besitzt außerdem die Fähigkeit, zwischen verwandten Liganden, zum Beispiel Abbauprodukten im zellulären Stoffwechsel, zu unterscheiden, um so das Risiko unerwünschter Fehlregulierung zu mindern [18]. In dieser Arbeit wurde ebenso der Einfluss von SAH, dem Abbauprodukt von SAM nach der Methyltransferase-Reaktion, auf die Faltung zwischen Aptamer und Expressionsplattform des SAM-I-RS untersucht. Die Unterschiede zwischen den beiden Liganden sind in **Abb. 2.2.2** zu sehen. Dazu wurden erneut die Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} genutzt. Die SAH-Titrationsexperimente wurden zunächst an frei diffundierenden Molekülen mit Hilfe der Einzelmolekül-Burst-Analyse durchgeführt, beschrieben in **Kapitel 3.4.2**. Um die Ergebnisse mit den SAM-Titrationsmessungen vergleichen zu können, wurde wie zuvor eine Konzentration von $[Mg^{2+}] = 20 \text{ mM}$ in Standardpuffer gewählt. Die Histogramme der Titrationsexperimente, welche die SAH-abhängige Faltung des Konstrukts RS_{EA1} zeigen, sind in **Abb. 4.7.1 a** zu sehen.

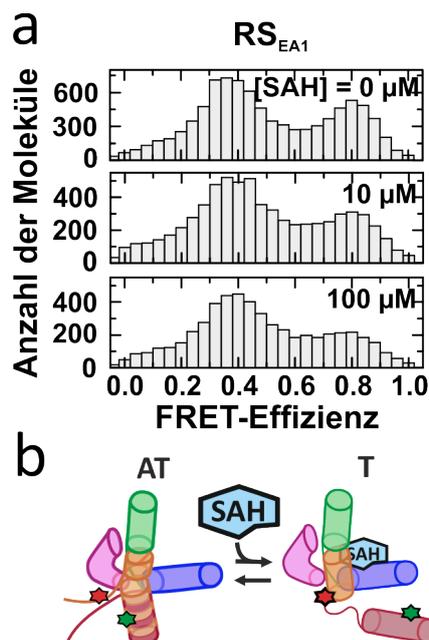


Abbildung 4.7.1: SAH-abhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters des RS_{EA1} -Konstrukts. (a) Einzelmolekül-FRET-Histogramme mit 0, 10 und 100 μM SAH bei $[Mg^{2+}] = 20 \text{ mM}$ in Standard-RS-Puffer. (b) Schematische Darstellungen der strukturellen Umorientierung als Antwort auf die SAH-Bindung. Die SAH-Bindung induziert eine leichte Verschiebung der Verteilung hin zu Populationen niedriger FRET-Effizienzen. Vergleichbar zur Faltung in Abhängigkeit zu SAM kann dies als Übergang von AT zu T interpretiert werden.

In Abwesenheit des Liganden erhält man die typische Populationsverteilung, die schon in den Magnesiumionentitrationsexperimenten beobachtet wurden (siehe **Abb. 4.1.4**). Die beiden Hauptpopulationen bei $\langle E \rangle = 0,4$ und $\langle E \rangle = 0,8$ können den T- und den AT-Zuständen zugeordnet werden. Durch Steigerung der SAH-Konzentration nehmen die Populationen höherer FRET-Effizienzen ($\langle E \rangle > 0,6$), welche den AT-Strukturen zugeordnet werden, ab. Daraus kann gefolgert werden, dass der Ligand SAH an den Riboschalter bindet. Im Unterschied zur SAM-Titration wird bei SAH erst ab einer $10\times$ höheren Ligandenkonzentrationen von $100\ \mu\text{M}$ ein deutlicher Unterschied der Verschiebung der Populationsanteile hin zu T-Zuständen sichtbar. Da sich SAH nur in einer fehlenden Methylgruppe und dem damit verbundenen, ladungsneutralen Schwefelatom von SAM unterscheidet (siehe **Abb. 2.2.2**), kann dennoch von einer Bindung ausgegangen werden. Der große Unterschied der Ligandenkonzentrationen von SAM und SAH im Bereich von drei Größenordnungen zeigt erwartungsgemäß, dass SAH im Vergleich zu SAM beim SAM-I-Riboschalter eine deutlich niedrigere Bindungsaffinität besitzen muss. Eine eindeutige Quantifizierung lässt sich mit dem bisher gefundenen Modell jedoch nicht durchführen. Da selbst ein Fit der SAM-Titrationshistogramme mit acht Populationen nicht möglich war, kann auch bei den SAH-Histogrammen kein Fit durchgeführt werden. Aus vorherigen Messungen eines SAM-I-Riboschalters des *Bacillus subtilis* wurde eine 100-fache Diskriminierung von SAM gegenüber SAH gemessen. Dort wurde für eine Aptamerdomäne, bestehend aus 124 Nukleotiden, ein $K_d \approx 4\ \text{nM}$ für SAM und ein $K_d \approx 400\ \text{nM}$ für SAH gemessen [18]. Eine weitere Untersuchung des SAM-I-Riboschalters des *Thermophylus tengcongensis* konnte sogar eine 500-fache Diskriminierung zwischen beiden Liganden feststellen [58].

Die SAH-abhängige Faltung des Konstrukts $\text{RS}_{\text{EA}2}$ ist in **Abb. 4.7.2 a** geplottet. In Abwesenheit des Liganden erhält man die typische Populationsverteilung, die schon in den Magnesiumionentitrationsexperimenten beobachtet wurde (siehe **Abb. 4.1.5**). Durch die Steigerung der SAH-Konzentration kann kaum eine Veränderung der Populationsverteilung festgestellt werden. Wie in den vorangehenden Kapiteln diskutiert wurde, ist durch die Überlappung von T und AT-Zuständen für FRET-Effizienzen $\langle E \rangle > 0,5$, selbst in Anwesenheit von SAM, kaum eine Verschiebung der Populationen beobachtbar. Hinzu kommt, dass durch die erhöhte Mg^{2+} -Konzentration keine komplette Entvölkerung der AT-Zustände erreicht wurde. Zusammengenommen ist es daher nicht verwunderlich, dass die Titrationsexperimente mit SAH am Konstrukt $\text{RS}_{\text{EA}2}$ ähnliche Histogramme ergeben. Der Schlüssel, der die starke Diskriminierung zwischen SAM und SAH ermöglicht, ist die elektrostatische Komponente des SAM [10,55]. Die positive Nettoladung wird beim SAM durch die Methylgruppe gebildet, die dem Schwefelatom ein Elektron entzieht [58]. Folglich geht man davon aus, dass eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen SAM und RNS für die höhere Selektivität verantwortlich ist. Durch Röntgenbeugungsexperimente an SAM-I-Riboschalterkristallen konnten mögliche Strukturen gefunden werden, welche sowohl die Bindung als auch die hohe Selektivität von SAM im Aptamer erklären [47]. Wie in **Abb. 2.2.3** und **2.2.4** zu sehen, sind die Helices P1 und P4, sowie P2 und P3 jeweils koaxial aufeinander gestapelt. Deren gemeinsames Zentrum bildet eine strukturelle Vierwegekreuzung. Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass der Metabolit SAM im Zwischenbereich der beiden parallel verlaufenden P1- und P3-Helices bindet. Dabei ist SAM so angeordnet, dass sein Adenosylring und der Methioninteil des Liganden per Wasserstoffbrückenbindung an einer inneren Schlaufe (C52 – C55 und G85 – C88) der P3-Helix

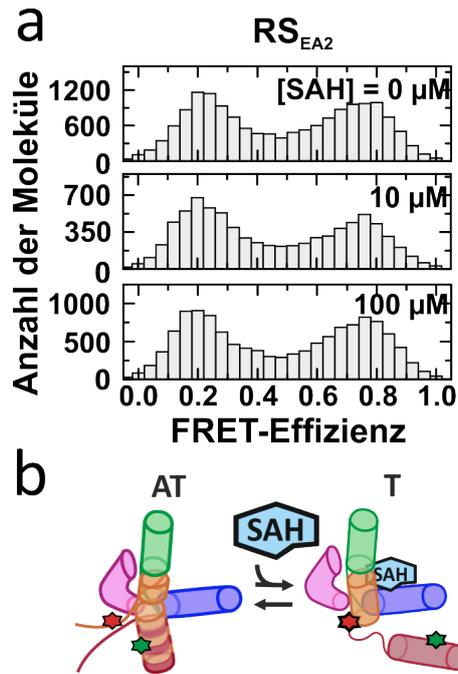


Abbildung 4.7.2: SAH-abhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters des RS_{EA2} -Konstrukts. (a) Einzelmolekül-FRET-Histogramme mit 0, 10 und 100 μM SAH bei $[\text{Mg}^{2+}] = 20 \text{ mM}$ in Standard-RS-Puffer. (b) Schematische Darstellungen der strukturellen Umorientierung zwischen AT- und T-Zustand. Beim Konstrukt RS_{EA2} ist kaum eine Verschiebung der Populationsanteile erkennbar.

binden. Diese positive Nettoladung bei SAM bindet per Van-der-Waals-Wechselwirkung an die Watson-Crick-Basenpaare A13 – U119 und U14 – A118 (siehe **Abb. 2.2.3**) [55]. Montange et al. [58] untersuchten den Unterschied von SAM- und SAH-Bindungen an das Aptamer genauer. Mit Hilfe von Röntgenkristallographie wurde entdeckt, dass die beiden Aptamerstrukturen von Riboschaltern mit SAM und Riboschaltern mit SAH nahezu identisch sind. Durch zusätzliche Bindungsexperimente mit mutierten Riboschaltersequenzen konnte festgestellt werden, dass vor allem das Ersetzen der beiden Basenpaare in der P1-Helix durch G-C-Watson-Crickbasenpaare zu einer erheblichen Absenkung der Bindungsaffinität von SAM führte, jedoch kein Unterschied bei SAH gemessen wurde. Der Grund dafür ist, dass die elektrostatische Wechselwirkung von SAM die Bildung der P1-Helix unterstützt und stabilisiert. Durch die Watson-Crick-Basenpaarung der P1-Helix stehen die Nukleotide G118 – A125 nicht für die Ausbildung der AT-Helix zur Verfügung und ermöglichen so, dass das Molekül den T-Zustand einnimmt. Passend dazu erkennt man aus der Titrationsreihe dieser Arbeit mit SAH am Konstrukt RS_{EA1} , dass selbst bei sehr hohen Ligandenkonzentrationen eine nur leichte Verschiebung der Populationsanteile hin zu T-Konformationen bei niedrigen FRET-Effizienzen zu erkennen ist (siehe **Abb. 4.7.1**). Da SAH eine ähnliche Struktur besitzt wie SAM, kann es binden. Durch die neutrale Ladung des Schwefelatoms bei SAH kann die Bindungstasche jedoch nicht vollständig stabilisiert werden. Dies erklärt die Beobachtung einer nur schwachen Verschiebung der Populationsanteile hin zu den bekannten T-Strukturen. Bindet also das SAM in der Aptamerdomäne, so wird die Bildung der T1-Helix gefördert und somit die Ausbildung der

T-Struktur bevorzugt eingenommen.

Beim Konstrukt RS_{EA2} hingegen kann kaum eine Verschiebung der Populationsanteile von AT- zu T-Strukturen beobachtet werden. Hier bleiben die Anteile näherungsweise konstant. Durch den Donormarker an der Expressionsplattform und den Akzeptormarker an der P4-Helix kann dabei zwar zwischen AT- und T-Strukturen unterschieden werden, jedoch existiert keine direkte Information über den Zustand der P1-Helix. Nichtsdestotrotz kann man vom Titrationsexperiment mit SAH am Konstrukt RS_{EA2} ableiten, dass die fehlende Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration auf eine nicht existente Stabilisierung der P1-Helix zurückzuführen ist. Werden die Basenpaare A13 – U119 und U14 – A118 nicht durch SAM stabilisiert, findet keine gerichtete Übernahme der Nukleotide U120 – A125 in die P1-Helix, weg von der AT-Helix, statt. Folglich kann keine Verschiebung der Populationsanteile von AT- zu T-Zuständen bei SAH beobachtet werden.

4.8 Die Faltungsdynamik unter Einfluss von SAH

Um die Faltungskinetik unter SAH-Einfluss zu untersuchen, wurden für diese Arbeit FRET-Experimente an immobilisierten Molekülen des Konstruktes RS_{EA1} durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte nach **Protokoll A.4**. Die Intensitätstrajektorien der einzelnen immobilisierten Moleküle wurden am Konfokalmikroskop (siehe **Abb. 3.1.1**) gemessen. Die Pufferbedingungen der Moleküle wurden so eingestellt, dass sie vergleichbar zu den gemessenen Einzelmolekültrajektorien in Anwesenheit von SAM waren (siehe **Kapitel 4.3**). Die Moleküle des Konstruktes RS_{EA1} wurden folglich in RNS-Standardpuffer mit 15 mM Mg^{2+} und 10 μ M SAH untersucht. Ebenso wurde der Pufferlösung das Redox- und sauerstoffzehrende System beigefügt (siehe **Kapitel 3.2.1**), um möglichst lange Intensitätstrajektorien zu erhalten. Diese Einzelmolekültrajektorien wurden wieder dem strikten Auswahlverfahren unterzogen (siehe **Kapitel 3.4.5.1**), und der HMM-Analyse übergeben. Damit die Konsistenz der Modell- und Messdaten sichergestellt werden konnte, wurden die Ergebnisse erneut der in **Kapitel 3.5.3** erläuterten Validierungsprozedur unterzogen. Die Validierung ist in **Abb. 4.8.1** dargestellt. Mit einem HMM, bestehend aus fünf Zuständen, konnte schließlich ein reproduzierbares Modell gefunden werden, das der Validierungsprozedur standhielt. Der Vergleich zwischen den Histogrammen der gemessenen Daten (**Abb. 4.8.1 a**, in schwarz) und der simulierten Daten (**Abb. 4.8.1 a**, in rot) zeigen eine Übereinstimmung, bezogen auf die Amplitudenpositionen der FRET-Effizienzen und die Breiten ihrer Verteilungen. Auffällig ist jedoch, dass die Amplituden der simulierten Daten die Höhen der Amplituden der gemessenen Daten mit zunehmendem Zeitfenster tendenziell übersteigen. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass beim Erstellen des Hidden-Markov-Modells eine zu große, durchschnittliche Photonemissionsrate eines Moleküls (k_{mol} , siehe **Kapitel 3.5.1**) angesetzt wurde. Dies führte dann zu einem überhöhten Signal-Rausch-Verhältnis der simulierten Daten. Zur weiteren Verifizierung der Daten wurde im zweiten Schritt die Markov-Eigenschaft der gefundenen Zustände überprüft. Die Verweildauern der einzelnen Zustände zeigen jeweils einen einfachen exponentiellen Zerfall, sodass dem gefundenen HMM ein Markovprozess zu Grunde liegt.

