



BACHELORARBEIT

Frau
Josephine Meitzner

Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren

Mittweida, September 2023

Fakultät Ingenieurwissenschaften

BACHELORARBEIT

Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren

Autorin:

Josephine Meitzner

Studiengang:

Lasertechnik/Physikalische Technik

Seminargruppe:

Lt20wL-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Richard Börner

Zweitprüferin:

Vanessa Schumann, M.Sc.

Einreichung:

Mittweida, 30.09.2023

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2023

Faculty of **Engineering Sciences**

BACHELOR THESIS

Fluorescence spectroscopic characterization of deoxyribonucleic acids

Author:

Josephine Meitzner

Course of Study:

Lasertechnik/Physikalische Technik

Seminar Group:

Lt20wL-B

First Examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Richard Börner

Second Examiner:

Vanessa Schumann, M.Sc.

Submission:

Mittweida, 30.09.2023

Defense/Evaluation:

Mittweida, 2023

Bibliografische Beschreibung:

Meitzner, Josephine:

Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren. – 2023. – 37 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida – University of Applied Sciences, Fakultät Ingenieurwissenschaften, Bachelorarbeit, 2023.

Referat:

In dieser Arbeit wird ein DNA-Einzelstrang mittels fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen charakterisiert. Die DNA ist mit zwei Fluorophoren markiert, damit die Charakterisierung mittels FRET durchgeführt werden kann. Durch Zugabe von monovalenten Metallionen $K(I)$ und $Na(I)$ wird der Faltungszustand der DNA beeinflusst. Die Messungen werden bei verschiedenen Bedingungen durchgeführt (Metallionenkonzentration, Metallion, Temperatur, Puffer und pH-Wert). Durch die Berechnung des relativen Anteils der Akzeptoremission kann FRET bestimmt werden und daraus auf den Abstand der Farbstoff am Molekül der DNA geschlossen werden.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Danksagung	V
1 Motivation	1
2 Grundlagen	2
2.1 Biologische und chemische Grundlagen	2
2.1.1 Desoxyribonukleinsäuren	2
2.1.2 Äußere Einflüsse auf die Struktur der DNA	2
2.1.3 Fluorophore	3
2.1.4 Puffer und pH-Wert	4
2.2 Physikalische Grundlagen	5
2.2.1 Absorption	5
2.2.2 Fluoreszenz	5
2.2.3 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)	6
3 Material	8
3.1 Chemikalien	8
3.2 Puffer und Lösungen	8
3.3 Molekularbiologische Reagenzien	8
3.4 Geräte und Verbrauchsmaterial	9
4 Methoden	10
4.1 Untersuchte DNA Sequenz	10
4.2 Probenvorbereitung	10
4.3 Absorptionsmessung mittels NanoDrop One	11
4.4 Bestimmung des Markierungsgrads einer fluoreszenzmarkierten DNA-Probe	11
4.5 Herstellung von Lösungen und Puffern	12
4.6 Pipettierschema	13
4.7 Charakterisierung des Spektrometers	13
4.7.1 Allgemeine Information	13
4.7.2 Technische Daten	14
4.8 Messbedingungen	15
4.9 Bleed-through und direct excitation	16
4.10 Korrektur der Messdaten	16
4.11 Datenanalyse durch Hill-Funktion	17
4.12 FRET Vorhersage mittels Accessible contact Volumen	18
5 Ergebnisse	20
5.1 Qualitätskontrolle der DNA	20
5.2 Korrekturmatrix für Cy3 und Cy5	22

5.3	FRET in Abhängigkeit der Metallionenkonzentration	23
5.3.1	K(I) bzw. Na(I) Titration für die DNA T14 und DNA T4	23
5.3.2	Unterschiedliche Puffer	26
5.4	FRET in Abhängigkeit der Temperatur	28
5.5	Vergleich FRET vorhersage mit Experiment	30
6	Diskussion	32
6.1	Qualitätskontrolle der DNA	32
6.2	DNA T14 ist nicht als FRET Standrad einsetzbar	33
6.3	K(I) und Na(I) führen zur stabilen Faltung des DNA- <i>Hairpin</i> -Motives für die DNA T4 Probe	33
6.4	Puffer und pH-Werte scheinen Einfluss auf die Messungen zu haben	34
6.5	Beurteilung der Regressionsparameter	34
6.6	Aufschmelzen des DNA- <i>Hairpins</i> konnte auch mittels FRET gezeigt werden	35
6.7	FRET Vorhersage stimmt mit Experiment überein	35
7	Zusammenfassung und Ausblick	36
	Anhang	38
A	Messprotokolle	38
B	Konzentrationsabhängigkeit von FRET	42
C	Regressionsparameter	44
D	Fehlerrechnung	47
	Literaturverzeichnis	49
	Eidesstattliche Erklärung	51