Mit diesem Modell, das die Validierung bestanden hatte, konnte dann die weitere Datenanalyse durchgeführt werden. Die HMM-Analyse des RS_{EA1} mit Mg^{2+} und SAH ergab ein Fünf-Zustandsmodell, welches in **Abb. 4.8.2** dargestellt ist. Die Farben der Zustände entsprechen dem in **Abb. 4.8.1 b** gewählten Farbcode. Die Zustände sind als Kreise dargestellt, deren Durchmesser mit den Zustandspopulationen skaliert sind, und deren Koordinaten sich aus ihren gemittelten FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ und ihrer jeweiligen Zustandslebensdauer τ bestimmen (**Abb. 4.8.2 b**). Die gemittelten FRET-Effizienzen der HMM-Analyse in Anwesenheit des Liganden SAH wurden mit $\gamma = 2,54$ korrigiert. Das kinetische Netzwerk des HMM ist in **Abb. 4.8.2 c** geplottet. Vergleichbar zu den Ergeb-

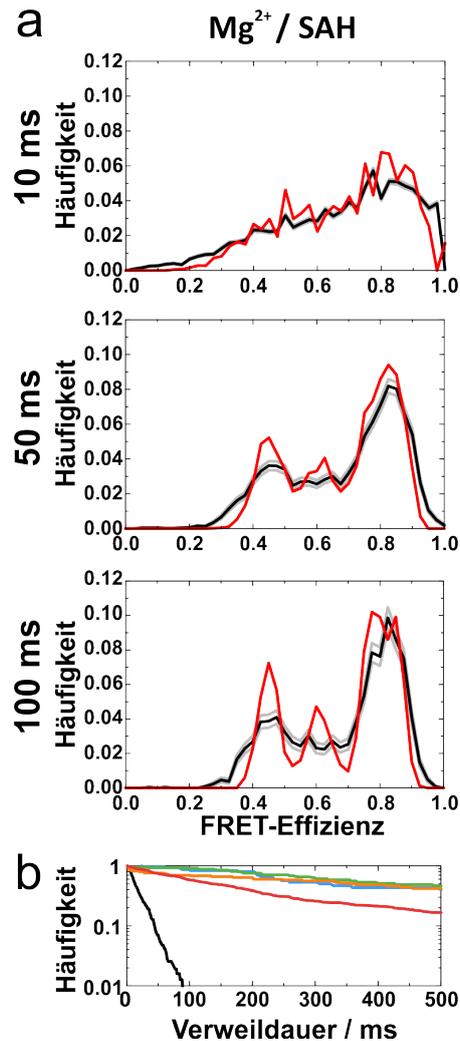


Abbildung 4.8.1: Validierung des Hidden-Markov-Modells der smFRET-SAHA-Daten. Das Schaubild zeigt die Validierung des Hidden-Markov-Modells für das Konstrukt RS_{EA1} bei 15 mM Mg^{2+} und 10 μM SAH. (a) Vergleich der simulierten FRET-Histogramme (rote Linien) mit den gemessenen Daten (schwarze Linien) und dem dazugehörigen 95 % Konfidenzintervall (grau umrahmtes Gebiet) für verschiedene zeitliche Binbreiten (Zeitfenster, 10, 50 und 100 ms). (b) Verteilung der Zustandslebensdauern, berechnet aus den Maximum-Likelihood-Pfaden. Die Farben der einzelnen Linien sind den einzelnen Zuständen zugeordnet.

nissen der HMM-Analyse der Trajektorien beim Konstrukt RS_{EA1} mit Mg^{2+} in Abwesenheit eines Liganden, findet man zwei langlebige Zustände (siehe **Abb. 4.8.2**, markiert in blau und grün) bei niedrigen FRET-Effizienzen. Die größeren Abstände zwischen Donor und Akzeptor beim Konstrukt RS_{EA1} konnten durch die vorangegangenen Untersuchungen (siehe **Kapitel 4.1**) jeweils den Terminatorzuständen zugeschrieben werden, mit T_1^{SAH} in grün bei $\langle E \rangle \approx 0,39$ und mit T_2^{SAH} in blau bei $\langle E \rangle \approx 0,26$. Ihre Zustandslebensdauern haben mit jeweils $\tau(T_1^{SAH}) = 878$ ms und $\tau(T_2^{SAH}) = 1906$ ms die gleiche Größenordnung wie die in Abwesenheit eines Liganden. Ebenso finden sich wieder zwei Zustände hoher FRET-Effizienz, welche auf Grund vergleichbarer FRET-Effizienzwerte mit vorangegangenen Untersuchungen als AT-Zustände interpretiert werden, mit AT_1^{SAH} in rot bei $\langle E \rangle \approx 0,72$ und mit AT_2^{SAH} in orange bei $\langle E \rangle \approx 0,58$. Während der Zustand AT_1^{SAH} eine kurze Zustandslebensdauer von $\tau(AT_1^{SAH}) = 127$ ms besitzt, vergleichbar zum Zustand AT_1 in Abwesenheit eines Liganden, ist die Zustandslebensdauer des Zustandes AT_2^{SAH} mit $\tau(AT_2^{SAH}) = 1389$ ms um ein Zehnfaches länger als die des Zustandes AT_2^{SAM} , sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Liganden SAM. Durch das HMM konnte außerdem ein fünfter Zustand aufgedeckt werden. Er besitzt eine FRET-Effizienz von $\langle E \rangle \approx 0,36$

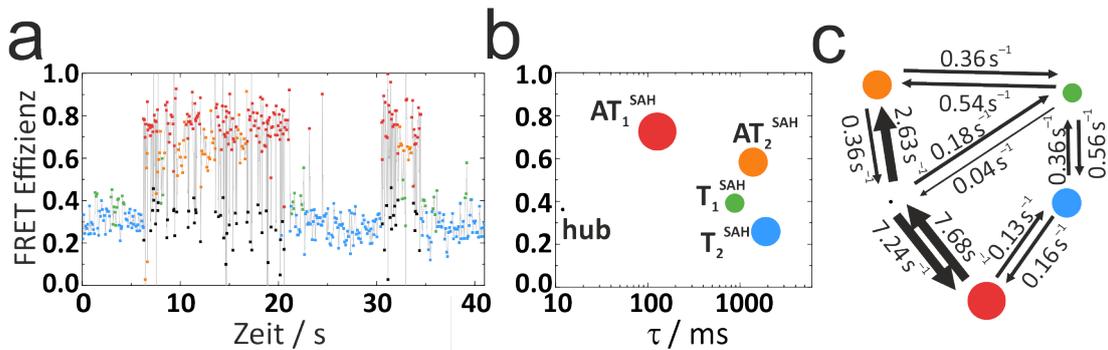


Abbildung 4.8.2: HMM-Analyse der Faltungsdynamik des SAM-I-Riboschalters mit SAH. (a) Beispiel für eine typische Einzelmolekül-FRET-Messung eines immobilisierten RS -Moleküls RS_{EA1} in Standardpuffer, 15 mM Mg^{2+} und 10 μ M SAH. Basierend auf einer zeitlichen Auflösung der Intensitätsmessung der Fluoreszenz von 100 μ s, wurden 1000 Datenpunkte eines durch das HMM identifizierten Zustandes zu einem gemittelten FRET-Effizienzwert zusammengefasst. Somit wurden die Messdaten in Zeitintervallen von 100 ms gemittelt. Falls durch das HMM weniger aufeinanderfolgende Datenpunkte zum selben Zustand zugeordnet werden konnten, wurden entsprechend weniger Datenpunkte zu einem Wert gemittelt. (b) Zweidimensionaler Punktplot der fünf durch das HMM identifizierten Zustände, dargestellt durch Kreise, deren Flächen proportional zu ihrer Population als Funktion der FRET-Effizienz über der Zeit liegen. (c) Kinetisches Netzwerk der Zustandsumwandlungen mit ihren mikroskopischen Ratenkoeffizienten, entnommen aus den Nebendiagonalelementen der Übergangsmatrix \hat{T} des zugrundeliegenden Hidden-Markov-Modells. Die unterschiedlichen Pfeildicken verdeutlichen die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen i und j und skalieren mit der Größenordnung O der Ratenkoeffizienten k_{ij} der Gleichgewichtspopulationen, wobei $k_{ij} = O(10^{-1})$ (fett gedruckt), $k_{ij} = O(10^{-2})$ (mittelstark gedruckt) und $k_{ij} = O(10^{-3})$ s⁻¹ (dünn gedruckt) repräsentiert.

und eine sehr kurze Zustandsverweildauer von $\tau \approx 15$ ms. Dieser fünfte Zustand zeigt im kinetischen Netzwerk einen schnellen Austausch zwischen beiden AT-Zuständen. Zustandswechsel auf dieser Zeitskala sind normalerweise Änderungen der Tertiärstruktur zuzuordnen. Dies spricht dafür, den Zustand bei $\langle E \rangle \approx 0,36$ der AT-Konformation mit AT_3^{SAH} zuzuweisen. Der gefundene Zustand kann auf Grund des kinetischen Netzwerks als Übergangszustand zwischen AT_1^{SAH} und AT_2^{SAH} ausgelegt werden.

Die Übergänge zwischen den gefundenen T- und AT-Zuständen finden wieder auf der Sekundenskala statt. Strukturelle Zustandswechsel zwischen Sekundärstrukturen benötigen einen höheren Energieaufwand. So sind die Energiebarrieren zwischen Zuständen unterschiedlicher Sekundärstruktur höher und der Übergang weniger wahrscheinlich, weshalb diese Übergänge seltener auftreten. Daher kann man Änderungen zwischen FRET-Zuständen, welche auf der Sekundenskala beobachtet werden, strukturellen Wechsels zwischen Sekundärstrukturen von RNS-Molekülen zuordnen. Die Equilibrierungszeiten τ_{eq} ergaben bei dieser Analyse keine eindeutige Faltungshierarchie, welche direkt zu den HMM-Ergebnissen in An- und Abwesenheit von SAM vergleichbar sind. Zwar konnten erneut schnelle Equilibrierungszeiten $\tau_{eq} = 0,01$ s zwischen zwei Zuständen gefunden werden, hier jedoch zwischen AT_1^{SAH} (rot) und dem neu entdeckten Zustand AT_3^{SAH} (schwarz).

Weiterhin konnte aufgedeckt werden, dass die Zustände AT_1^{SAH} , AT_2^{SAH} und AT_3^{SAH} sowie T_1^{SAH} und T_2^{SAH} langsam mit einer Zeit von $\tau_{eq} = 1,4$ s equilibrieren. Zusätzlich wurde eine weitere Equilibrierungszeit von $\tau_{eq} = 0,6$ s zwischen AT_2^{SAH} (orange) und T_1^{SAH} (grün) entdeckt. Diese kinetische Gruppierung der Zustände ist jedoch keine echte Teilmenge der Zustände bei längeren Equilibrierungszeiten, denn der Zustand T_1^{SAH} equilibriert bei Zeitfenstern größer $\tau_{eq} = 1,4$ s mit T_2^{SAH} . Daher konnte mit dieser Auswertung kein eindeutiger Faltungspfad zwischen den Zuständen bestimmt werden. Die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle_i$, die Gleichgewichtspopulationen π_i und die Zustandslebensdauern τ_i der jeweiligen Zustände aus dem HMM des Riboschalters in Anwesenheit des Liganden SAH, sowie die Datenbasis dieser Messreihe sind in **Tab. 4.8** zusammengefasst. Die Equilibrierungszeiten der vorangegangenen HMM-Analysen des Konstrukts RS_{EA1} in An- und Abwesenheit von SAM zeigten immer eine eindeutige hierarchische Gruppierung der Zustände mit zunehmender Länge der Zeitfenster, in welchen die Zustände nicht mehr voneinander unterscheidbar waren. Daher musste bei dem Fünf-Zustands-Modell des Konstrukts RS_{EA1} in Anwesenheit von SAH nach der HMM-Analyse zusätzlich eine TPT-Analyse (siehe **Kapitel 2.6.4**) durchgeführt werden. Dafür wurde der kompakteste AT-Zustand AT_1^{SAH} (rot) als Startpunkt, und der meist populierte T-Zustand T_2^{SAH} (blau) als Endzustand definiert. Die TPT-Analyse berechnete dann den wahrscheinlichsten Faltungspfad zwischen Start- und Endpunkt. Dies wurde mit Hilfe der frei erhältlichen Analysesoftware EMMA, durchgeführt [146].

In **Abb. 4.8.3** sind die Kommittorwerte (q^+) über der FRET-Effizienz der Zustände aufgetragen. Die Pfeildicken sind auf die Wahrscheinlichkeit der Zustandsübergänge (Flux) skaliert und werden aus den Übergangsraten berechnet [140].

Tabelle 4.8: Datenbasis der HMM-Analyse des Konstrukts RS_{EA1} in Anwesenheit von SAH. Die Tabelle zeigt die durch die HMM-Analyse bestimmten mittleren FRET-Effizienzwerte $\langle E \rangle_i$, die Gleichgewichtspopulationen π_i , sowie die mittleren Zustandslebensdauern τ_i eines gefunden i -ten Zustandes. $t_{gesamt,i} = \pi_i * t_{gesamt}$ ergibt die kumulierte Gesamtlänge eines gemessenen Zustandes. $t_{gesamt} = 266$ s entspricht der Gesamtlänge der selektierten Trajektorien in Anwesenheit des Liganden SAH. N_i entspricht der errechneten Anzahl an beobachteten Übergängen.

Zustand	$\langle E \rangle_i$	π_i	τ_i / ms	$t_{gesamt,i} / s$	N_i
$RS_{EA1}, [Mg^{2+}] = 15 \text{ mM} / [SAH] = 10 \mu\text{M}$					
T_1^{SAH}	0,39	0,16	878	42,6	49
T_2^{SAH}	0,26	0,24	1906	65,5	34
AT_1^{SAH}	0,72	0,32	127	84,4	664
AT_2^{SAH}	0,58	0,24	1389	64,6	47
AT_3^{SAH}	0,36	0,03	12	9,0	745

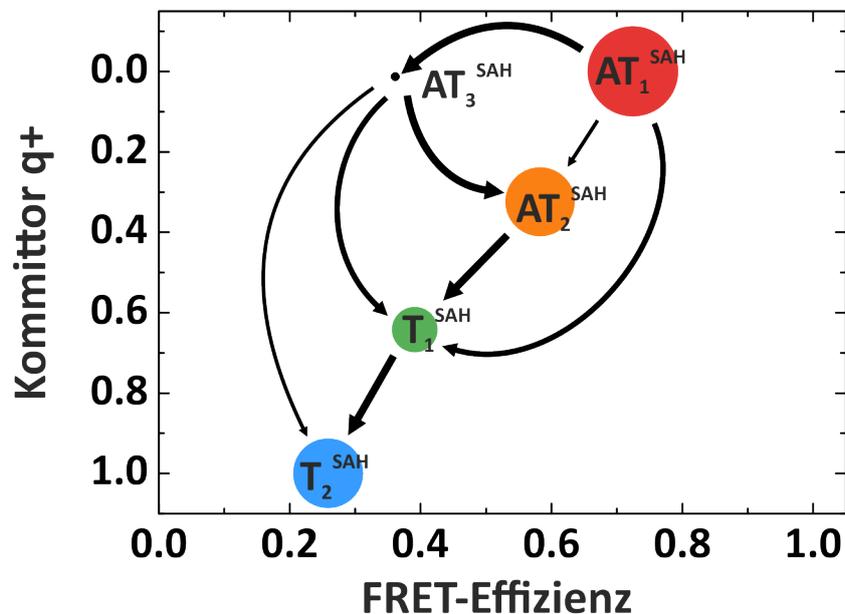


Abbildung 4.8.3: Faltungspfad des SAM-I-Riboschalters unter Einfluss von SAH. Gezeigt ist das vollständige, gerichtete Faltungspfadensemble, beginnend mit dem kompaktesten Antiterminatorzustand. Darauf folgen der Faltungszustand AT_1^{SAH} (roter Punkt) und der definierte Endzustand T_2^{SAH} (blauer Punkt). Die Zustände AT_2^{SAH} , AT_3^{SAH} und T_1^{SAH} sind jeweils als orangene, schwarze und blaue Kreise dargestellt. Die Durchmesser der Kreise sind proportional zur Population der Zustände. Die Zustände wurden entlang ihrer Faltungswahrscheinlichkeit, den Kommitterwerten q^+ , sortiert und über der FRET-Effizienz aufgetragen. Die Pfeildicken skalieren mit dem Wahrscheinlichkeitsfluss f_{ij}^+ von einem zum nächsten Zustand und entsprechen Ratenkoeffizienten mit $f_{ij}^+ = O(10^{-1})$ (fett gedruckt), $f_{ij}^+ = O(10^{-2})$ (mittelstark gedruckt) und $f_{ij}^+ = O(10^{-3}) \text{ s}^{-1}$ (dünn gedruckt).

Die Kommittorwerte beschreiben die Wahrscheinlichkeit eines Systems, von einem gewissen Zustand zum nächstbesten Zustand zu wechseln. Der wahrscheinlichste Faltungspfad ist der, der vom roten AT_1^{SAH} Zustand, welcher als Startzustand gesetzt wurde, über den neuen Übergangszustand AT_3^{SAH} nach AT_2^{SAH} verläuft. Verfolgt man den Faltungspfad weiter, so sind Übergänge AT_3^{SAH} zu AT_2^{SAH} am wahrscheinlichsten. Um in den Terminatorzustand zu falten, existieren nun drei konkurrierende Pfade. Entweder gelangt das Molekül von AT_2^{SAH} nach T_1^{SAH} , oder von AT_3^{SAH} bzw. von AT_1^{SAH} nach T_1^{SAH} . Basierend auf den Kommittorwerten q^+ ist der erste Pfad der drei am wahrscheinlichsten. Die beiden anderen Pfade können vermutlich zusammengefasst werden. Denn hinsichtlich der seltenen und kurzen Verweildauern im Zustand AT_3^{SAH} sowie der schnellen Zustandswechsel zwischen AT_1^{SAH} und AT_3^{SAH} erscheint es durchaus möglich, dass die Beobachtung dieser Zustandsübergänge bei einem Bin von je 1 s nicht immer ausreichend war. Die anschließende Faltung von T_1^{SAH} nach T_2^{SAH} vervollständigt den Faltungspfad. Unter der Annahme, dass die Faltung von RNS-Molekülen immer hierarchisch abläuft, bedeutet dies, dass der Zustand AT_3^{SAH} tatsächlich einer AT-Konformation zuzuordnen wäre. Der Zustand AT_3^{SAH} agiert kinetisch als Zwischenzustand von AT_1^{SAH} und AT_2^{SAH} . Jedoch kann auch beobachtet werden, dass er ein Übergangszustand zu den T-Konformationen ist, wenn auch selten gemessen.

Betrachtet man die schnelle Faltungsdynamik von AT_3^{SAH} zu AT_1^{SAH} und AT_2^{SAH} sowie das Ergebnis der TPT-Analyse, ist es wahrscheinlich, dass diese Faltungen Tertiärstrukturänderungen der Riboschalterstruktur zuzuordnen sind. Folglich muss es einen kompakten Zwischenzustand geben, welcher sowohl die Möglichkeit einer schnellen Schaltung zwischen AT-Zuständen ermöglicht als auch die Ausbildung einer T-Struktur zulässt. Ein solcher Zwischenzustand könnte eine Struktur mit geschlossener P1'-Helix ($A_{13} - U_{15}$ mit $U_{120} - G_{118}$) sowie einer teilweise ausgebildeten AT-Helix mit offenem 5'-Ende einnehmen. Durch die Anwesenheit dem Liganden SAH könnte das Aptamer eine Art vorgefaltete Bindungstasche besitzen, welche die Bildung der P1'-Helix ermöglicht. Ein zusätzliches freies Helix-Stück im AT-Zustand würde den Abstand im Konstrukt RS_{EA1} im Bereich von 25 Å verlängern. Dadurch würden sich die größeren Abstände zwischen Donor und Akzeptor von AT_3^{SAH} mit $\langle E \rangle = 0,36$, $R = 58$ Å gegenüber den anderen AT-Zuständen erklären lassen. Berechnet und modelliert wurde dieses Modell basierend auf den strukturellen Abschätzungen aus **Abb. 4.4.4** und **Abb. 4.8.4 c**.

Gegen ein solches Modell spricht jedoch die gegenüber des Liganden SAM fehlende Fähigkeit, die P1'-Helix zu stabilisieren. Durch die fehlende Ladung des SAH wird eine Watson-Crick-Basen-Paarung von $A_{13} - U_{15}$ mit $U_{120} - G_{118}$ nicht bevorzugt gebildet, da die stabilisierende Wirkung des positiv geladenen Schwefelatoms fehlt. Daher könnte auch nur ein Zwischenzustand erzeugt worden sein, der mit SAH eine nur teilweise ausgebildete Bindungstasche besitzt. So wäre ein Zwischenzustand AT_3^{SAH} zu beobachten, der eine offene P1-Helix mit einer geschlossenen AT-Helix besitzt (siehe in **Abb. 4.8.4 b**). Mit einer solchen Struktur wäre es möglich, durch Ausbildung von Watson-Crick-Basen-Paaren in kurzer Zeit eine P1'-Helix und eine P1''-Helix auszubilden. Ebenso wäre die Bildung einer T-Struktur denkbar. Damit ist der Zustand AT_3^{SAH} nicht nur ein Übergangszustand zwischen beiden AT-Strukturen (AT_1^{SAH} und AT_2^{SAH}), sondern auch ein Übergangszustand zur alternativen Sekundärstruktur.

Wechsel der Populationsanteile der T-Zustände im thermodynamischen Gleichgewicht, jedoch wird die Geschwindigkeit der Wechsel und die Faltungsdynamik durch den Liganden SAM erheblich beschleunigt.

Eine eindeutige Aufteilung der breiten FRET-Histogramme in einzelne Zustände war nur durch Hinzuziehen einer HMM-Analyse möglich. Durch die Fähigkeit der HMM-Analyse, nicht nur spektroskopische, sondern auch zeitliche Informationen der Datensätze zu verwerten, gelingt es einem diskreten Satz an Zuständen mit definierten mittleren FRET-Effizienzen und Zustandslebensdauern zu finden, welche dem Datensatz bzw. den Faltungseigenschaften des Riboschalters entsprechen.

Jedoch besitzt die verwendete HMM-Analysesoftware noch einige Schwächen. So wird bislang nur das detektionskanalspezifische Hintergrundsignal als trajektorienabhängig und somit molekülabhängig betrachtet. Weitere beeinflussende Faktoren wie spektrales Übersprechen, unterschiedliche Detektionseffizienzen der Detektoren und verschiedene Quantenausbeuten der Fluoreszenzmoleküle wurden als einzelmolekülunabhängig betrachtet. Während das spektrale Übersprechen von Fluoreszenzlicht durch die optischen Filter im Detektionsstrahlengang eine messungsunabhängige Größe ist, gilt das nicht zwingend für die Quantenausbeute und die Detektionseffizienz. Durch die Entscheidung, Einzelmolekülexperimente an einzelnen, immobilisierten Riboschaltern durchzuführen, können sich molekülabhängige Unterschiede in der Quantenausbeute ergeben. Zwar wurde durch die gewählte Methode eine homogene und kaum fluoreszenzbeeinflussende Oberfläche zum Immobilisieren verwendet, jedoch kann dennoch eine Beeinflussung der Quantenausbeute des Donors und des Akzeptors durch dynamisches Quenchen nicht ausgeschlossen werden. Für Fluoreszenzmarker mit langen Verbindungspolymeren zu RNS-Molekülen mitteilt sich dieser Effekt bei Beobachtungszeiten im Bereich von $100 \mu\text{s}$ heraus, wie anhand von Anisotropieexperimenten gezeigt werden konnte [148, 191]. Daher kann weiterhin angenommen werden, dass die Quantenausbeute innerhalb eines Zustandes konstant bleibt. Trotzdem könnte die Quantenausbeute für andere Zustände in anderen Konformationen oder für andere Moleküle bei leicht abweichenden Umgebungsbedingungen unterschiedlich sein.

Durch die langen Messzeiten der gewählten Mikroskopiemethode ergeben sich gegebenenfalls Veränderungen in der Detektionseffizienz, weil das Mikroskop selbst und damit der Fokus nicht stabil über die gesamte Beobachtungszeit aller Moleküle ist. Selbst durch eine gute Justage ist eine perfekte Überlappung der Anregungs- als auch Detektionsvolumina von Donor- und Akzeptorsignal nicht immer gewährleistet. Folglich kann es zu kleinen, messzeitabhängigen Änderungen in der Detektionseffizienz kommen. Solche Effekte lassen sich durch die Bestimmung trajektorienspezifischer γ -Faktoren korrigieren, sodass eine konstante Gesamtphotonenemissionsrate k_{mol} für alle Zustände und alle Molekültrajektorien bestimmt werden konnte. Es wäre sinnvoll, die verwendete HMM-Analyse so zu erweitern, dass trajektorienspezifische γ -Faktoren mit einbezogen werden. Damit die Likelihoodfunktion der HMM-Analyse dennoch keine Fehlinterpretationen der Zustände erzeugt, bedarf es vermutlich tieferer Eingriffe in die bestehende Software. Eine solche Korrektur würde eine präzisere Zuordnung von Messdaten zu Zuständen und der damit verbundenen Dynamik ergeben und wäre unabhängiger von äußeren Einflüssen der Messung. Die Einflüsse der trajektorienspezifischen Abweichungen der γ -Faktoren, wie sie in dieser Arbeit vorkommen, sind jedoch als gering einzuschätzen. Durch die strikte Auswahl der Intensitätstrajektorien wurden solche aussortiert, deren γ -Faktoren zu stark von

den erwarteten Werten abweichen. Somit konnte der Einfluss stark variierender γ -Faktoren verhindert werden. Weiterhin hätte die HMM-Analyse im Falle von zu stark variierenden Werten normalerweise keine reproduzierbaren Ergebnisse geliefert, da sonst die Anzahl möglicher Variationen von Zustandszuordnungen zu groß geworden wäre oder der Validierungsprozess falsche Zustandszuordnungen aufgedeckt hätte.

Innerhalb der strengen Auswahlkriterien wurden in dieser Arbeit aus mehreren hundert Molekültrajektorien sechs für die HMM-Analyse ausgewählt, deren kumulierte Länge eine Gesamtzeit von $t_{gesamt} = 266$ s beträgt. Zwar wurden viele Datenpunkte gemessen, trotzdem besteht die Möglichkeit, kein vollständiges Bild der Energielandschaft erzeugt zu haben. Zur Erzeugung eines konsistenteren Hidden-Markov-Modells sollten noch mehr Trajektorien gemessen und der Analyse zur Verfügung gestellt werden. Vor allem seltene Zustandsübergänge könnten damit voraussichtlich öfter beobachtet werden. Damit könnte gegebenenfalls eine eindeutige Energielandschaft bestimmt, und definierte Faltungspfade ermittelt werden. Zusätzlich sind weitere FRET-Messungen mit anderen Konstrukten sowie mit variierenden Ligandenkonzentrationen nötig, um eine bessere und genauere strukturelle Zuordnung der einzelnen Zustände vornehmen zu können. Um die schnellen Moleküldynamiken beim Wechsel zwischen den AT-Strukturen, vor allem in Anwesenheit der Liganden SAM und SAH, erfassen zu können, werden weitere FRET-Experimente mit einer höheren Abtastrate im Mikrosekundenbereich benötigt. Eine mögliche Methode zur Untersuchung schneller Faltungen wäre die Photon-zu-Photon-Analyse (*engl. photon-by-photon analysis*) von Chung et al. [202, 203]. Um aber genügend Fluoreszenzsignal zu erhalten, müssten gleichzeitig die Anregungsleistungen der Anregungslaser für Donor und Akzeptor erhöht werden. Nachteilig wären dann jedoch das Bleichen der Fluoreszenzmoleküle. Daher müssten entweder noch effektivere redox- und sauerstoffzehrende Systeme oder stabilere Farbstoffmoleküle verwendet werden. Ebenso wäre es denkbar, mit dem gegebenen System immer nur kurze, dafür sehr viele Trajektorien mit hoher Anregungsleistung zu messen, um eine genügende Statistik der einzelnen, hauptsächlich schnellen Zustandsübergänge zu erhalten. Für eine eindeutige Zustandszuordnung der Molekülstrukturen ist die Bestimmung der Kristallstrukturen mit beiden Liganden, SAM und SAH, nötig.

Eine weitere Möglichkeit, um das Zusammenspiel zwischen Aptamerkonformation und dem Faltungszustand der Expressionsplattform zu untersuchen, bieten Experimente mit der Multifarben-Einzelmolekülspektroskopie. Damit könnten detailliertere Faltungsabhängigkeiten von Substrukturen des Riboschalters untersucht werden. So könnten mit dem bestehenden Aufbau des Konfokalmikroskops zusätzliche Dreifarben-Einzelmolekül-FRET-Experimente durchgeführt werden. Die Synthese der RNS-Moleküle, die Messung, Auswertung und Interpretation der Daten wären dann weitaus komplexer als die bisherigen Experimente mit nur zwei Fluoreszenzmolekülen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb der letzten Jahrzehnte konnten durch die intensive Erforschung von Biopolymeren wie Proteinen und RNS-Molekülen enorme Fortschritte in der Biophysik erzielt werden. Dabei wurde eine Vielzahl an neuen RNS-Molekülen entdeckt, die neben der bekannten Funktion als DNS-Transkript auch katalytische und regulatorische Aufgaben in Organismen übernehmen. Funktionale RNS-Moleküle sind damit attraktive Kandidaten für die Entwicklung neuer Medikamente oder für gentechnische Anwendungen in der synthetischen Biologie. Riboschalter sind eine Subgruppe dieser RNS-Moleküle. Sie regulieren durch Bindung spezifischer Liganden die Bildung verschiedener Gene. Bis heute sind 20 Riboschalterfamilien entdeckt worden, von denen eine Gruppe in den Schwefelstoffwechsel eingebunden ist – die sogenannten SAM-Riboschalter. Ein Schlüssel zum Verständnis ihrer Funktion liegt in der Untersuchung ihrer Struktur, ihrer Faltungsdynamik und den damit verbundenen molekularen Eigenschaften. Einzelmolekül-FRET-Experimente haben sich dafür als eine leistungsfähige Untersuchungsmethode erwiesen. Damit können einzelne Moleküle über eine lange Zeit beobachtet werden. Durch die Wahl moderner Mikroskopietechnik sind außerdem eine zeitlich und räumlich hochaufgelöste Beobachtung der Moleküldynamik *in vivo* möglich. Zusammen mit fortschrittlicher Analysesoftware, wie beispielsweise einer HMM-Analyse, können selbst seltene Molekülzustände und Faltungsdynamiken aufgedeckt werden, die maßgeblich zum Verständnis der Molekülfunktion beitragen.

Auf Grund der hohen Komplexität von Untersuchungen großer RNS-Moleküle wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Untersuchung des SAM-I-Riboschalters gelegt. Zwar wurde in vorangegangenen Projekten der ligandenbindende Teil des SAM-I-Riboschalters, das Aptamer, intensiv untersucht, jedoch ist bisher nur wenig über die Funktion des vollständigen Riboschalters bekannt.

Diese Arbeit präsentiert die erste Untersuchung biomolekularer Dynamik eines vollständigen SAM-I-Riboschalters des *Bacillus subtilis yitL* mit Hilfe von Einzelmolekül-Försterresonanzenergietransfer und einer HMM-Analyse dieser Messdaten. Insgesamt wurden mit drei unterschiedlich markierten Konstrukten desselben Riboschalters Messungen durchgeführt. Ein Konstrukt, RS_{AA} , wurde nur am Aptamer mit einem fluoreszenten FRET-Paar markiert, sodass damit das Faltungsverhalten des Aptamers mit der Expressionsplattform untersucht werden konnte. Die beiden anderen Konstrukte, RS_{EA1} und RS_{EA2} , besaßen die gleiche Donormarkierung an der Expressionsplattform; die Akzeptormarkierungen waren jedoch an unterschiedlichen Stellen der Aptamerdomäne angebracht. So konnte das Faltungsverhalten der Expressionsplattform in Bezug auf das Aptamer erforscht werden. Zunächst wurden Magnesiumionentitrationsexperimente über einen weiten Konzentrationsbereich durchgeführt. Diese ergaben Aufschluss über die strukturelle Kompaktierung der Moleküle unter Einfluss divalenter Ionen, die essentiell

für die Strukturbildung von RNS-Molekülen ist. Hierbei konnten bis zu zwei Zustände niedriger FRET-Effizienz bei niedriger Ionenkonzentration gemessen werden. Durch die sukzessive Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration wurde jeweils eine weitere, breit verteilte Subpopulation bei hohen FRET-Effizienzen aufgedeckt werden. Im nächsten Schritt wurden vergleichbare SAM-Titrationsexperimente bei konstanter Ionenkonzentration durchgeführt, um den Effekt der Ligandenbindung auf das Faltungsverhalten zu erhalten. Durch die Erhöhung der Ligandenkonzentration konnte festgestellt werden, dass die Subpopulationen niedriger FRET-Effizienzen bevorzugt eingenommen werden. Damit konnten die Subpopulationen niedriger FRET-Effizienz dem Terminator-Zustand, der den Abbruch der Gentranskription initiiert, zugeordnet werden. Subpopulationen hoher FRET-Effizienz wurden folglich Antiterminator-Zuständen zugeordnet. Sie beeinflussen den Fortschritt der Genvervielfältigung nicht.

Da Standardmethoden, wie das Fitten zustandsspezifischer Gauß-Verteilungen an FRET-Histogrammen nur bei zwei bis maximal drei diskreten FRET-Effizienzverteilungen ansetzbar sind, mussten weitere Mess- und Analyseverfahren in dieser Arbeit hinzugezogen werden. Die gefundenen breiten Verteilungen der FRET-Effizienzen aus den Titrationsexperimenten ließen zunächst keine detaillierten Aussagen zum Faltungsverhalten der Moleküle zu. Um mehr Zustände auflösen und die Faltungsdynamik der Riboschaltermoleküle messen zu können, wurden hohe Aufwände betrieben und sowohl sehr lange als auch hoch zeitaufgelöst die Fluoreszenzintensitätstrajektorien einzelner, immobilisierter Moleküle gemessen. Zusätzlich wurden diese Trajektorien einer HMM-Analyse unterzogen. Dadurch konnten sowohl spektroskopische als auch temporale Informationen der Intensitätsmessungen genutzt und vier Faltungszustände in Ab- und Anwesenheit des Liganden SAM beim Konstrukt RS_{EA1} aufgedeckt werden. Zudem erhielt man die Faltungsdynamik bei Zustandsübergängen. Durch die Untersuchungen des Moleküls in Ab- und Anwesenheit des Liganden SAM konnten unterschiedliche Faltungsdynamiken entdeckt werden. Weiterhin wurden unter den jeweils vier Zuständen zwei Terminatorzustände bei niedrigen FRET-Effizienzen und jeweils zwei Antiterminatorzustände bei hohen FRET-Effizienzen gefunden.