Abkürzungsverzeichnis

β	Massenkonzentration
k_A	Ligandenkonzentration mit halber Besetzung / <i>ligand concentration producing half occupation</i>
k_{eq}	Gleichgewichtskonstante / <i>equilibrium constant</i>
K_D	Dissoziationskonstante
K_S	Säurekonstante
M_w	Molarenmasse/molecular weight
R_0	Förster Radius
T_m	Schmelztemperatur
bg	Hintergrundsignal/ <i>background</i>
bt	<i>bleed-through</i>
dE	<i>direct excitation</i>
n	Hill-Koeffizient
pK_S	negativen Logarithmus der Säureskonstante K_S
κ^2	Orientierungsfaktor
A	Akzeptor
ACV	acesible contact volume
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
D	Donor
diH₂O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA / <i>double stranded DNA</i>
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
H₃O⁺	Hydroniumionen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
PMT	ultra-gekühlte Photomultiplier-Röhre / Photomultiplier Tube

rcf	relativen Zentrifugalbeschleunigung
RFU	relative fluorescence units
S₀	energetischer Grundzustand
S₁	angeregter Zustand
SR	Schwingungsrelaxation
ssDNA	einzelsträngige DNA / <i>single stranded DNA</i>
TRIS HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich während meiner Bachelorarbeit unterstützt haben, bedanken.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Richard Börner bedanken. Dieser gab mir die Möglichkeit meine Bachelorarbeit im Bereich der Biophotonik am Laserinstitut der Hochschule Mittweida zu schreiben und unterstützte mich mit vielen hilfreichen Hinweisen und konstruktiver Kritik beim Schreiben meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau Vanessa Schumann. Sie zeigte mir die Arbeit im Labor und den richtigen Umgang mit DNA-Proben. Außerdem stand sie mir während meiner Experimente und im Schreibprozess immer mit Rat zur Seite.

Allgemein gilt mein Dank dem B-Lab für das angenehme Arbeitsklima und die allgemeine Unterstützung bei Fragen oder Problemen. Weiterhin möchte ich mich auch bei Herrn Felix Erichson bedanken, der mich durch die Erstellung des DNA-Modells und bei der Bestimmung der theoretischen FRET-Werte unterstützt hat.

Ich möchte mich ebenfalls für die finanzielle Unterstützung, durch das Ausbildungstipendium des Vereins Laserinstitut Mittelsachsen e.V. bedanken.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie danken, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben, sowie meinen Freunden und Kommilitonen.

1 Motivation

Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist eines der wichtigsten Biomoleküle, das wir kennen. Als Träger der Erbinformation spielt die DNA eine wichtige Rolle in quasi allen Prozessen einer Zelle in jedem Organismus. Die Faltung der DNA in diese Struktur erfolgt über verschiedene Zwischenschritte [1]. Aus der Sequenz, die auch Primärstruktur genannt wird, faltet sich, durch den Einfluss monovalenter Metallionen, die Sekundärstruktur. Solche Sekundärstrukturelemente sind zum Beispiel *Hairpin*-Motive, wie eines auch in dieser Arbeit untersucht werden soll. Um die Faltungsschritte beobachten und untersuchen zu können, wird die DNA an definierten Positionen mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorophore) markiert. Das ist die Voraussetzung für eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der DNA. Dabei können verschiedene Methoden wie z.B. Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) zum Einsatz kommen. FRET ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Struktur von Biomolekülen [2, 3]. Durch das Messen der Interaktion zweier Farbstoffe, hier Cy3 und Cy5, sollen Aussagen über die Struktur des zugrundeliegenden Biomoleküls getroffen werden.

Ziel dieser Arbeit ist die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung eines DNA *Hairpin* Motivs unter verschiedenen Bedingungen, mittels FRET. Dazu sollen zum einen unterschiedliche Metallionenkonzentrationen (im Bereich von 0 mM bis 500 mM) und deren Effekt auf die DNA analysiert werden. Weiterhin soll der Einfluss von unterschiedlichen Metallionen (Kalium- und Natriumionen) verglichen werden. Zum Schluss soll das Verhalten der DNA bei unterschiedlichen pH-Werten und Puffern betrachtet werden, um den Zustand der DNA in Bereichen außerhalb des neutralen pH-Bereichs (pH 7.4) zu untersuchen. Für die Charakterisierung sollen zwei Prozesse betrachtet werden. Zum einen soll die Bildung des *Hairpins* durch die Zugabe von monovalenten Metallionen charakterisiert werden, zum anderen ist es ein Ziel, das Aufschmelzen des *Hairpins* durch eine Temperaturerhöhung auch mittels FRET sichtbar zu machen. Ist dies abgeschlossen, soll die charakterisierte DNA als Probenstandard im Labor eingesetzt werden können. Die bisher eingesetzte DNA hat die gleiche Sequenz wie die hier untersuchte DNA. Beide Konstrukte bilden das gleiche *Hairpin*-Motiv aus. Die Farbstoffpositionen beider DNA-Konstrukte unterscheiden sich aber, da festgestellt wurde, dass die bisher verwendete DNA nicht als Standard im Labor verwendet werden kann [4].

2 Grundlagen

2.1 Biologische und chemische Grundlagen

2.1.1 Desoxyribonukleinsäuren

Die DNA ist eine Nukleinsäure und Träger der Erbinformationen. Diese ist ein Polyanion und besteht aus mehreren Nukleotiden. Ein Nukleotid besteht aus einem Phosphatrest, einem Zuckermolekül und einer organischen Base. Der Phosphatrest ist negativ geladen und bildet zusammen mit dem Zucker das Rückgrat der DNA. Der Zucker der DNA ist Desoxyribose und besteht aus fünf Kohlenstoffatomen. Diese werden mit C1 bis C5 Atom im Uhrzeigersinn benannt. Diese Nomenklatur ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Insgesamt gibt es vier verschiedenen organische Basen. Diese können in Purine und Pyrimidine unterteilt werden. Dabei sind Adenin (A) und Guanin (G) Purine und Cytosin (C) und Thymin (T) Pyrimidine. Die DNA liegt im Genom als Doppelstrang vor, wobei sich Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren bilden. Hierbei sind Adenin und Thymin durch zwei Wasserstoffbrücken und Cytosin und Guanin durch drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Sie bilden sogenannte kanonische Basenpaare [1, 5]. In Abbildung 2.1 ist der Aufbau der DNA dargestellt.

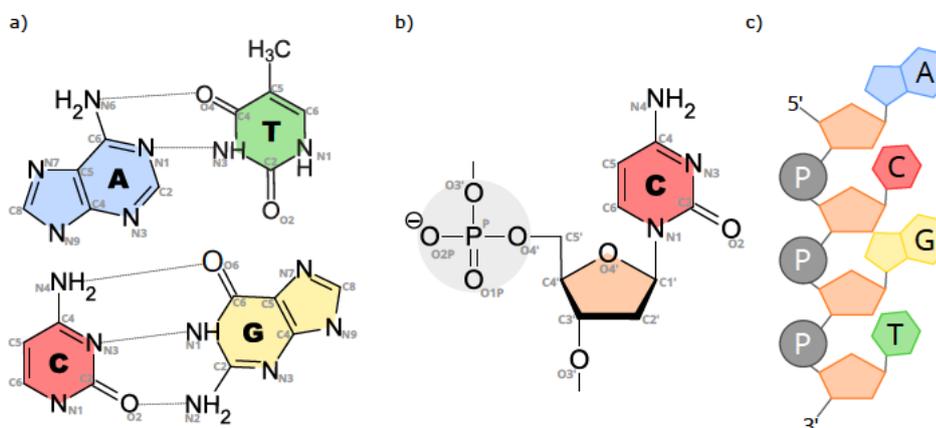


Abbildung 2.1: a: Struktur der organischen Basen Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G), mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den kanonischen Basenpaaren. b: Aufbau eines Nukleotids am Beispiel von Cytosin. c: schematisch Struktur eines DNA-Einzelstrangs

2.1.2 Äußere Einflüsse auf die Struktur der DNA

Der Faltungsprozess der DNA kann in drei Schritte unterteilt werden. Im Ausgangszustand liegt die DNA ungefaltet und einzelsträngig vor, ohne die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Dies ist die Primärstruktur der DNA. Durch Bildung von Wasserstoffbrücken, zwischen den kanonischen Basenpaaren, bildet sich die Sekundärstruktur. Dabei formen sich Sekundärstrukturelemente wie *Bulges*, *Internal loops* oder *Hairpins*. Die Tertiärstruktur ergibt sich aus zwei oder mehreren Sekundärstrukturen, die miteinander interagieren [6].

Durch die Zugabe von Metallionen können die Faltungsschritte der DNA beeinflusst werden. Für die Faltung einer Sekundärstruktur sind Alkalimetalle (Metalle der 1. Hauptgruppe) wichtig. Häufig werden K(I) und Na(I) verwendet. Durch die Zugabe von monovalenten Metallionen faltet sich eine einzelsträngige DNA / *single stranded DNA* (ssDNA) zu einer doppelsträngigen DNA / *double stranded DNA* (dsDNA). Dabei schirmen die monovalenten Metallionen das negative geladene Rückgrat der DNA ab, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den kanonischen Basenpaaren stabilisiert werden [7, 8].

Weitere Einflüsse auf die DNA haben divalente Metallionen und die Temperatur. Durch divalente Metallionen können Tertiärstrukturen stabilisiert werden, wohingegen zu hohe Temperaturen zum Aufschmelzen der dsDNA führen. Die Schmelztemperatur (T_m) gibt dabei an, bei welcher Temperatur 50 % der DNA einzelsträngig und 50 % doppelsträngig vorliegt [8, 9].