Die Messungen in Abwesenheit von SAM bestätigten die Annahmen der vorangegangenen Titrationsexperimente. Eine schnelle Faltungsdynamik zwischen den Terminator- und den Antiterminatorzuständen bestätigten zusätzlich die Zuordnung der Zustände. Denn schnelle Faltungsdynamiken sind Tertiärzustandsänderungen zuzuordnen, welche nur innerhalb der Subpopulationen von Terminator oder Antiterminator beobachtet werden können. Die Faltungsdynamik zwischen Terminator- und Antiterminatorzuständen war hingegen langsam und auf typischen Zeitskalen von Sekundärstrukturänderungen, wie sie für strukturelle Änderungen zwischen der vorliegenden Terminator- und Antiterminatorstruktur typisch sind. Die HMM-Analyse der Trajektorien in Anwesenheit des Liganden SAM ergab eine markante Beschleunigung der gesamten Moleküldynamik. Es wurde festgestellt, dass der Ligand nicht nur eine Verschiebung der Populationen hin zu Terminatorzuständen erzeugt, sondern auch die Energiebarrieren zwischen den Zuständen verringert. Anschließend gelang es, durch Ansetzen einer Fit-Strategie mit zustandsspezifischen Gauß-Verteilungen die vier gefundenen Zustände in Abwesenheit von SAM auf die FRET-Histogramme der Magnesiumionentitrationen anzupassen. Damit konnte ein konsistentes Zustandsmodell in Abwesenheit von SAM erstellt werden. Leider gelang es nicht, ein solches Fit-Modell auch für die Daten mit SAM zu bestimmen. Da die Histogramme

der SAM-Titration Mischzustände aus ligandengebundenen und -ungebundenen Zuständen zeigen, müsste dafür ein Fit-Modell aus acht Zuständen angesetzt werden. Basierend auf den heutigen Daten und dem bisherigen Wissen ist dies noch nicht möglich. Mit den erhaltenen HMM-Daten konnten die Zustandspopulationen, die Wechsel zwischen den Zuständen und die Zustandslebensdauern bestimmt werden. Zusammen mit bekannten Messdaten aus vorherigen FRET-Experimenten der Aptamerdomäne und durch das Hinzuziehen der gemessenen Kristallstruktur des Aptamers konnten die gefundenen Zustände möglichen Molekülstrukturen zugeordnet werden. Damit wurde eine Energielandschaft des Riboschalters erstellt, die dessen Faltungsverhalten widerspiegelt.

In einem weiteren Schritt wurden zusätzliche Messdaten des Konstruktes RS_{EA2} einbezogen. Durch die Analyse dieses Datensatzes konnte festgestellt werden, dass vier Zustände nicht ausreichend waren, um ein globales Modell des SAM-I-Riboschalters über alle Messdaten zu erstellen. So stellte sich heraus, dass der zusätzliche Datensatz von RS_{EA2} zwei Terminatorzustände auflösen konnte, welche bei den anderen beiden Konstrukten auf Grund der ähnlichen FRET-Effizienz zu anderen Zuständen verdeckt geblieben sind. Daher konnte ein T-Zustand in zwei Subzustände aufgespalten werden: in einen Zustand mit offenem Aptamer und einen Zustand mit geschlossener Bindungstasche des Aptamers. Durch Einbeziehen der Daten des Konstrukts RS_{EA2} konnte außerdem zusammen mit dem Datensatz von RS_{EA1} eine Triangulation durchgeführt werden, der den Aufenthaltsort der Terminatorhelix, die den Abbruch der Gentranskription initiiert, einschränkt.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit weitere Datensätze, nämlich das Faltungsverhalten des SAM-ähnlichen Liganden SAH (einem Abfallprodukt von SAM im Schwefelstoffwechsel) diskutiert. Hier wurden sowohl Titrationsexperimente mit SAH als auch HMM-Analysen von Einzelmolekültrajektorien immobilisierter Riboschalter in Anwesenheit von SAH durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen, dass Riboschalter zwischen nur leicht unterschiedlichen Liganden unterscheiden können. Sowohl die kaum messbare Veränderung der Verteilung der Subpopulationen innerhalb der FRET-Histogramme, selbst bei sehr hohen SAH-Konzentrationen im Millimolarbereich, als auch die Veränderung der Faltungsdynamik weisen starke Unterschiede zu den Daten in An- und Abwesenheit von SAM auf. Durch die HMM-Analyse der Einzelmoleküldaten des Konstrukts RS_{EA1} in Anwesenheit von SAH wurde ein weiterer Zustand aufgedeckt. Dieser war leider nicht konsistent mit dem globalen Fünfstanzmodell der vorangegangenen Analysen, kann jedoch tendenziell einem Antiterminatorzustand zugeordnet werden. Da dieser zusätzliche Zustand nur sehr kurzlebig ist und nur selten beobachtet werden konnte, ist dieser Rückschluss jedoch nicht eindeutig.

Zusammenfassend konnten alle Histogramme der Konstrukte RS_{AA} , RS_{EA1} und RS_{EA2} in An- und Abwesenheit von SAM mit einem erweiterten Fünfstanzmodell beschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen Magnesiumionenkonzentrationen eine flexible Molekülstruktur existiert. Durch das Hinzufügen des Liganden SAM stabilisieren sich ligandengebundene Strukturen. Dies entspricht einem Bindungsmodell, in dem sich die Struktur erst in Anwesenheit eines Botenstoffes dem Liganden anpasst (*engl. Induced-Fit-Model*). Erhöht man die Ionenkonzentration, so sind Terminator- und Antiterminatorzustände zwar noch koexistent, jedoch ist eine verstärkte Kompaktierung und Stabilisierung der Molekülstruktur messbar. SAM bindet dann an die Strukturen, die einem ligandengebundenen Zustand nahe kommen. Das Bindungsmodell, bei welchem ein Botenstoff an solche Strukturen mit nahezu ausgebildeter Bindungstasche bindet, wird

Conformational Selection genannt. Aus dem Wissen, dass die Strukturbildung des SAM-I-Riboschalters während seiner eigenen Transkription auf die An- und Abwesenheit des Botenstoffes SAM reagiert, konnte gefolgert werden, dass gerade die schnelle Faltungsdynamik in Anwesenheit des Liganden SAM eine Schlüsselrolle in der Genregulierung spielt, da sie ein schnelles Schalten zwischen Terminator- und Antiterminatorzustand ermöglicht.

Mit dieser Arbeit konnte das Verständnis über das strukturelle Verhalten und die Funktion des SAM-I-Riboschalters vertieft werden. Jedoch sind weitere Experimente notwendig, um ein vollständiges Bild der Riboschalterstruktur zu erhalten. Hierzu sollten FRET-Experimente mit weiteren, neuen, farbstoffmarkierten Konstrukten durchgeführt werden. Dies könnte es ermöglichen, die Position der Terminatorschleife in Bezug auf das Aptamer genauer zu bestimmen. Eine Erweiterung der FRET-Experimente in ein Drei-Farben-FRET-Experiment mit drei Fluoreszenzmarkern könnte die Abhängigkeit von Aptamer und Expressionsplattform aufzeigen. Außerdem wäre es interessant, die Kristallstruktur eines vollständigen Riboschalters vermessen zu können. Diese Daten wären hilfreich, um die hier genäherten Strukturmodelle zu bestätigen oder zu verbessern. Weiterhin könnten Struktur- und Dynamiksimulationen des Riboschalters erheblich zum Verständnis von Struktur und Funktion desselben beitragen. All diese Informationen bergen das Potential, zukünftig die Vorgänge in lebenden Organismen noch besser zu verstehen.

Anhang

A Protokolle: Probenpräparation

A.1 Synthese der SAM-I-Riboschalter per Ligation

Zur Synthese des vollständigen SAM-I-Riboschalters führte Dr. Ayan Samanta das Verfahren der Ligation *engl. splinted-ligation-method* von einzelnen RNS-Strängen durch [154]. Um die mit Farbstoff gelabelten Proben vor dem Umgebungslicht zu schützen, wurden diese bei jedem Inkubationsschritt in Aluminiumfolie eingepackt. Ebenso wurden die Proben sowohl bei ihrer Gelaufreinigung, als auch bei der Analyse der Gele so gut wie möglich vor Umgebungslicht geschützt. Bei einer Temperatur von 37 °C wurde für 60 min eine enzymatische 5'-Phosphorylierung der RNS-Sequenzen durchgeführt, sodass eine Endkonzentration von 40 nM an synthetisierten RNS-Molekülen erreicht wurde. Für die Phosphorylierung der RNS-Fragmente wurde die T4-Polynukleotidkinase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Reaktion wurde in Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 2 mM Adenosintriphosphat (ATP) und 5 mM Dithiothreitol (DTT)) durchgeführt. Während der 5'-Phosphorylierung wurde die Probe mit 600 rpm geschüttelt. Die Probe wurde dann einer Phenolether-Extraktion und einer Ammoniumazetat-Fällung (0.5 mM bei pH 5,0) unterzogen. Die daraus gewonnenen RNS-Pellets wurden im Vakuum getrocknet und wieder in reinem Wasser gelöst.

Um die RNS-Sequenzen in der richtigen Reihenfolge miteinander zu verbinden, werden diese mit einer vollständigen komplementären DNS-Schiene verbunden. Dazu wurde eine Mischung einzelner RNS-Sequenzen (jede Sequenz betrug eine Konzentration von 10 μM) und komplementärer DNS-Sequenzen (10 μM) in Ligasepuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 50 μM ATP und 5 mM DTT) zunächst für 1 min auf 90 °C erhitzt. Mit Ausnahme der Teilsequenz, welche das 5'-Ende des Riboschalters bildet, wurden alle RNS-Fragmente phosphoryliert. Schließlich wurde die Mischung für 15 min auf Raumtemperatur (20 °C) abgekühlt. Jetzt wurde die T4-Ligase hinzugefügt und das Ganze bei 37 °C für 1 Stunde bei 600 rpm im Mischer inkubiert. Um die DNS-Schiene zu entfernen, wurde der Mischung DNase I (Fermentas) hinzugefügt, sodass die Endkonzentration der DNase I 0,5 $\frac{\mu\text{U}}{\mu\text{l}}$ betrug. Wiederum wurde die Mischung bei 37 °C für 15 min bei 600 rpm inkubiert.

Die Reaktion wurde schließlich durch das Hinzufügen eines Gel-Beladungspuffer (90 % Formamid, Tris-Borat-Puffer) gestoppt. Dazu wurde die Probe für 15 s auf 90°C erhitzt und danach sofort in Eiswasser abgekühlt. Nun wurde die Probe der Polyacrylamid-elektrophorese (PAGE) hinzugegeben. Die Stränge der Riboschalter voller Länge wurden ausgeschnitten, die RNS mit einer 0,5 M Ammoniumazetatlösung (pH 5,6) ausgewaschen und schließlich über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die RNS-Moleküle mit Ethanol abgeschieden und getrocknet. Letztendlich konnte nach dem Lösen der RNS-Pellets in reinem Wasser die Konzentration der fertigen

A Protokolle: Probenpräparation

RS-Moleküle mit dem NanoDrop ND-1000 (Peqlab, VWR) bestimmt werden. Die RS-Konstrukte wurden mit Wasser auf 50 nM verdünnt, in Aliquoten an die AG Nienhaus geliefert und bis zur Benutzung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

A.2 Fertigung der Probenhalter

Bei der Präparation von Objektträgern für die einzelnen Mikroskopieverfahren muss stets auf höchste Sorgfalt und Sauberkeit geachtet werden. Verwendet man Lösungen, Chemikalien oder technische Hilfsmittel, die nicht zweifelsfrei sauber sind, besteht die Gefahr, die Probe zu kontaminieren oder zu zerstören. Daher wurden alle Hilfsmittel und Geräte vor Verwendung zur Herstellung der Objektträger gründlich gereinigt. Weiterhin wurde, wann immer möglich, unter einer Flowbox gearbeitet, um eine weitere Partikelkontamination zu vermeiden.

Tabelle A.1: Reinigung der Deckgläser. Die Reihenfolge der Reinigungsprozedur wurde wie in der Tabelle beschrieben eingehalten. Da die Deckgläser sehr viel dünner und zerbrechlicher sind, sollten diese immer vorsichtig mit einer Pinzette gehandhabt werden.

Zeit / min	Aktion	Reagenz	Kommentar
30	Ultraschallbad	KOH	Reinigung der Quarzgläser mit 1 M KOH bei 60 °C, um Klebe- und Staubreste zu entfernen;
5	Spülen	dest. Wasser	Entfernen der restlichen KOH-Lösung;
30	Ultraschallbad	dest. Wasser	Reinigung bei 60 °C;
5	Spülen	dest. Wasser	Entfernen der restlichen KOH-Lösung;
30	Ultraschallbad	dest. Wasser	Reinigung bei 60 °C;
5	Spülen	dest. Wasser	Entfernen der restlichen KOH-Lösung;
5	Trocknen	Stickstoff	-
1	Abflammen	Propangas	Mit dem Bunsenbrenner werden die Deckgläser kurz erhitzt, um fluoreszenten Staub und sämtliche andere Überreste abzdampfen. Zu langes Abflammen lässt Gläser zerspringen!
10	Abkühlung	-	Gläser werden auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor sie wieder mit den Deckgläsern zum Probenhalter verklebt werden. Restliche Gläser werden bis zur Benutzung in destilliertem Wasser bei 8 °C gelagert.

Tabelle A.2: Reinigung der Quarz-Objektträger. Die Reihenfolge der Reinigungsprozedur wurde wie in der Tabelle beschrieben eingehalten.

Zeit / min	Aktion	Reagenz	Kommentar
1500	Einwirken	Methanol	Die gebrauchten Objektträger müssen einwirken, um das Epoxidharz zu lösen.
-	Demontieren	-	Objektträger und Deckglas werden mit Hilfe eines Skalpells getrennt. Das Epoxidharz sowie das restliche Klebeband wird entfernt.
5	Spülen	dest. Wasser	Abspülen des restlichen Methanols;
30	Ultraschallbad	KOH	Reinigung der Quarzgläser mit 1M KOH bei 60 °C, um Klebe- und Staubreste zu entfernen;
5	Spülen	dest. Wasser	Entfernen der restlichen KOH-Lösung;
30	Ultraschallbad	dest. Wasser	Reinigung bei 60 °C;
5	Spülen	dest. Wasser	Entfernen der restlichen KOH-Lösung;
30	Ultraschallbad	dest. Wasser	Reinigung bei 60 °C;
5	Spülen	dest. Wasser	Entfernen der restlichen KOH-Lösung;
5	Trocknen	Stickstoff	-
1	Abflammen	Propangas	Mit dem Bunsenbrenner werden die Quarzgläser stark erhitzt, um fluoreszenten Staub und sämtliche andere Überreste abzudampfen.
10	Abkühlung	-	Objektträger lässt man auf Raumtemperatur abkühlen, bevor sie wieder mit den Deckgläsern zum Probenhalter verklebt werden. Restliche Gläser werden bis zur Benutzung in destilliertem Wasser bei 8 °C gelagert.

Tabelle A.3: Montage der Probenhalter – „Das Glassandwich“. Beim Zusammenbauen des Objektträgers und des Deckplättchens muss stets darauf geachtet werden, diese Arbeit in einer Flowbox zu verrichten. Es empfiehlt sich, den Kleber gründlich aushärten zu lassen.

Zeit / min	Aktion / Kommentar
5	Doppelseitiges Klebeband wird mit einem Skalpell in ≈ 3 mm breite und ≈ 40 mm lange Streifen geschnitten. Dabei sollten beide Seiten nicht berührt werden um eine Verunreinigung zu vermeiden.
5	Klebestreifen werden quer zwischen die gebohrten Löcher geklebt, sodass keine Luftblasen oder Wellen entstehen.
5	Die Deckgläser werden mit einer Pinzette deckungsgleich zum Objektträger auf die Klebestreifen gelegt und vorsichtig angedrückt.
5	Das Epoxidharz wird frisch angerührt und mit einer dünnen Spitze in die Zwischenräume an den Seiten des Sandwiches aufgetragen.
30	Aushärten des Klebers.

A.3 Präparation der Objektträger zur Immobilisation der Moleküle

Tabelle A.4: Ausführliches Protokoll zur Immobilisation biotinylierter Moleküle. Die Probenpräparation wurde stets unter sauberen Bedingungen innerhalb einer Flowbox durchgeführt.

Zeit / min	Aktion	Reagenz	Kommentar
5	Verdünnen	RS-Puffer	Die RS-Stammlösung wurde in einem DNA-LoBind Probenröhrchen (Eppendorf) auf 1 nM verdünnt und mit Alufolie ummantelt.
2	Erhitzen	-	Um eine Faltung in native Strukturen zu gewährleisten, wurde die Probe auf 70 °C erhitzt.
30	Abkühlung	-	Der Heizblock wurde aus der Heizung genommen und in die Flowbox gestellt, sodass er langsam auf Labortemperatur abkühlen konnte.
5	Verdünnen	RS-Puffer	Die Probe wurde weiter auf 100 pM verdünnt, um sie anschließend in die fertig präparierte Probenkammer zu pipettieren.
-	-	-	Die nächsten Schritte wurden während der Abkühlung des Heizblocks durchgeführt.
2	Verdünnen	1×PBS	Das BSA/Biotin-BSA-Gemisch wurde frisch aus den jeweiligen Stammlösungen (10 mg ml ⁻¹ und 1 mg ml ⁻¹) hergestellt, sodass schließlich ein Gemisch aus 1 mg ml ⁻¹ und 0,1 mg ml ⁻¹ BSA/Biotin-BSA in die Probenkammern pipettiert wurde. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.
1	Pipettieren		Das BSA/Biotin-BSA 6 × 10 µl wurde mit einer Pipette (Eppendorf) in die Kanäle gespült.
10	Inkubieren	-	Damit die Probenkammern während der Inkubationszeit nicht austrocknen, wurden diese in einer selbst hergestellten Box gelagert und innen mit feuchten Tüchern bestückt. Für die Inkubationszeit wurde die Box bei 8 °C in den Kühlschrank gestellt. Um die Probe vor Licht zu schützen, wurde die Box zusätzlich mit Aluminiumfolie ummantelt.