2.1.3 Fluorophore

Cyanine 3 (Cy3) und Cyanine 5 (Cy5) sind Fluorophore, welche zu der Gruppe von Carbocyaninen gehören. Diese bestehen aus zwei Indoleningruppen, welche über mehrere Kohlenstoffatome verbunden sind. Die Anzahl der Kohlenstoffatome ist in der Bezeichnung der Farbstoffe angegeben. Demzufolge sind es bei Cy3 drei Kohlenstoffatome und bei Cy5 fünf. Durch die unterschiedlichen Längen der Cyanine besitzen diese unterschiedliche Absorptions- und Emissionswellenlängen. In Abbildung 2.2 sind die Absorptions- und Emissionsspektren und die Struktur von Cy3 und Cy5 dargestellt [10–12].

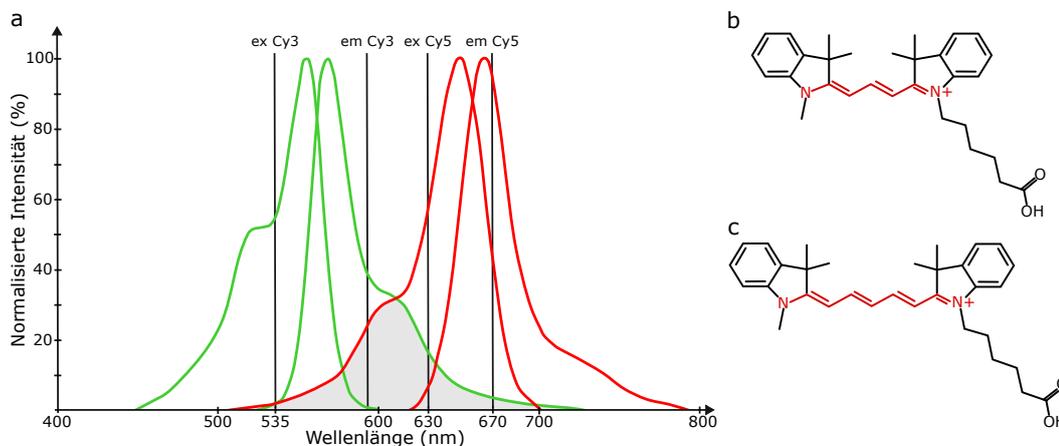


Abbildung 2.2: Absorptions- und Emissionsspektren und die Struktur von Cy3 und Cy5. a: Absorptions- und Emissionsspektren von Cy3 (grün) und Cy5 (rot) mit Absorption- bzw. Emissionswellenlänge fürs Experiment. Grau hinterlegt ist das Überlappungsintegral. b: Strukturformel von Cy3. c: Strukturformel von Cy5.

Weiterhin besitzen die Cyanine einen hohen Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeute. Für die verwendeten Farbstoffe sind in Tabelle 2.1 Absorptions- und Emissionswellenlänge, sowie deren Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeute angegeben [11–13].

Tabelle 2.1: Maximale Absorptions-, Emissionswellenlänge, der dekadische Extinktionskoeffizienten, Quantenausbeute und der Korrekturfaktor CF_{260} der Farbstoffe Cy3 und Cy5.

Farbstoff	Abs _{max} (nm)	Em _{max} (nm)	ϵ_{dek} (l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹)	Quantenausbeute	CF_{260}
Cyanine 3	555	570	150 000	0,31	0,04
Cyanine 5	646	662	250 000	0,20	0,03

2.1.4 Puffer und pH-Wert

Der pH-Wert gibt die Acidität bzw. Basizität einer Lösung an. Dieser ist über den negativen dekadischen Logarithmus der Hydroniumionenaktivität definiert (Gleichung (2.1)). In einer verdünnten wässrigen Lösung kann die Aktivität mit der Konzentration nahezu gleichzusetzen werden. Ein Hydroniumionen (H_3O^+) besteht aus einem Wassermolekül und einem Wasserstoffion.

$$pH = -\lg[H_3O^+] \quad (2.1)$$

Durch Änderung des pH-Werts kann es zur Störung bzw. Zerstörung der Struktur von Nukleinsäuren kommen [1]. Um den pH-Wert in einer Lösung stabil zu halten, werden Puffer verwendet. Puffer schwächen die Änderung des pH-Werts, bei Zugabe von starken Säuren oder Basen ab. Puffer bestehen aus einem schwachen konjugierten Säure-Basen-Paar. Diese stabilisieren den pH-Wert, da sie gleichzeitig Protonenquelle und Protonensenke sind.

Die Deprotonierung einer Säure HA mit einer Base A^- , kann mit der Säurekonstante (K_S) beschrieben werden (Gleichung (2.2)).

$$K_S = \frac{[H_3O^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \quad (2.2)$$

Die Stärke einer Säure wird mit dem negativen Logarithmus der Säurekonstante K_S (pK_S) angegeben (Gleichung (2.3)).

$$pK_S = -\lg(K_S) \quad (2.3)$$

Durch Umstellen und Logarithmieren von Gleichung (2.2) ergibt sich Gleichung (2.4).

$$-\lg[H_3O^+] = -\lg K_S - \lg \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (2.4)$$

Mithilfe der Gleichungen (2.1) und (2.3) kann die Gleichung zur Henderson-Hasselbach-Gleichung (2.5) umgestellt werden [1].

$$pH = pK_S - \lg \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (2.5)$$

Der pH-Wert wird durch Zugabe einer Base eingestellt. Diese entsteht durch das Lösen eines Metalls oder Metalloxide im deionisiertes Wasser (diH_2O). Mittels der Henderson-Hasselbach-Gleichung kann der Metallionen hintergrund bestimmt werden, welcher bei der Einstellung des pH-Werts hinzugegeben worden ist [1, 14].

2.2 Physikalische Grundlagen

2.2.1 Absorption

Bei der Absorption von Licht wird Energie in Form von Strahlung von einem Körper aufgenommen. Dabei kann die gesamte oder nur ein Teil der Energie vom Körper absorbiert werden. In Flüssigkeit kann dieser Vorgang durch das Lambert-Beer-Gesetz beschrieben werden (Gleichung (2.6)) [2]. Das Lambert-Beer-Gesetz beschreibt die Intensitätsänderung der Strahlung beim Durchstrahlen einer Probe in Abhängigkeit der Dicke der Probe. Dabei ist I die Intensität der Strahlung nach dem Durchstrahlen des Körpers, I_0 die Anfangsintensität, d ist die Dicke der durchstrahlenden Probe, c ist die Konzentration und ϵ ist der Extinktionskoeffizient/Absorptionskoeffizient. In Gleichung (2.6) ist das Lambert-Beer-Gesetz beschrieben.

$$\frac{dI}{I} = -\epsilon \cdot c \cdot dx \quad (2.6)$$

Durch Integration von Gleichung (2.6) mit den Integrationsgrenzen von I_0 bis I und 0 bis d ergibt sich Gleichung (2.7).

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\epsilon \cdot c \cdot d \quad (2.7)$$

Durch Umstellen der Gleichung (2.7) nach I ergibt sich Gleichung (2.8).

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot d \cdot c} \quad (2.8)$$

Um ein Elektron in den nächst höheren energetischen Zustand zu heben, muss die Energiedifferenz ΔE überwunden werden. Dafür muss die eingebrachte Energie gleich groß der Energiedifferenz zwischen dem energetischer Grundzustand (S_0) und dem angeregter Zustand (S_1) sein. Dies lässt sich mit Gleichung (2.9) beschreiben. Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz [2]. Der Vorgang der Absorption ist im Jabłoński-Diagramm in Abbildung 2.3 dargestellt.

$$h \cdot \nu = S_1 - S_0 = \Delta E \quad (2.9)$$

2.2.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz beschreibt einen Prozess, bei dem ein Elektron durch spontane Emission eines Photons von einem energetisch höheren (angeregten) Zustand in den Grundzustand zurückfällt. In den angeregten Zustand gelangt das Elektron durch eine äußere Anregung, z.B. einen Laser. Durch spontane Emission wird das Atom in seinen Grundzustand zurückgesetzt. Das emittierte Fluoreszenzlicht hat eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht der Anregungsquelle. Dieser Wellenlängen Unterschied wird Stokes Shift genannt. Das zustande kommen des Stokes Shift kann mithilfe des Jabłoński-Diagramms (Abbildung 2.3) erklärt werden. Bei der Absorption gelangt das Elektron in einen Schwingungsniveau ν_2 (vibronisches Niveau) des elektronisch angeregten Zustandes. Aus diesen kann das Elektron nicht emittieren. Durch eine Schwingungsrelaxation (SR) gelangt das Elektron in den Grundzustand des angeregten Zustands aus dem es in einem höheren Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands emittiert. Von diesen aus gelangt das Elektron durch

SR in den energetischen Grundzustand. Dass die Emission nur aus dem Schwingungsgrundzustand stattfindet, ist unter dem Namen Kasha-Regel (*Kasha's Rule*) bekannt. Dementsprechend ist die Energie des emittierten Photons geringer als die des absorbierten Photons [2].

2.2.3 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)