Fortsetzung Probenpräparation

Zeit / min	Aktion	Reagenz	Kommentar
1	Spülen	1×PBS	Durch Spülen mit $2 \times 10 \mu\text{l}$ PBS wurde überflüssiges BSA aus der Probenkammer entfernt.
1	Pipettieren	Streptavidin	Das Streptavidin wurde frisch auf eine Konzentration von $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ mit PBS verdünnt. $6 \times 10 \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden dann durch die Probenkammer gespült. Die Stammlösung, welche bei -20°C gelagert wird, hat eine Konzentration von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$.
10	Inkubieren	-	Dazu wurde die Probenkammer wieder in die Schutzbox gelegt.
1	Spülen	1×PBS	Durch Spülen mit $2 \times 10 \mu\text{l}$ PBS wurde überflüssiges Streptavidin aus der Probenkammer entfernt.
1	Pipettieren	Probe	$6 \times 10 \mu\text{l}$ der 100 pM RS-Probellösung wurde in die Probenkammer pipettiert.
10	Inkubieren	-	Dazu wurde die Probenkammer wieder in die Schutzbox gelegt.
1	Spülen	Bildpuffer	Zur adäquaten Beobachtung von Einzelmolekültrajektorien wurden die Probenkammern mit den immobilisierten RS-Molekülen mit einer speziell zusammengesetzten Flüssigkeit $6 \times 10 \mu\text{l}$ gespült. Bestandteile waren: Tris-HCl ($50 \mu\text{M}$, pH 7,4), NaCl (100 mM), MgCl_2 (nach Bedarf), PCD/PCA ($400 \text{ pM}/4 \text{ mM}$), Trolox (2 mM), COT (1 mM) und NBA (1 mM).

B Quantitative Statistik der Messdaten

B.1 Datenbasis der Histogramme der Mg^{2+} -Titrationsexperimente

Um aussagekräftige Daten aus den Einzelmolekül-FRET-Messungen zu erhalten, wurde darauf geachtet, eine genügend große Anzahl an Molekülen zu vermessen. Die Vermessung frei diffundierender Moleküle mit Konzentrationen der Riboschaltermoleküle auf Einzelmolekülniveau im Picomolarbereich wurde mit Hilfe der Burst-Analyse-Methode am Konfokalmikroskop durchgeführt. Daher musste für jede Magnesiumionenkonzentration über mehrere Minuten gemessen werden bis tausende Moleküle registriert wurden. Die Anzahl der vermessenen Moleküle für die Konstrukte RS_{AA} , RS_{EA1} und RS_{EA2} sind, aufgeschlüsselt nach den entsprechenden Magnesiumionenkonzentrationen, in **Tab. B.1** zu finden.

Tabelle B.1: Datenbasis der Magnesiumionentitrationsexperimente. Anzahl der gemessenen Moleküle der Einzelmolekül-Burst-Analyse zur Bestimmung der magnesiumionenabhängigen Faltung des SAM-I-Riboschalters in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration.

RS_{AA}		RS_{EA1}		RS_{EA2}	
$[\text{Mg}^{2+}] / \text{mM}$	Anzahl Moleküle	$[\text{Mg}^{2+}] / \text{mM}$	Anzahl Moleküle	$[\text{Mg}^{2+}] / \text{mM}$	Anzahl Moleküle
0	4572	0	4613	0	19930
0,1	8905	0,4	8637	0,2	8553
0,5	7923	0,8	2958	0,4	1005
0,75	7506	1,6	3598	0,8	19588
1	8384	3,125	4370	1,6	8222
2	8548	6,25	4663	3,125	10130
3	6414	12,5	5049	6,25	3361
5	11862	25	1989	12,5	8343
7,5	17192	50	5041	25	9996
10	15121	100	2710	50	3212
25	5741			100	8350
50	11499				
100	14262				

B.2 Datenbasis der Histogramme der SAM-Titrationsexperimente in Anwesenheit von 20 mM Magnesiumionen

Die Anzahl der vermessenen Moleküle für die Konstrukte RS_{EA1} und RS_{EA2} in Abhängigkeit der entsprechenden SAM-Konzentrationen bei 20 mM Mg^{2+} sind in **Tab. B.2** zu finden.

Tabelle B.2: Datenbasis der SAM-Titrationsexperimente bei $[Mg^{2+}] = 20$ mM. Anzahl der gemessenen Moleküle der Einzelmolekül-Burst-Analyse zur Bestimmung der magnesiumionenabhängigen Faltung des SAM-I-Riboschalters in Abhängigkeit der SAM-Konzentration.

RS_{EA1} / SAM		RS_{EA2} / SAM	
$[SAM] / \mu M$	Anzahl Moleküle	$[SAM] / \mu M$	Anzahl Moleküle
0	3441	0	12575
0,01	3790	0,01	42744
0,1	2482	0,1	12059
1	2449	1	898
10	5053	10	13247

C Akustooptischer Strahlteiler

Entwickelt wurde das Konzept des akustooptischen Strahlteilers von Leica [151], um eine effizientere Detektion von Proben, die mit mehreren verschiedenen Farbstoffen markiert sind, zu erreichen. Dieser Filter wurde in den Aufbau des Konfokalmikroskops innerhalb der Diplomarbeit von S. Schäfer [204] implementiert. Jedoch wurde das Transmissionsspektrum nicht quantitativ kontrolliert.

Zur Vermessung des Transmissionsspektrums des akustooptischen Strahlteilers wurde der Messaufbau des Konfokalmikroskops (siehe **Abb. 3.1.1**) zu **Abb. C.0.1** erweitert.

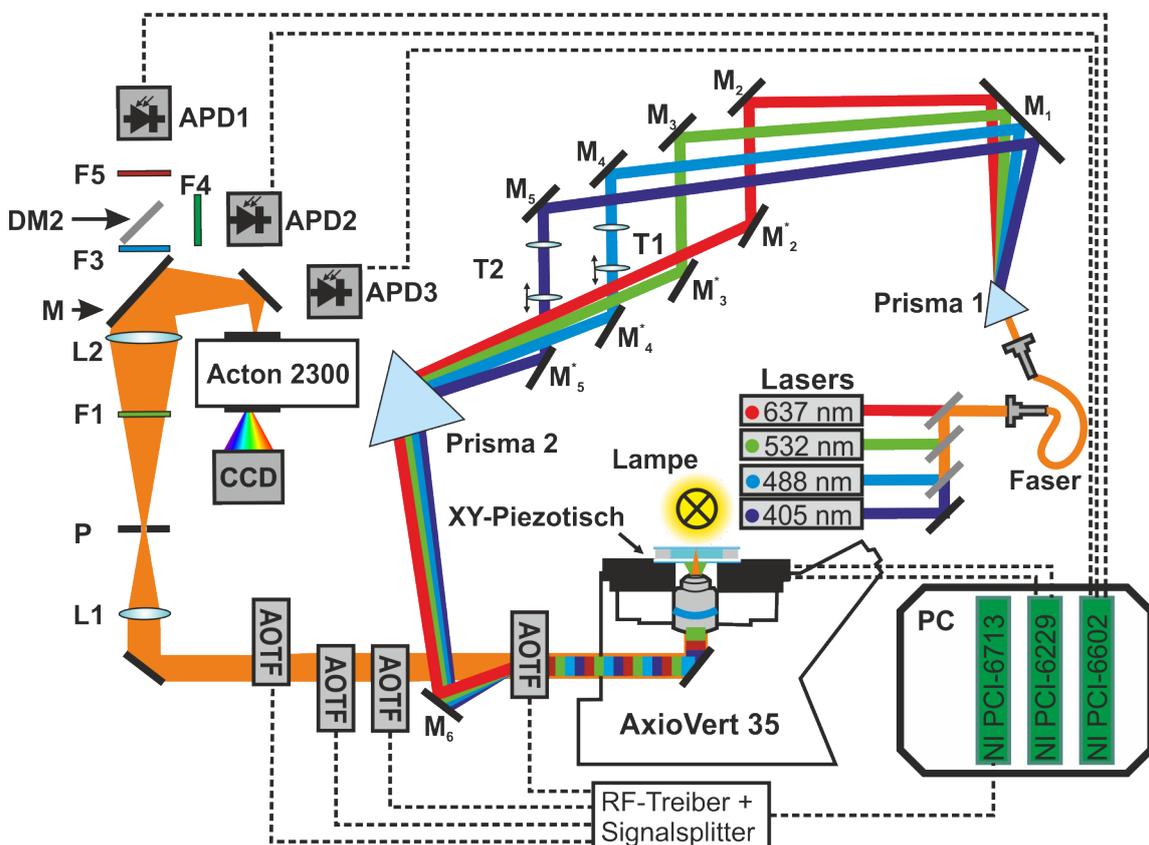


Abbildung C.0.1: Mikroskopaufbau zur Vermessung des Transmissionsspektrums. Der Strahlengang des Konfokalmikroskops aus **Kapitel 3.1.1** wurde zur Vermessung des Transmissionsspektrums des akustooptischen Strahlteilers abgeändert. Der dichroitische Spiegel DM1 wurde durch einen konventionellen Spiegel M ersetzt. Außerdem wird eine Weißlichtquelle (Lichtquellensymbol, gelb) benutzt, um ein breites Spektrum zu erzeugen. Der Gittermonochromator bildet das Spektrum auf eine CCD-Kamera ab.

Um ein breites Farbspektrum zu erzeugen, wurde eine Weißlichtlampe oberhalb des Objektivs montiert. Zur Vermessung des Transmissionsspektrums wurde im Strahlengang der dichroitische Spiegel DM1 sowie der Filter F2 durch jeweils einen breitbandigen dielektrischen Spiegel (BB2-E02, Thorlabs) ausgetauscht. Somit wurde der Strahlengang in den Spektrographen (Acton SP2300i, Princeton Instruments, Acton, MA) umgeleitet. Mit Hilfe eines Gitters mit 1200 Linien pro mm wurde das Licht gebeugt und am Kamera-Port mit einer Cascade 512F (Roper Scientific, Tucson, USA) detektiert.

Vor der Messung wurde der Strahlengang justiert, sodass das horizontal ausgerichtete, sichtbare Spektrum mittig auf den Kamerachip abgebildet wurde. Zur Vermessung des Spektrums wurde die Kamera auf den Spektrographiemodus (Addition aller vertikalen Pixel) umgeschaltet. Zur Kalibrierung des Messsystems wurde, nach der Aufnahme eines Hintergrundspektrums, die Messskala mit Hilfe der Laserlinien festgelegt (**Abb. C.0.2 a**). Da ein akustooptischer Strahlteiler ein schaltbarer dichroitischer Spiegel ist, wird im Modus einer alternierender Laseranregung immer nur der gewollte Laserstrahl in das Objektiv reflektiert. Das aus der Probe zurückkommende Licht wird dann, bis auf den Bereich der Laseranregung, mit einer Effizienz $> 95\%$ transmittiert. Dies bedeutet, dass drei verschiedene Spektren gemessen werden müssen, um den akustooptischen Strahlteiler bzgl. der Laseranregung bei 488 nm, 532 nm und bei 637 nm zu testen (siehe **Abb. C.0.2**). In **Abb. C.0.2 b** sind die Spektren bei 488 nm (blau), 532 nm (grün) und 637 nm Laseranregung (rot) gezeigt. Dabei fällt auf, dass die Spektren im Bereich der Laseranregungen (farblich hinterlegte Felder) Artefakte aufweisen und die Minima zu höheren Wellenlängen verschoben sind. Zudem sind die Spektren unerwartet breit. Daher wurde zunächst die Ansteuerungselektronik, **Abb. C.0.3**, vermessen. Zentraler Bestandteil ist dabei ein Verstärker, der eine angelegte Spannung in vier Ausgangskanäle aufspaltet, um alle AOTF-Radiofrequenztreiber (RF-Treiber) mit der gleichen Spannung zu versorgen. Diese Spannung legt die RF im AOTF fest. Dabei wurde festgestellt, dass die Spannungsvariation auf Grund der verwendeten Transistoren zur Verstärkung der Signale im Millivoltbereich liegt. Die Schaltung der Frequenzen ist jedoch in diesem Bereich empfindlich, sodass die AOTF-Module mit unterschiedlichen Frequenzen betrieben wurden. Dies führte zur Verbreiterung des Transmissionsspektrums. Die Artefakte wurden dadurch erzeugt, dass eines der AOTF-Module genau in diesem Bereich betrieben wurde.

Daher wurden alle Transistoren durch eine Modellreihe niedriger Serientoleranz ersetzt, sodass eine Variation der Ausgangsspannungen des Signalsplitters von $< \pm 0.2$ mV betrug.

Zusätzlich wurden Potentiometer eingebaut, um die Serientoleranzen innerhalb der Module (RF-Treiber, sowie AOTF-Module / AOTF Kristalle) zu kompensieren und damit die Transmissionsspektren noch weiter zu optimieren. Schließlich wurde die Spannung individuell angepasst, sodass die Maxima der Laserlinien immer im Minimum der Transmissionsspektren lagen (siehe **Abb. C.0.2 c**). Der modifizierte Aufbau des Signalsplitters mit den angepassten Spannungs- bzw. Frequenzwerten ist in **Abb. C.0.4** gezeigt. Durch die Anpassung konnte schließlich eine stärkere Unterdrückung der Hintergrundstrahlung im Bereich der Anregungswellenlänge erreicht werden. Zudem konnten eine Verschmälerung der blockierten Frequenzen erreicht werden, was zu einem besseren SNR führte. Somit wurde der akustooptische Strahlteiler vor allem für die Nutzung von Mehrfarben-FRET verbessert.

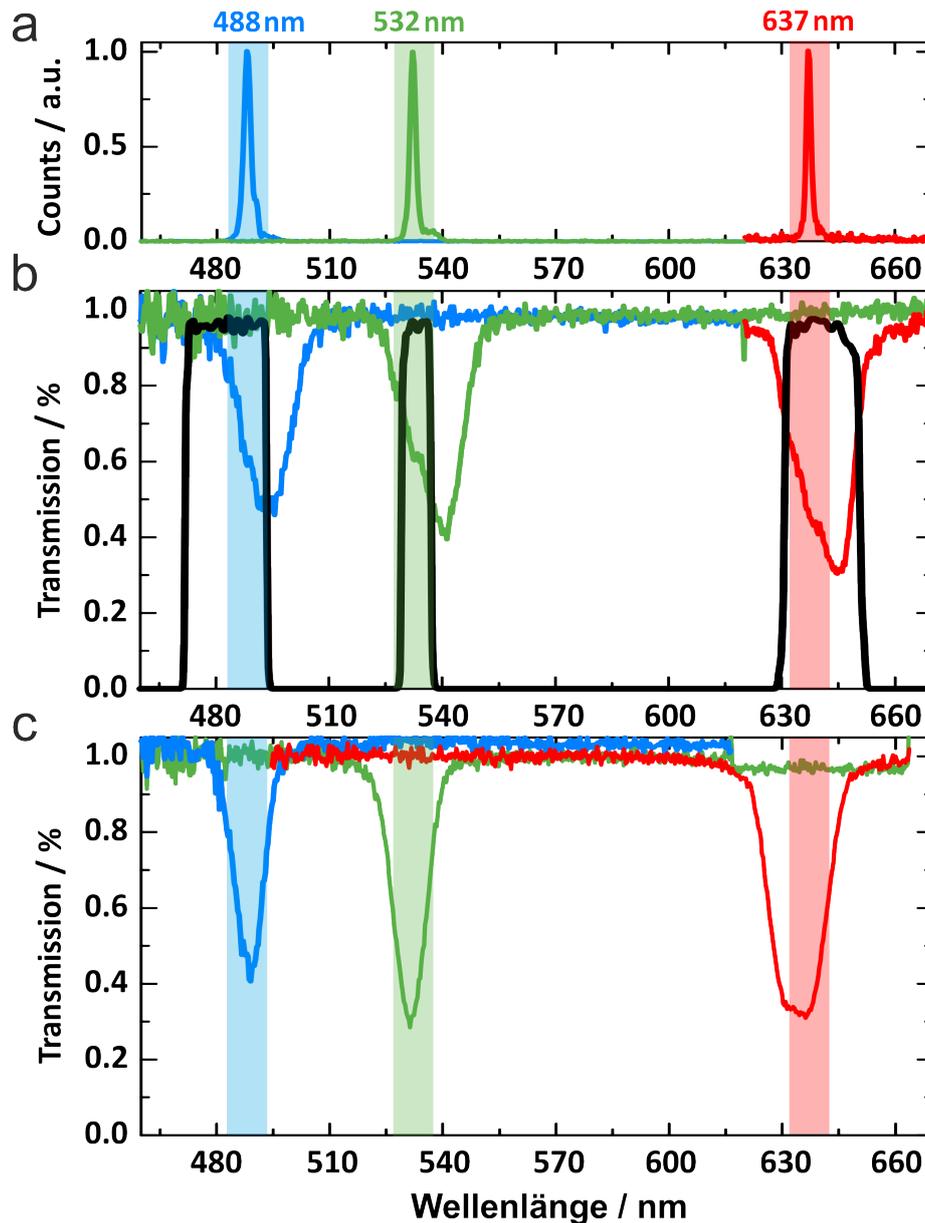


Abbildung C.0.2: Vermessung des Transmissionsspektrums des Strahlteilers. (a) Zur Kalibrierung des Monochromators wurden die Laserlinien eines 488 nm (blau), eines 532 nm (grün) und eines 637 nm Lasers (rot) verwendet. Die Spektralbereiche der Laserintensitätsmaxima wurden mit jeweils blauen, grünen und roten Feldern hervorgehoben. (b) Gezeigt ist die Vermessung des Transmissionsspektrums bei Anregung mit dem 488 nm (blau), dem 532 nm (grün) und dem 637 nm Laser (rot). Als Vergleich ist das Transmissionsspektrum eines geläufigen Quadband dichroitischen Spiegels (schwarze Linien, QuadLine Strahlteiler zt375/488/532/635rpc, Chroma, Bellows Falls, USA) eingezeichnet. Es sei hier nochmals erwähnt, dass das Spektrum des dichroitischen Spiegels statisch ist, während das Transmissionsspektrum des akustooptischen Strahlteilers dynamisch ist. (c) Gezeigt ist das Transmissionsspektrum nach Einbau des verbesserten Signalsplitters.