FRET ist der Energietransport von einem Fluoreszenzfarbstoff (Donor (D)) auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor (A)). Dabei wird der Donor Farbstoff angeregt. Aus dem angeregten energetischen Grundzustand wird die Energie auf den Akzeptorfarbstoff übertragen, wobei dieser angeregt wird. Anschließend sendet der Akzeptorfarbstoff ein Photon aus. Im Gegensatz zum Austauschmechanismus findet die Energieübertragung bei FRET kontaktlos vonstatten. Dies ist aufgrund von langreichweitigen Dipol-Dipol Wechselwirkungen (Förstermechanismus) möglich. Allerdings müssen sich die beiden Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander befinden. Durch FRET kann der Abstand von Fluorophore in einem Bereich von 2 nm bis 10 nm bestimmt werden. Bei der Auswahl der Farbstoffe muss darauf geachtet werden, dass sich das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Das wird auch als Überlappungsintegral bezeichnet (Abbildung 2.2). Wenn dies nicht der Fall ist, kann der Akzeptor nicht durch die Emission des Donor angeregt werden. In Abbildung 2.3 ist FRET in Abhängigkeit des Abstandes der Farbstoffe dargestellt. Bei FRET von 0,5 kann der Förster Radius (R_0) abgelesen werden. R_0 beschreibt den Abstand zwischen den zwei Fluorophore, bei dem die Effizient des Energietransfers gleich 50 % ist. Für die Farbstoffe Cy3 und Cy5 ist $R_0 = 5,4$ nm [15]. Dieses Verhältnis kann mir Gleichung (2.10) beschrieben werden [2].

$$FRET = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \tag{2.10}$$

In Abbildung 2.3 ist die Gleichung (2.10) für die Farbstoffe Cy3 und Cy5 dargestellt.

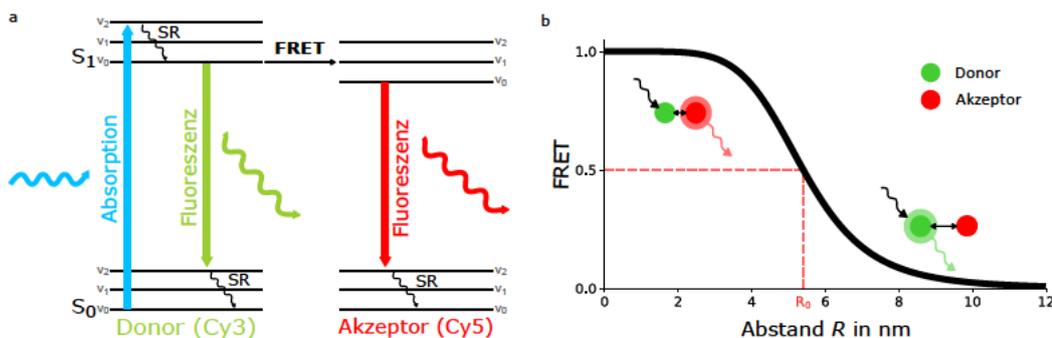


Abbildung 2.3: a: Darstellung von Absorption, Fluoreszenz und FRET im Jablonski-Diagramm. (S_0 = Grundniveau, S_1 = 1 angeregter Zustand, ν = Schwingungsniveau des entsprechenden elektronischen Zustandes, SR = Schwingungsrelaxation). b: FRET in Abhängigkeit der Farbstoffabstände von Cy3 (grün) und Cy5 (rot) mit einem Försterradius $R_0 = 5,4$ nm.

Weiterhin ist die Ausrichtung der Dipolmomente der Farbstoffe wichtig. Die Orientierung der Dipolmomente zueinander kann mit dem Orientierungsfaktor (κ^2) beschrieben werden und liegt zwischen 0 und 4. Der maximale Energietransfer findet bei einem κ^2 von 4 statt, dabei sind die Dipole kollinear

zueinander ausgerichtet. Bei einer senkrechten Ausrichtung zueinander ist $\kappa^2 = 0$ und es findet kein Energietransfer statt. Im Allgemeinen wird für κ^2 gleich $2/3$ angenommen [2]. In Abbildung 2.4 ist die Orientierung der Dipole zueinander dargestellt.

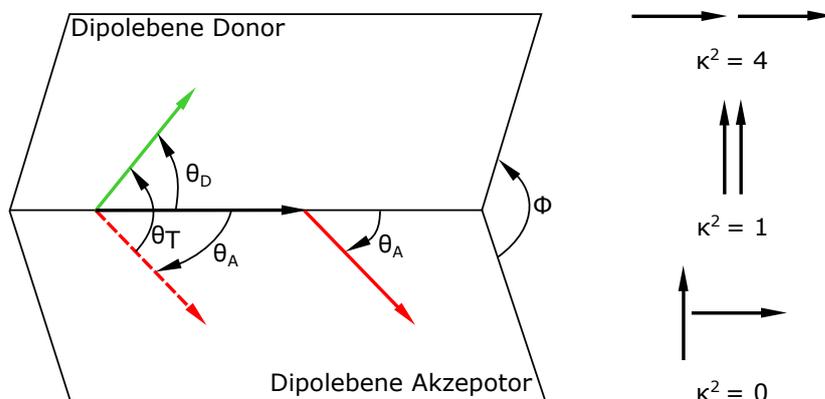


Abbildung 2.4: Orientierung der Dipolmomente der Donoremission (grün) und der Akzeptorsabsorption (rot) und mögliche Ausrichtungen der Dipolmomente mit der jeweiligen κ^2 .