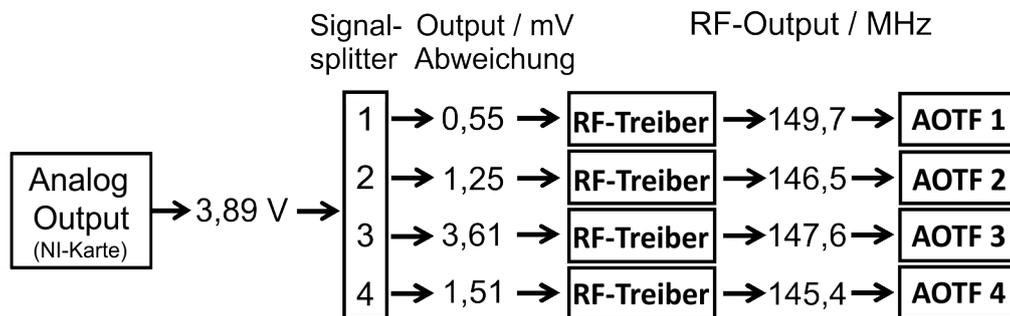


Abbildung C.0.3: Alte analoge Ansteuerung der AOTF-Module. Durch die NI-Karte (PCI-6713) wird eine analoge Spannung ausgegeben, mit Hilfe eines selbstgebauten Signalsplitters vervierfacht und an die Radiofrequenztreiber (RF-Treiber) weitergegeben. Die angelegte Spannung bestimmt die Radiofrequenz, welche im AOTF das Beugungsgitter erzeugt.

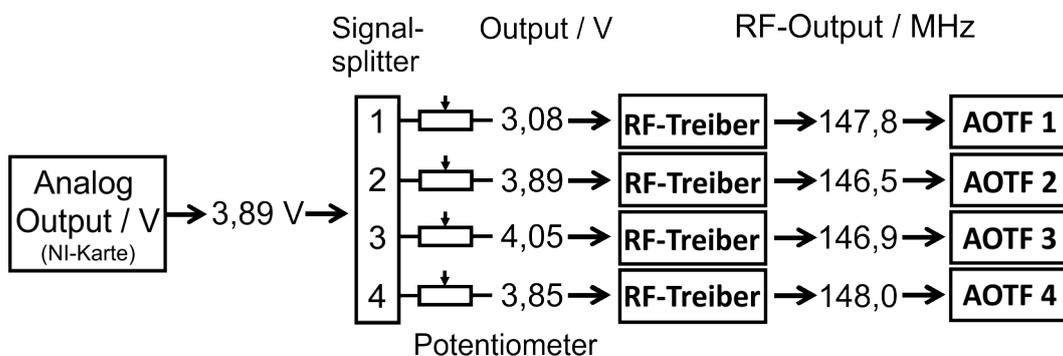


Abbildung C.0.4: Verbesserte analoge Ansteuerung der AOTF-Module. Durch den Austausch der Transistoren durch eine Modellreihe mit niedriger Serientoleranz ($< \pm 0.2$ mV Ausgangsspannung) und den zusätzlichen Einbau von Potentiometern, um die Ausgangsspannung für jeden RF-Treiber einzeln zu korrigieren, konnte das Transmissionspektrum angepasst und verbessert werden.

Abbildungsverzeichnis

2.1.1	Die Zucker und das Rückgrat der DNS und RNS.	6
2.1.2	Unterschied zwischen DNS und RNS.	7
2.1.3	Transkription des SAM-I-Riboschalters.	8
2.2.1	Funktionale Gruppen eines Riboschaltermoleküls.	10
2.2.2	Chemische Strukturen von SAM und SAH.	12
2.2.3	Sekundär- und Tertiärstruktur der SAM-I-Aptamerdomäne.	13
2.2.4	Sekundär- und Tertiärstruktur des SAM-I-Riboschalters.	15
2.2.5	Ioneninduzierte hierarchische Faltung von RNS-Molekülen.	18
2.2.6	Modell einer Polymerkette.	21
2.2.7	Schematische Darstellung eines DNS-Doppelstrangs und seiner Größen.	24
2.3.1	Absorption und Fluoreszenz nach dem Franck-Condon-Prinzip.	26
2.3.2	Lösungsmittelleffekt auf Fluorophore.	29
2.3.3	Jablonski-Diagramm.	30
2.3.4	Reduktions- und Oxidationsmechanismen zur Rückführung in den Grundzustand.	32
2.4.1	Resonanzenergietransfer.	34
2.4.2	Orientierungsfaktor κ	35
2.4.3	Überlappintegral J.	36
2.4.4	FRET-Effizienz.	37
2.5.1	Prinzip des Konfokalmikroskops.	39
2.5.2	Prinzip des TIRF-Mikroskops.	41
2.6.1	Schematische Darstellung eines Vier-Zustands-HMM.	44
3.1.1	Schematische Darstellung des Konfokalmikroskops.	48
3.1.2	Programmierbarer akustooptischer Strahlteiler.	49
3.1.3	Schematische Darstellung des Prisma-TIRF-Mikroskops.	51
3.3.1	FRET-Konstrukte des SAM-I-Riboschalters.	54
3.3.2	Probenkammern für Einzelmolekülexperimente.	56
3.3.3	Funktionalisierte Glasoberfläche der Probenkammern.	57
3.4.1	Selektion verwertbarer Pulse.	61
3.4.2	Selektion FRET-Paar-markierter Moleküle.	63
3.4.3	Trajektorien eines immobilisierten RS-Moleküls.	67
3.5.1	Reproduzierbarkeit der Hidden-Markov-Modelle.	74
3.5.2	Überprüfung der Reproduzierbarkeit bezüglich Zustandshäufigkeit und Zustandslebensdauer.	75
4.1.1	Verwendete FRET-Konstrukte des SAM-I-Riboschalters.	78
4.1.2	Kontrollmessung von möglichen Oberflächeneffekten.	80

4.1.3	Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters.	82
4.1.4	Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters.	84
4.1.5	Magnesiumionenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters.	86
4.2.1	Ligandenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters.	87
4.2.2	Ligandenabhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters.	88
4.3.1	Validierung des Hidden-Markov-Modells.	91
4.3.2	HMM-Analyse der Faltungsdynamik des SAM-I-Riboschalters des Konstrukts RS_{EA1} ohne Ligand.	92
4.3.3	HMM-Analyse der Faltungsdynamik des Konstrukts RS_{EA1} in Anwesenheit des Liganden SAM.	93
4.4.1	Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{EA1} -Konstrukts.	99
4.4.2	Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{AA} -Konstrukts.	101
4.4.3	Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{EA1} Konstrukts mit SAM.	103
4.4.4	Strukturelle Modelle der T- und AT-Konformation des RS_{AA} -Konstrukts.	105
4.4.5	Strukturelle Modelle der T-Konformation des RS_{EA1} -Konstrukts.	106
4.4.6	Strukturelle Modelle der AT-Konformation des RS_{EA1} -Konstrukts.	107
4.4.7	Strukturelle Modelle der T-Konformation des RS_{EA2} -Konstrukts.	108
4.4.8	Strukturelle Modelle der AT- Konformation des RS_{EA2} -Konstrukts.	109
4.4.9	Energielandschaft des SAM-I-Riboschaltermoleküls.	110
4.4.10	Die Faltungszustände des SAM-I-Riboschalters.	111
4.4.11	Globaler Fit der Einzelmolekül-FRET-Daten des RS_{EA2} -Konstrukts.	114
4.5.1	Globaler Fit der drei FRET-Konstrukte in Abhängigkeit ihrer Mg^{2+} -Konzentration.	118
4.5.2	Ergebnisse des globalen Fünf-Zustandsmodells.	121
4.6.1	Triangulierung möglicher Positionen der Terminatorstruktur.	123
4.6.2	3D-Triangulierung möglicher Positionen der Terminatorstruktur.	124
4.7.1	SAH-abhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters des RS_{EA1} -Konstrukts.	127
4.7.2	SAH-abhängige Faltung des SAM-I-Riboschalters des RS_{EA2} -Konstrukts.	129
4.8.1	Validierung des Hidden-Markov-Modells der smFRET-SAH-Daten.	131
4.8.2	HMM-Analyse der Faltungsdynamik des SAM-I-Riboschalters mit SAH.	132
4.8.3	Faltungspfad des SAM-I-Riboschalters unter Einfluss von SAH.	134
4.8.4	Strukturelle Modelle der AT-Konformation des RS_{EA1} -Konstrukts in Anwesenheit von SAH.	136
C.0.1	Mikroskopaufbau zur Vermessung des Transmissionsspektrums.	155
C.0.2	Vermessung des Transmissionsspektrums des Strahlteilers.	157
C.0.3	Alte analoge Ansteuerung der AOTF-Module.	158
C.0.4	Verbesserte analoge Ansteuerung der AOTF-Module.	158

Tabellenverzeichnis

2.1	Charakteristische Werte der A-DNS	23
3.1	Synthetisierte FRET-Konstrukte des SAM-I-Riboschalters	55
4.1	Datenbasis der HMM-Analyse der Datensätze in Ab- und Anwesenheit von SAM.	95
4.2	Startparameter des globalen Fits mit vier Gauß-Funktionen für das Konstrukt RS_{EA1}	98
4.3	Ergebnisparameter der globalen Fit-Prozedur den vier Gauß-Funktionen der gefunden Zustände für das Konstrukt RS_{EA1}	100
4.4	Parameter der globalen Fit-Prozedur der drei Gauß-Funktionen, gefunden für das Konstrukt RS_{AA}	102
4.5	Fitparameter mit vier Gauß-Funktionen für das Konstrukt RS_{EA1} in Anwesenheit des Liganden SAM ($[SAM] = 10 \mu M$) und 20 mM Mg^{2+}	103
4.6	Parameter der fünf Gauß-Funktionen zum Fitten der Histogramme des Konstruktes RS_{EA2}	115
4.7	Parameter der globalen Fit-Prozedur mit fünf Gauß-Funktionen, unterteilt nach den drei Konstrukten und ihren fünf Zuständen.	119
4.8	Datenbasis der HMM-Analyse des Konstrukts RS_{EA1} in Anwesenheit von SAH.	134
A.1	Reinigung der Deckgläser.	147
A.2	Reinigung der Quarz-Objektträger.	148
A.3	Montage der Probenhalter – „Das Glassandwich“.	149
A.4	Ausführliches Protokoll zur Immobilisation biotinylierter Moleküle.	150
B.1	Datenbasis der Magnesiumionentitrationsexperimente	153
B.2	Datenbasis der SAM-Titrationsexperimente bei $[Mg^{2+}] = 20 \text{ mM}$	154

Literaturverzeichnis

- [1] Furtig, B., Nozinovic, S., Reining, A., and Schwalbe, H. Multiple conformational states of riboswitches fine-tune gene regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **30**, 112–124 (2015).
- [2] Reining, A., Nozinovic, S., Schlepckow, K., Buhr, F., Furtig, B., and Schwalbe, H. Three-state mechanism couples ligand and temperature sensing in riboswitches. *Nature* **499**, 355–359 (2013).
- [3] Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., and Cech, T. R. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147–157 (1982).
- [4] Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849–857 (1983).
- [5] Doudna, J. A. and Cech, T. R. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**, 222–228 (2002).
- [6] Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., and Sullenger, B. A. Aptamers as therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **57**, 61–79 (2017).
- [7] Winkler, W. C. and Breaker, R. R. Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBioChem* **4**, 1024–1032 (2003).
- [8] Breaker, R. R. Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol. Cell* **43**, 867–879 (2011).
- [9] Tucker, B. J. and Breaker, R. R. Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 342–348 (2005).
- [10] Wang, J. X. and Breaker, R. R. Riboswitches that sense S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Biochem. Cell Biol.* **86**, 157–168 (2008).
- [11] Trausch, J. J., Xu, Z., Edwards, A. L., Reyes, F. E., Ross, P. E., Knight, R., and Batey, R. T. Structural basis for diversity in the SAM clan of riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 6624–6629 (2014).
- [12] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. *Biochemistry*. W.H. Freeman, New York, Basingstoke, (2012).
- [13] Vogel, U. and Jensen, K. F. The RNA chain elongation rate in Escherichia coli depends on the growth rate. *J. Bacteriol.* **176**, 2807–2813 (1994).

- [14] Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., and Dickerson, R. E. Structure of a B-DNA dodecamer: Conformation and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2179–2183 (1981).
- [15] Vorobiev, S., Ma, L., and Montelione, G. Crystal structure of the 16-mer double stranded RNA. (2016).
- [16] Montange, R. K. and Batey, R. T. Riboswitches: Emerging themes in RNA structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 117–133 (2008).
- [17] Winkler, W. C. Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 594–602 (2005).
- [18] Winkler, W. C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J. E., and Breaker, R. R. An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 701–707 (2003).
- [19] Winkler, W. C. and Breaker, R. R. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 487–517 (2005).
- [20] Nudler, E. and Mironov, A. S. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 11–17 (2004).
- [21] Rinaldi, A. J., Lund, P. E., Blanco, M. R., and Walter, N. G. The Shine-Dalgarno sequence of riboswitch-regulated single mRNAs shows ligand-dependent accessibility bursts. *Nat. Commun.* **7**, 8976 (2016).
- [22] Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., and Breaker, R. R. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* **9**, 1043–1049 (2002).
- [23] Borokov, I., Gorovitz, B., Schrieber, R., Aharonovitz, Y., and Cohen, G. Coenzyme B12 controls transcription of the streptomyces class Ia ribonucleotide reductase nrdABS operon via a riboswitch mechanism. *J. Bacteriol.* **188**, 2512–2520 (2006).
- [24] Mandal, M., Lee, M., Barrick, J. E., Weinberg, Z., Emilsson, G. M., Ruzzo, W. L., and Breaker, R. R. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* **306**, 275–279 (2004).
- [25] Grundy, F. J., Lehman, S. C., and Henkin, T. M. The L box regulon: Lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 12057–12062 (2003).
- [26] Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: Yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res.* **31**, 6748–6757 (2003).
- [27] Sudarsan, N., Wickiser, J. K., Nakamura, S., Ebert, M. S., and Breaker, R. R. An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.* **17**, 2688–2697 (2003).
- [28] Johansen, L. E., Nygaard, P., Lassen, C., Agersø, Y., and Saxild, H. H. Definition of a second *Bacillus subtilis* pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). *J. Bacteriol.* **185**, 5200–5209 (2003).

- [29] Mandal, M., Boese, B., Barrick, J., and Winkler, W.C. Breaker, R. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **133**, 577–586 (2003).
- [30] Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A., and Nudler, E. Sensing small molecules by nascent RNA: A mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**, 747–756 (2002).
- [31] Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes: New genes and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **277**, 48949–48959 (2002).
- [32] Roth, A., Winkler, W. C., Regulski, E. E., Lee, B. W. K., Lim, J., Jona, I., Barrick, J. E., Ritwik, A., Kim, J. N., Welz, R., Iwata-Reuyl, D., and Breaker, R. R. A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 308–317 (2007).
- [33] Gilbert, S. D., Rambo, R. P., Van Tyne, D., and Batey, R. T. Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 177–182 (2008).
- [34] Corbino, K. A., Barrick, J. E., Lim, J., Welz, R., Tucker, B. J., Puskarz, I., Mandal, M., Rudnick, N. D., and Breaker, R. R. Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol.* **6**, R70 (2005).
- [35] Epshtein, V., Mironov, A. S., and Nudler, E. The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5052–5056 (2003).
- [36] Fuchs, R. T., Grundy, F. J., and Henkin, T. M. The SMK box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 226–233 (2006).
- [37] McDaniel, B. A., Grundy, F. J., Artsimovitch, I., and Henkin, T. M. Transcription termination control of the S box system: Direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3083–3088 (2003).
- [38] Batey, R. T. Recognition of S-adenosylmethionine by riboswitches. *WIREs RNA* **2**, 299–311 (2011).
- [39] Weinberg, Z., Regulski, E. E., Hammond, M. C., Barrick, J. E., Yao, Z., Ruzzo, W. L., and Breaker, R. R. The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA* **14**, 822–828 (2008).
- [40] Liberman, J. A. and Wedekind, J. E. Riboswitch structure in the ligand-free state. *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA* **3**, 369–384 (2012).
- [41] Grundy, F. J. and Henkin, T. M. From ribosome to riboswitch: Control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 329–338 (2006).

- [42] Garst, A. D., Edwards, A. L., and Batey, R. T. Riboswitches: Structures and mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003533 (2011).
- [43] Gilbert, S. D., Stoddard, C. D., Wise, S. J., and Batey, R. T. Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J. Mol. Biol.* **359**, 754–768 (2006).
- [44] Lemay, J.-F. and Lafontaine, D. A. Core requirements of the adenine riboswitch aptamer for ligand binding. *RNA* **13**, 339–350 (2007).
- [45] Noeske, J., Schwalbe, H., and Wöhnert, J. Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5262–5273 (2007).
- [46] Yamauchi, T., Miyoshi, D., Kubodera, T., Nishimura, A., Nakai, S., and Sugimoto, N. Roles of Mg^{2+} in TPP-dependent riboswitch. *FEBS Lett.* **579**, 2583–2588 (2005).
- [47] Montange, R. K. and Batey, R. T. Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* **441**, 1172–1175 (2006).
- [48] Huang, W., Kim, J., Jha, S., and Aboul-ela, F. A mechanism for S-adenosyl methionine assisted formation of a riboswitch conformation: A small molecule with a strong arm. *Nucleic Acids Res.* **37**, 6528–6539 (2009).
- [49] Barrick, J. E., Corbino, K. A., Winkler, W. C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., Wickiser, J. K., and Breaker, R. R. New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6421–6426 (2004).
- [50] Cantoni, G. L. Biological methylation: Selected aspects. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 435–451 (1975).
- [51] Fontecave, M., Atta, M., and Mulliez, E. S-adenosylmethionine: Nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 243–249 (2004).
- [52] Markham, G. D., Hafner, E., Tabor, C. W., and Tabor, H. S-Adenosylmethionine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 9082–9092 (1980).
- [53] Christen, P., Jaussi, R., and Benoit, R. *Biochemie und Molekularbiologie*. Springer-Verlag, Berlin, (2016).
- [54] Ludwig, M. L. and Matthews, R. G. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 269–313 (1997).
- [55] Lim, J., Winkler, W. C., Nakamura, S., Scott, V., and Breaker, R. R. Molecular-recognition characteristics of SAM-binding riboswitches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 964–968 (2006).
- [56] Lu, C., Ding, F., Chowdhury, A., Pradhan, V., Tomsic, J., Holmes, W. M., Henkin, T. M., and Ke, A. SAM recognition and conformational switching mechanism in the *Bacillus subtilis* yitJ S box/SAM-I riboswitch. *J. Mol. Biol.* **404**, 803–818 (2010).

- [57] Stoddard, C. D., Montange, R. K., Hennelly, S. P., Rambo, R. P., Sanbonmatsu, K. Y., and Batey, R. T. Free state conformational sampling of the SAM-I riboswitch aptamer domain. *Structure* **18**, 787–797 (2010).
- [58] Montange, R. K., Mondragon, E., van Tyne, D., Garst, A. D., Ceres, P., and Batey, R. T. Discrimination between closely related cellular metabolites by the SAM-I riboswitch. *J. Mol. Biol.* **396**, 761–772 (2010).
- [59] Heppell, B. and Lafontaine, D. A. Folding of the SAM aptamer is determined by the formation of a K-turn-dependent pseudoknot. *Biochemistry* **47**, 1490–1499 (2008).
- [60] Heppell, B., Blouin, S., Dussault, A. M., Mulhbach, J., Ennifar, E., Penedo, J. C., and Lafontaine, D. A. Molecular insights into the ligand-controlled organization of the SAM-I riboswitch. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 384–392 (2011).
- [61] Klein, D. J., Schmeing, T. M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. The kink-turn: A new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* **20**, 4214–4221 (2001).
- [62] Winkler, W. C., Grundy, F. J., Murphy, B. A., and Henkin, T. M. The GA motif: An RNA element common to bacterial antitermination systems, rRNA, and eukaryotic RNAs. *RNA* **7**, 1165–1172 (2001).
- [63] McDaniel, B. A., Grundy, F. J., and Henkin, T. M. A tertiary structural element in S box leader RNAs is required for S-adenosylmethionine-directed transcription termination. *Mol. Microbiol.* **57**, 1008–1021 (2005).
- [64] McDaniel, B. A., Grundy, F. J., Kurlekar, V. P., Tomsic, J., and Henkin, T. M. Identification of a mutation in the *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase gene that results in derepression of S-box gene expression. *J. Bacteriol.* **188**, 3674–3681 (2006).
- [65] Rambo, R. P. and Tainer, J. A. Improving small-angle X-ray scattering data for structural analyses of the RNA world. *RNA* **16**, 638–646 (2010).
- [66] Aboul-ela, F., Huang, W., Elrahman, M., Boyapati, V., and Li, P. Linking aptamer-ligand binding and expression platform folding in riboswitches: Prospects for mechanistic modeling and design. *WIREs RNA* **6**, 631–650 (2015).
- [67] Hennelly, S. P., Novikova, I. V., and Sanbonmatsu, K. Y. The expression platform and the aptamer: Cooperativity between Mg^{2+} and ligand in the SAM-I riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1922–1935 (2013).
- [68] Boyapati, V. K., Huang, W., Spedale, J., and Aboul-Ela, F. Basis for ligand discrimination between ON and OFF state riboswitch conformations: The case of the SAM-I riboswitch. *RNA* **18**, 1230–1243 (2012).
- [69] Mustoe, A., Brooks, C., and Al-Hashimi, H. Hierarchy of RNA functional dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 441–466 (2014).
- [70] Brion, P. and Westhof, E. Hierarchy and dynamics of RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 113–137 (1997).

- [71] Sackmann, E. and Merkel, R. *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-VCH, Weinheim, (2010).
- [72] Russell, R. *Biophysics of RNA folding*. Springer-Verlag New York, (2012).
- [73] Tinoco, I. and Bustamante, C. How RNA folds. *J. Mol. Biol.* **293**, 271–281, October (1999).
- [74] Thirumalai, D. and Hyeon, C. Theory of RNA Folding: From Hairpins to Ribozymes. In *Non-Protein Coding RNAs*. Springer-Verlag, New York (2009).
- [75] Thirumalai, D. and Hyeon, C. RNA and protein folding: Common themes and variations. *Biochemistry* **44**, 4957–4970 (2005).
- [76] Draper, D. E., Grilley, D., and Soto, A. M. Ions and RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 221–243 (2005).
- [77] Woodson, S. A. Metal ions and RNA folding: A highly charged topic with a dynamic future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 104–109 (2005).
- [78] Cruz, J. A. and Westhof, E. The dynamic landscapes of RNA architecture. *Cell* **136**, 604–609 (2009).
- [79] Froschauer, E. M., Kolisek, M., Dieterich, F., Schweigel, M., and Schweyen, R. J. Fluorescence measurements of free $[Mg^{2+}]$ by use of mag-fura 2 in *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**, 49–55 (2004).
- [80] Helm, M., Kobitski, A. Y., and Nienhaus, G. U. Single-molecule Förster resonance energy transfer studies of RNA structure, dynamics and function. *Biophys. Rev.* **1**, 161–176 (2009).
- [81] Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z., and Wolynes, P. G. Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 545–600 (1997).
- [82] Wolynes, P. G. Recent successes of the energy landscape theory of protein folding and function. *Q. Rev. Biophys.* **38**, 405–410 (2005).
- [83] Dill, K. A., Chan, H. S., et al. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10–19 (1997).
- [84] Schwabl, F. *Statistische Mechanik*. Springer-Verlag, Berlin, (2004).
- [85] Nienhaus, G. U. Exploring protein structure and dynamics under denaturing conditions by single-molecule FRET analysis. *Macromol. Biosci.* **6**, 907–922 (2006).
- [86] Nienhaus, G. U. Physik der Proteine. *Phys. J.* **3**, 37–43 (2004).
- [87] Frauenfelder, H. *The physics of proteins*. Springer-Verlag, New York, (2010).
- [88] Koltzenburg, S., Maskos, M., Nuyken, O., and Mülhaupt, R. *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin, (2014).
- [89] Mark, J. E. *Physical properties of polymers handbook*. Springer-Verlag, New York, (2007).

- [90] Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., and Tinoco, I. *Nucleic acids: Structures, properties, and functions*. Sterling Publishing Company, New York, (2000).
- [91] Haken, H. and Wolf, H. C. *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. Springer-Verlag, Berlin, (2006).
- [92] Münster, G. *Quantentheorie*. de Gruyter, New York, (2006).
- [93] Sakurai, J. J., Tuan, S.-F., and Commins, E. D. *Modern quantum mechanics, revised edition*. Addison-Wesley Publishing Company, Boston, (1995).
- [94] Parson, W. W. *Modern Optical Spectroscopy*. Springer-Verlag, New York, (2009).
- [95] Demtröder, W. *Experimentalphysik 3*. Springer-Verlag, Berlin, (2005).
- [96] Cohen-Tannoudji, C., Diu, B., and Laloë. *Quantenmechanik, Band 1*. de Gruyter, New York, (2009).
- [97] Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer-Verlag, New York, (2010).
- [98] Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., and Tinnefeld, P. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 5465–5469 (2008).
- [99] Dave, R., Terry, D. S., Munro, J. B., and Blanchard, S. C. Mitigating unwanted photophysical processes for improved single-molecule fluorescence imaging. *Biophys. J.* **96**, 2371–2381 (2009).
- [100] Davidson, R. S. Mechanisms of photo-oxidation reactions. *Pest. Manage. Sci.* **10**, 158–170 (1979).
- [101] Wilkinson, F., McGarvey, D., Olea, A., et al. Excited triplet-state interactions with molecular oxygen: Influence of charge-transfer on the bimolecular quenching rate constants and the yields of singlet oxygen (O_2^* , $(^1\Delta_g)$) for substituted naphthalenes in various solvents. *J. Phys. Chem.* **98**, 3762–3769 (1994).
- [102] Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., and Seidel, C. A. M. *Photostability of fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy*. Springer-Verlag, Berlin, (1999).
- [103] Widengren, J., Chmyrov, A., Eggeling, C., Löfdahl, P.-A., and Seidel, C. A. M. Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **111**, 429–440 (2007).
- [104] Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D. D., and Yanagida, T. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. *J. Mol. Biol.* **216**, 49 (1990).
- [105] Aitken, C. E., Marshall, R. A., and Puglisi, J. D. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys. J.* **94**, 1826–1835 (2008).

- [106] Patil, V. P. and Ballou, D. P. The use of protocatechuate dioxygenase for maintaining anaerobic conditions in biochemical experiments. *Anal. Biochem.* **286**, 187–192 (2000).
- [107] Swoboda, M., Henig, J., Cheng, H.-M., Brugger, D., Haltrich, D., Plumeré, N., and Schlierf, M. Enzymatic oxygen scavenging for photostability without pH drop in single-molecule experiments. *ACS Nano* **6**, 6364–6369 (2012).
- [108] Butler, I. B., Schoonen, M. A., and Rickard, D. T. Removal of dissolved oxygen from water: A comparison of four common techniques. *Talanta* **41**, 211–215 (1994).
- [109] Di Fiori, N. and Meller, A. Automated system for single molecule fluorescence measurements of surface-immobilized biomolecules. *J. Visualized Exp.* **33**, 1542 (2009).
- [110] Vogelsang, J., Cordes, T., Forthmann, C., Steinhauer, C., and Tinnefeld, P. Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 8107–8112, May (2009).
- [111] Cordes, T., Vogelsang, J., and Tinnefeld, P. On the mechanism of Trolox as antiblinking and antibleaching reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5018–5019 (2009).
- [112] Rasnik, I., McKinney, S. A., and Ha, T. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3**, 891–893 (2006).
- [113] Le Gall, A., Dulin, D., Clavier, G., Méallet-Renault, R., Bouyer, P., Perronet, K., and Westbrook, N. Improved photon yield from a green dye with a reducing and oxidizing system. *Chemphyschem* **12**, 1657–1660 (2011).
- [114] Förster, T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Sci. Nat.* **33**, 166–175 (1946).
- [115] Sisamakos, E., Valeri, A., Kalinin, S., Rothwell, P. J., and Seidel, C. A. M. Accurate single-molecule FRET studies using multiparameter fluorescence detection. *Methods Enzymol.* **475**, 455–514 (2010).
- [116] Clegg, R., Wang, X., and Herman, B. *Fluorescence imaging spectroscopy and microscopy*. Wiley, New York, (1996).
- [117] Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
- [118] Masters, B. R. Paths to Förster's resonance energy transfer (FRET) theory. *Eur. Phys. J. H* **39**, 87–139 (2014).
- [119] dos Remedios, C. G. and Moens, P. D. Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *J. Struct. Biol.* **115**, 175–185 (1995).
- [120] Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819–846 (1978).

- [121] Gadella, T. W. J. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Amsterdam, (2009).
- [122] Peckys, D. B., Alansary, D., Niemeyer, B. A., and de Jonge, N. Visualizing Quantum Dot Labeled ORA11 Proteins in Intact Cells Via Correlative Light and Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.* **22**, 902–912 (2016).
- [123] Keskin, S., Besztejan, S., Kassier, G., Manz, S., Bucker, R., Riekeberg, S., Trieu, H. K., Rentmeister, A., and Miller, R. J. D. Visualization of multimerization and self-assembly of DNA-functionalized gold nanoparticles using in-liquid transmission electron microscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 4487–4492 (2015).
- [124] Evans, J. E. and Browning, N. D. Enabling direct nanoscale observations of biological reactions with dynamic TEM. *Microscopy (Oxf.)* **62**, 147–156 (2013).
- [125] Mirsaidov, U. M., Zheng, H., Casana, Y., and Matsudaira, P. Imaging protein structure in water at 2.7 nm resolution by transmission electron microscopy. *Biophys. J.* **102**, L15–L17 (2012).
- [126] de Jonge, N., Poirier-Demers, N., Demers, H., Peckys, D. B., and Drouin, D. Nanometer-resolution electron microscopy through micrometers-thick water layers. *Ultramicroscopy* **110**, 1114–1119 (2010).
- [127] Pawley, J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer-Verlag, New York, (2006).
- [128] Mondal, P. P. and Diaspro, A. *Fundamentals of fluorescence microscopy: Exploring life with light*. Springer-Verlag, New York, (2013).
- [129] Demtröder, W. Experimentalphysik 2. *Elektrizität und Optik, Kapitel 11* (1995).
- [130] Kubitscheck, U. *Fluorescence microscopy: From principles to biological applications*. John Wiley & Sons, New Jersey, (2013).
- [131] Furtak, T. and Klein, M. *Optik*. Springer-Verlag, Berlin, (1988).
- [132] Born, M. *Optik: Ein Lehrbuch der elektromagnetischen Lichttheorie*. Springer-Verlag, Berlin, (2013).
- [133] Axelrod, D. *Fluorescence microscopy of living cells in culture*. Academic Press, New York, (1989).
- [134] Roy, R., Hohng, S., and Ha, T. A practical guide to single-molecule FRET. *Nat. Methods* **5**, 507–516 (2008).
- [135] Chodera, J. D. and Noé, F. Markov state models of biomolecular conformational dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **25**, 135–144 (2014).
- [136] McKinney, S. A., Joo, C., and Ha, T. Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. *Biophys. J.* **91**, 1941–1951 (2006).
- [137] Noé, F., Schütte, C., Vanden-Eijnden, E., Reich, L., and Weikl, T. R. Constructing the equilibrium ensemble of folding pathways from short off-equilibrium simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19011–19016 (2009).