Mit den Gleichungen (2.11) und (2.12) kann κ^2 bestimmt werden.

$$\kappa^2 = (\cos \Theta_T - 3 \cos \Theta_D \cos \Theta_A)^2 \tag{2.11}$$

$$\kappa^2 = (\sin \Theta_D \sin \Theta_A \cos \Phi - 2 \cos \Theta_D \cos \Theta_A)^2 \tag{2.12}$$

Dabei ist Θ_T der Winkel zwischen Emissions-Dipols des Donors und Absorptions-Dipols des Akzeptors. Θ_D und Θ_A sind die Winkel zwischen dem Verbindungsvektor vom Donor und Akzeptor und des dazugehörigen Dipols. Φ ist der Winkel zwischen den Dipolebenen [2].

3 Material

3.1 Chemikalien

- diH₂O
- NaCl, Reinheit: $\geq 99,5\%$
- NaOH, Reinheit: $\geq 99,0\%$
- KCl, Reinheit: $\geq 99,5\%$
- KOH, Reinheit: $\geq 85,0\%$
- N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Reinheit: $\geq 99,5\%$
- 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), Reinheit: $\geq 99,5\%$
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS HCl), Reinheit: $\geq 99,5\%$

Alle Chemikalien sind von der Firma Carl Roth GmbH.

3.2 Puffer und Lösungen

- 10 nM Cy3
- 10 nM Cy5
- 1 M NaCl-Lösung
- 5 M NaOH - Lösung
- 1 M KCl - Lösung
- 5 M KOH - Lösung
- 1 M HEPES Puffer pH 7,4 mit NaOH eingestellt
- 1 M HEPES Puffer pH 7,4 mit KOH eingestellt
- 1 M MOPS Puffer pH 6,5 mit NaOH eingestellt
- 1 M MOPS Puffer pH 6,5 mit KOH eingestellt
- 1 M TRIS HCl Puffer pH 8,5 mit NaOH eingestellt
- 1 M TRIS HCl Puffer pH 8,5 mit KOH eingestellt

Alle Lösungen sind mit diH₂O hergestellt worden.

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

- DNA Hairpin mit Cy3 an T14
Sequenz: 5'GAA TAT TTA TTA AT-Cy3-A TCT TCG GAT ATT AAT AAA TAT TC-Cy5-3'
nmoles/OD₂₆₀: 2,5
Schmelztemperatur T_m (50 mM NaCl): 50,4 °C
Molare Masse M : 12839,9 g · mol⁻¹
Extinktionskoeffizient ϵ : 405000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹
- DNA Hairpin mit Cy3 an T4
Sequenz: 5'GAA T-Cy3-AT TTA TTA ATA TCT TCG GAT ATT AAT AAA TAT TC-Cy5-3'
nmoles/OD₂₆₀: 2,5

Schmelztemperatur T_m (50 mM NaCl): 50,4 °C
Molare Masse M : 12839,9 g · mol⁻¹
Extinktionskoeffizient ϵ : 405000 l · mol⁻¹ · cm⁻¹

Die Angaben wurden den jeweiligen Datenblättern von Integrated DNA Technologies (IDT) entnommen [16, 17].

3.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

Spektrometer:

- SpectraMax iD5 Multi-Mode-Mikroplatten-Reader (Molecular Devices)
Plattenlesegerät für Fluoreszenzmessungen
- NanoDrop One (ThermoFisher)
Messung von Absorption

Zentrifuge:

- Zentrifuge 5804 R (Eppendorf)
Zentrifuge mit Kühlfunktion für die Entsalzung der DNA
- Mini Star silverline Zentrifuge (WR)
zentrifugieren von Proben
- Thermo Shaker TS-100C (Biosan)
- MS1 Minishaker (IKA)
Vortexer
- pH-Meter FiveEasy Plus (Mettler Toledo)
Einstellung des pH-Werts von Puffern
- Filter Porengröße 0,2 µM (ThermoFisher)
zum sterinfiltrieren von Lösungen und Puffern
- Vivaspin Filtergröße 5 kDa (Sartorius)
Entsalzung der DNA-Proben
- 96 Wellplatte (ThermoFisher)

4 Methoden

4.1 Untersuchte DNA Sequenz

Die zu untersuchende DNA Sequenz wurde so entworfen, dass sich ein Hairpin-Motiv ausbilden kann. Diese DNA Sequenz wurde mit den Fluorophoren Cy3 und Cy5 markiert. Untersucht wurden zwei DNA-Proben mit jeweils zwei unterschiedlichen Markierungspositionen der Fluorophore. Die erste DNA-Probe wurde mit Cy3 am 14. Thymin vom 5'-Ende und mit Cy5 am 3'-Ende am Cytosin markiert. Diese wird als DNA T14 bezeichnet. Diese DNA-Probe wurde bereits im Praxismodul untersucht, wobei erkannt wurde, dass sich diese Probe nicht als Standardprobe für FRET Untersuchungen eignet [4]. Aus diesem Grund wird die gleiche DNA Sequenz mit neuen Farbstoffpositionen untersucht. Die zweite DNA-Probe wurde mit Cy3 am 4. Thymin vom 5'-Ende und mit Cy5 am 3'-Ende am Cytosin markiert. Diese wird als DNA T4 bezeichnet. In Abbildung 4.1 sind beide DNA-Sequenzen mit den jeweiligen Farbstoffpositionen dargestellt.