- [138] Rabiner, L. R. A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition. *Proc. IEEE* **77**, 257–286 (1989).
- [139] Zarrabi, N. *Hidden Markov Modelle für Einzelmoleküldaten*. PhD thesis, (2010).
- [140] Keller, B. G., Kobitski, A., Jäschke, A., Nienhaus, G. U., and Noé, F. Complex RNA folding kinetics revealed by single-molecule FRET and hidden Markov models. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4534–4543 (2014).
- [141] Yamane, T. *Statistik, Band 1*. Fischer Taschenbuchverlag, Frankfurt a. M., (1976).
- [142] Yamane, T. *Statistik, Band 2*. Fischer Taschenbuchverlag, Frankfurt a. M., (1976).
- [143] Mosler, K. C. and Schmid, F. *Wahrscheinlichkeitsrechnung und schließende Statistik*. Springer-Verlag, Berlin, (2006).
- [144] Kreyszig, E. *Statistische Methoden und ihre Anwendungen*. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, (1977).
- [145] Metzner, P. *Transition path theory for Markov processes*. PhD thesis, (2007).
- [146] Senne, M., Trendelkamp-Schroer, B., Mey, A. S. J. S., Schütte, C., and Noé, F. EMMA: A software package for Markov model building and analysis. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 2223–2238 (2012).
- [147] Kuzmenkina, E. V., Heyes, C. D., and Nienhaus, G. U. Single-molecule Förster resonance energy transfer study of protein dynamics under denaturing conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15471–15476 (2005).
- [148] Kobitski, A. Y., Nierth, A., Helm, M., Jäschke, A., and Nienhaus, G. U. Mg²⁺-dependent folding of a Diels-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2047–2059 (2007).
- [149] Klawitter, K. *Aufbau eines Prisma-TIRF Mikroskops und Untersuchung von Diffusion und Reaktion des Armadillo Repeat Proteins β -Catenin in Xenopus Laevis Fibroblasten*. Master thesis, (2012).
- [150] Sacca, B., Ishitsuka, Y., Meyer, R., Sprengel, A., Schöneweiß, E. C., Nienhaus, G. U., and Niemeyer, C. M. Reversible reconfiguration of DNA origami nanostructures monitored by single-molecule FRET. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 3592–3597 (2015).
- [151] Seyfried, V., Birk, H., Storz, R., and Ulrich, H. Advances in multispectral confocal imaging. *Proc. SPIE* **5139**, 147–157 (2003).
- [152] Kapanidis, A. N., Lee, N. K., Laurence, T. A., Doose, S., Margeat, E., and Weiss, S. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8936–8941 (2004).
- [153] Osborne, M. A., Balasubramanian, S., Furey, W. S., and Klenerman, D. Optically biased diffusion of single molecules studied by confocal fluorescence microscopy. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3160–3167 (1998).

- [154] Kurschat, W. C., Muller, J., Wombacher, R., and Helm, M. Optimizing splinted ligation of highly structured small RNAs. *RNA* **11**, 1909–1914 (2005).
- [155] Heyes, C. D., Kobitski, A. Y., Amirgoulova, E. V., and Nienhaus, G. U. Biocompatible surfaces for specific tethering of individual protein molecules. *J. Phys. Chem. B* **108**, 13387–13394 (2004).
- [156] Moerner, W., Peterman, E., Brasselet, S., Kummer, S., and Dickson, R. Optical methods for exploring dynamics of single copies of green fluorescent protein. *Cytometry* **36**, 232–238 (1999).
- [157] Dahan, M., Deniz, A. A., Ha, T., Chemla, D. S., G., S. P., and Weiss, S. Radiometric measurement and identification of single diffusing molecules. *Chem. Phys.* **247**, 85 – 106 (1999).
- [158] Chung, H. S., Louis, J. M., and Eaton, W. A. Experimental determination of upper bound for transition path times in protein folding from single-molecule photon-by-photon trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 11837–11844 (2009).
- [159] Rieger, R. F. *Investigation of a folding intermediate of RNase H using single molecule FRET spectroscopy*. PhD thesis, (2012).
- [160] Lee, N. K., Kapanidis, A. N., Wang, Y., Michalet, X., Mukhopadhyay, J., Ebright, R. H., and Weiss, S. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophys. J.* **88**, 2939–2953 (2005).
- [161] Rieger, R., Kobitski, A., Sielaff, H., and Nienhaus, G. U. Evidence of a folding intermediate in RNase H from single-molecule FRET experiments. *ChemPhysChem* **12**, 627–633 (2011).
- [162] Ha, T. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Methods* **25**, 78–86 (2001).
- [163] Ha, T., Rasnik, I., Cheng, W., Babcock, H. P., Gauss, G. H., Lohman, T. M., and Chu, S. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase. *Nature* **419**, 638–641 (2002).
- [164] Vermette, P., Gengenbach, T., Divisekera, U., Kambouris, P. A., Griesser, H. J., and Meagher, L. Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on different hydrogel interlayers. *J. Colloid Interface Sci.* **259**, 13–26 (2003).
- [165] Kingshott, P. and Griesser, H. J. Surfaces that resist bioadhesion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **4**, 403–412 (1999).
- [166] Ostuni, E., Chapman, R. G., Liang, M. N., Meluleni, G., Pier, G., Ingber, D. E., and Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells. *Langmuir* **17**, 6336–6343 (2001).
- [167] Weber, P. C., Ohlendorf, D., Wendoloski, J., and Salemme, F. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**, 85 (1989).

- [168] Stockmar, F. *Untersuchung zur Proteinfaltung durch Einzelmolekül-Förstertransferanalyse bei hoher Zeitauflösung*. PhD thesis, (2015).
- [169] Stockmar, F., Kobitski, A. Y., and Nienhaus, G. U. Fast folding dynamics of an intermediate state in RNase H measured by single-molecule FRET. *J. Phys. Chem. B* **120**, 641–649 (2016).
- [170] Pirchi, M., Ziv, G., Riven, I., Cohen, S. S., Zohar, N., Barak, Y., and Haran, G. Single-molecule fluorescence spectroscopy maps the folding landscape of a large protein. *Nat. Commun.* **2**, 493 (2011).
- [171] Jäger, M., Kiel, A., Hertel, D.-P., and Hamprecht, F. A. Analysis of Single-molecule fluorescence spectroscopic data with a Markov-modulated Poisson process. *ChemPhysChem* **10**, 2486–2495 (2009).
- [172] Gopich, I. V. and Szabo, A. Single-molecule FRET with diffusion and conformational dynamics. *J. Phys. Chem. B* **111**, 12925–12932 (2007).
- [173] Gopich, I. V. and Szabo, A. Decoding the pattern of photon colors in single-molecule FRET. *J. Phys. Chem. B* **113**, 10965–10973 (2009).
- [174] Gopich, I. V. and Szabo, A. Theory of the energy transfer efficiency and fluorescence lifetime distribution in single-molecule FRET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 7747–7752 (2012).
- [175] Haustein, E. and Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy: An introduction to its concepts and applications. *Biophysics Textbook Online* **94**, 1–33 (2004).
- [176] Widengren, J. and Mets, I. *Conceptual basis of fluorescence correlation spectroscopy and related techniques as tools in bioscience*. In Zander, C., Enderlein, J. and Keller, R. A. *Single molecule detection in solution: Methods and applications*. Wiley Online Library, (2002).
- [177] Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**, iv–vii (1910).
- [178] Weiss, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* **11**, 835–841 (1997).
- [179] Leipply, D. and Draper, D. E. The dependence of RNA tertiary structure stability on Mg^{2+} concentration: interpretation of the Hill equation and coefficient. *Biochemistry* **49**, 1843–1853 (2010).
- [180] Hennesly, S. P. and Sanbonmatsu, K. Y. Tertiary contacts control switching of the SAM-I riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2416–2431 (2011).
- [181] Lee, T. Extracting kinetics information from single-molecule fluorescence resonance energy transfer data using hidden Markov models. *J. Phys. Chem. B* **113**, 11535–11542 (2009).
- [182] Lilley, D. M. Ribozymes — a snip too far? *Nat. Struct. Biol.* **10**, 672 – 673 (2003).

- [183] Günther, T. Die intrazelluläre Mg-Ionenkonzentration. *Z. Naturforschg.* **22 b**, 149 – 154 (1967).
- [184] Prinz, J. H., Wu, H., Sarich, M., Keller, B., Senne, M., Held, M., Chodera, J. D., Schütte, C., and Noé, F. Markov models of molecular kinetics: Generation and validation. *J. Chem. Phys.* **134**, 174105 (2011).
- [185] Kobitski, A. Y., Hengesbach, M., Helm, M., and Nienhaus, G. U. Sculpting an RNA conformational energy landscape by a methyl group modification—a single-molecule FRET study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4326–4330 (2008).
- [186] Kobitski, A. Y., Hengesbach, M., Seidu-Larry, S., Dammertz, K., Chow, C. S., van Aerschot, A., Nienhaus, G. U., and Helm, M. Single-molecule FRET reveals a cooperative effect of two methyl group modifications in the folding of human mitochondrial tRNA(Lys). *Chem. Biol.* **18**, 928–36 (2011).
- [187] Dammertz, K., Hengesbach, M., Helm, M., Nienhaus, G. U., and Kobitski, A. Y. Single-molecule FRET Studies of counterion effects on the free energy landscape of human mitochondrial lysine tRNA. *Biochemistry* **50**, 3107–3115 (2011).
- [188] Kim, H. D., Nienhaus, G. U., Ha, T., Orr, J. W., Williamson, J. R., and Chu, S. Mg²⁺-dependent conformational change of RNA studied by fluorescence correlation and FRET on immobilized single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4284–4289 (2002).
- [189] Murphy, M. C., Rasnik, I., Cheng, W., Lohman, T. M., and Ha, T. Probing single-stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* **86**, 2530–2537 (2004).
- [190] Caliskan, G., Hyeon, C., Perez-Salas, U., Briber, R. M., Woodson, S. A., and Thirumalai, D. Persistence length changes dramatically as RNA folds. *Phys. Rev. Lett.* **95**, 268303 (2005).
- [191] Sindbert, S., Kalinin, S., Nguyen, H., Kienzler, A., Clima, L., Bannwarth, W., Appel, B., Müller, S., and Seidel, C. A. Accurate distance determination of nucleic acids via Förster resonance energy transfer: Implications of dye linker length and rigidity. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2463–2480 (2011).
- [192] Coban, O., Lamb, D. C., Zaychikov, E., Heumann, H., and Nienhaus, G. U. Conformational heterogeneity in RNA polymerase observed by single-pair FRET microscopy. *Biophys. J.* **90**, 4605–4617 (2006).
- [193] Huang, W., Kim, J., Jha, S., and Aboul-ela, F. Conformational heterogeneity of the SAM-I riboswitch transcriptional ON state: A chaperone-like role for S-adenosyl methionine. *J. Mol. Biol.* **418**, 331–349 (2012).
- [194] Huang, W., Kim, J., Jha, S., and Aboul-ela, F. The impact of a ligand binding on strand migration in the SAM-I riboswitch. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003069 (2013).
- [195] Batey, R. T., Rambo, R. P., and Doudna, J. A. Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2326–2343 (1999).

- [196] Dimura, M., Peulen, T. O., Hanke, C. A., Prakash, A., Gohlke, H., and Seidel, C. A. Quantitative FRET studies and integrative modeling unravel the structure and dynamics of biomolecular systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **40**, 163–185 (2016).
- [197] Suddala, K. C., Wang, J., Hou, Q., and Walter, N. G. Mg^{2+} shifts ligand-mediated folding of a riboswitch from induced-fit to conformational selection. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 14075–14083 (2015).
- [198] Baird, N. J., Kulshina, N., and Ferré-D'Amaré, A. R. Riboswitch function flipping the switch or tuning the dimmer? *RNA Biol.* **7**, 328–332 (2010).
- [199] Wickiser, J., Winkler, W., Breaker, R., and Crothers, D. The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell* **18**, 49–60 (2005).
- [200] Vogel, U. and Jensen, K. F. The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *J. Bacteriol.* **176**, 2807–2813 (1994).
- [201] Whitford, P. C., Schug, A., Saunders, J., Hennelly, S. P., Onuchic, J. N., and Sanbonmatsu, K. Y. Nonlocal helix formation is key to understanding S-adenosylmethionine-1 riboswitch function. *Biophys. J.* **96**, L7–L9 (2009).
- [202] Chung, H. S. and Eaton, W. A. Single-molecule fluorescence probes dynamics of barrier crossing. *Nature* **502**, 685–688 (2013).
- [203] Chung, H. S. and Gopich, I. V. Fast single-molecule FRET spectroscopy: Theory and experiment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 18644–18657 (2014).
- [204] Schäfer, S. *Einzelmolekül-FRET-Analyse des Diels-Alderase Ribozyms*. Master thesis, (2010).

Publikationsliste

Manz, C., Kobitski, A.Y., Samanta, A., Keller, B.G., Jäschke, A., and Nienhaus, G.U. Single-molecule FRET reveals the energy landscape of the full-length SAM-I riboswitch. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 1172-1178 (2017).

Manz, C., Kobitski, A.Y., Samanta, A., Keller, B.G., Jäschke, A., and Nienhaus, G.U. The multi-state energy landscape of the SAM-I riboswitch: A single-molecule Förster resonance energy transfer spectroscopy study. *J. Chem. Phys.* **148**, 123324 (2018).

Danksagung

Die Durchführung, Umsetzung und Finalisierung dieser Arbeit wäre durch die Unterstützung einiger Personen nicht möglich gewesen, denen ich nun danken möchte:

- Bei Prof. G. Ulrich Nienhaus möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, innerhalb seiner Arbeitsgruppe meine Forschungsarbeit durchführen und eine Doktorarbeit schreiben zu dürfen. Durch die sehr gute Laborausstattung, welche mir zur Verfügung gestellt wurde, war es mir möglich, gute Ergebnisse zu erzielen. Weiterhin möchte ich mich für seine Erfahrung und steten Ratschläge bedanken, durch welche ich lernen konnte, wissenschaftliche Inhalte präzise, konzise und konsistent darzustellen. Ebenso möchte ich mich für die Freiheit bedanken, im Labor neben den Pflichtaufgaben auch eigene Ideen verfolgen und umsetzen zu dürfen.
- Dr. Andrei Kobitski möchte ich für die fruchtbaren Diskussionen und die Ideengebung danken. Diese trugen maßgeblich dazu bei, meine Arbeit voranzutreiben und stetig zu verbessern. Ebenso gaben mir seine Motivation und Unterstützung, welche mich nie aufgeben ließ, immer wieder neuen Mut.
- Bei Prof. Dr. Andres Jäschke und Dr. Ayan Samanta möchte ich mich für die Bereitstellung der Proben sowie für die Diskussionen der Ergebnisse bedanken.
- Prof. Dr. Bettina Keller möchte ich für das Bereitstellen der HMM-Software sowie für den intensiven Austausch auch vor Ort danken. ä
- Bei Dr. Karin Nienhaus möchte ich mich für all ihre Hilfestellungen bedanken.
- Danke Dr. Franco Weth, meinem KSOP-Mentor, dessen Beratung und Unterstützung zum Erfolg beitrugen.
- Ich möchte mich bei den Studenten Susanne Dullenkopf und Tobias Kleiner, welche ich bei ihren Bachelorarbeiten betreuen durfte, für die Durchführung von Experimenten und für die gute Zusammenarbeit bedanken.
- Meinen Kollegen Florian Stockmar, Pauline Maffre, Michael Horn, Niklas Hedde, René Dörlich, Benedikt Prunsche, Stefan Brandholt, Elena Nickel, Annika Hense, Yvonne Klapper, Sarah Krämmer, Lukas Kürten, Karolin Klusmann, Patrick Stypa, Daria Kohler, Julia Kuhlmann, Jens Lackner, Gernot Guigas, Peng Gao, Li Shang, Mathilde Bichelberger, Antonia Eckert, Haxia Wang, Linxiao Yang, Rui Ma möchte ich für die schöne Zeit, die Unterstützung, Beratung und Diskussion danken, welche meine Zeit der Promotion bereichert haben.

Danksagung

- Ebenso möchte ich den Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Heinz Kalt danken, durch deren Hilfe bei kurzfristigen Leihgaben von Labormaterial sich so manche Probleme lösten.
- Ein Danke geht auch an das gesamten Sekretariat für ihre Unterstützung bei administrativen Aufgaben.
- Der Elektronikwerkstatt, Michael Hippe, Werner Gilde und Helmuth Lay sowie Alexander Hepting möchte ich für ihre Hilfe bei Reparaturen, Wartungen, Fehlersuche und Verbesserungen von Laborgeräten danken.
- Der gesamten Mechanikwerkstatt der Angewandten Physik möchte ich danken für ihre Arbeit und konstruktive Unterstützung, welche zur Verbesserung der messtechnischen Aufbauten innerhalb des Labors sowie der Praktikumsaufbauten geführt hatten. Weiterhin für die Möglichkeit, ein Grundlagenpraktikum in der Metallbearbeitung absolvieren zu können, durch das ich viel Neues lernen konnte.
- Meiner Frau Jennifer Manz möchte ich herzlich danken. Durch ihre Liebe, Geduld, Empathie und Motivation, vor allem auf Durststrecken und in Stressphasen, habe ich nie den Mut verloren.
- Sehr dankbar bin ich meiner ganzen Familie, durch deren Unterstützung und Erfahrung ich stets Rückhalt und Zuspruch gefunden habe, weiterzumachen und die richtigen Entscheidungen zu treffen.