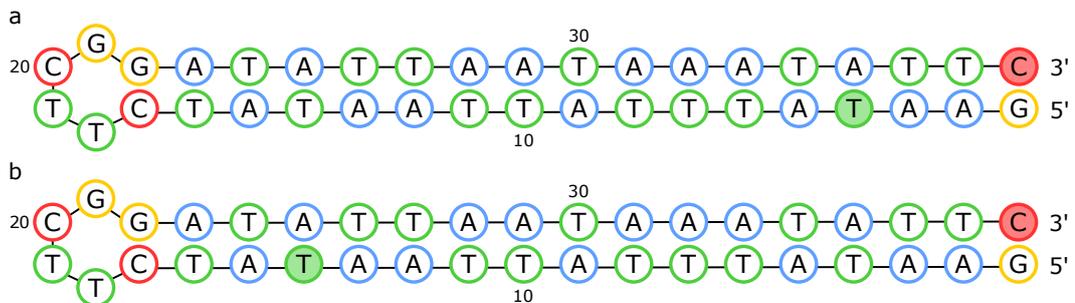


Abbildung 4.1: Sekundärstruktur DNA Hairpin mit Farbstoffpositionen. a: DNA T14 mit Cy5 (rot) am 3'-Ende und Cy3 (grün) an Position 14 von 5'-Ende aus ans Thymin gebunden. b: DNA T4 mit Cy5 (rot) am 3'-Ende und Cy3 (grün) an Position 4 von 5'-Ende aus ans Thymin gebunden.

4.2 Probenvorbereitung

Bevor die DNA für eine Messung verwendet werden kann, muss diese entsalzt und auf die benötigte Konzentration verdünnt werden. Die Entsalzung der DNA wird mit einer Vivaspin-Konzentrationseinheit durchgeführt. Die Filtrationseinheit des Vivaspin hat eine Größe von 5 Kilodalton (kDa). Die Größe der verwendeten Filtrationseinheit des Vivaspin sollte mindestens 50 % kleiner sein als die Molekülgröße. Die DNA hat ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa, demzufolge ist gewählte Größe für das Entsalzen von DNA geeignet [18].

Zuerst wird die DNA in den Vivaspin gegeben und mit dH_2O auf 500 μl aufgefüllt. Danach wird der Vivaspin in eine Zentrifuge gegen und für 20 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C und einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1200 relativen Zentrifugalbeschleunigung (rcf) zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren werden mögliche Salze durch den Filter gespült. Nach dem Zentrifugieren wird das durch den Filter gelangte Wasser entleert. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt. Für die Fluoreszenzmessungen wurde die DNA auf eine Konzentration von 25 μM verdünnt.

4.3 Absorptionsmessung mittels NanoDrop One

Der NanoDrop One ist ein Micro-UV/Vis-Spektralphotometer. Mit dem NanoDrop One können Mikrovolumenanalysen durchgeführt werden, mit einem Probenvolumen von 1 µl bis 2 µl. Es können UV/Vis-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 850 nm aufgenommen werden. Dabei können für mehrere Wellenlängen spezifische Messungen durchgeführt werden. Der Vorteil am NanoDrop One ist die schnelle und einfache Messung von Proben, bei einem sehr geringen Verbrauch der Probe. Für die Bestimmung der Konzentration der DNA nach der Entsalzung, wurde die Anwendung zur Messung von ssDNA verwendet. Dabei wurde ein Absorptionsspektrum und die Massenkonzentration (β) der DNA bestimmt. Die Messung wurde dreimal durchgeführt und anschließend der Mittelwert von β gebildet und mit der Molaren Masse/molecular weight (M_w) die Konzentration c bestimmt (Gleichung (4.1))[19].

$$c = \frac{\beta}{M_w} \quad (4.1)$$

4.4 Bestimmung des Markierungsgrads einer fluoreszenzmarkierten DNA-Probe

Zur Überprüfung der Reinheit der DNA und des jeweiligen Markierungsgrades der Farbstoffe an der DNA wurde die DNA auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt. Anschließend wurde eine Absorptionsmessung mittels NanoDrop durchgeführt. Es wurde das Spektrum von 190 nm bis 850 nm aufgenommen. Weiterhin wurde die Absorption bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm, 555 nm und 646 nm gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die Absorption von der DNA gemessen, für die Konzentrationsbestimmung. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Fluorophore liegen für Cy3 bei 555 nm und Cy5 bei 646 nm. Für die Farbstoff-Konzentrationsbestimmung wird bei diesen Wellenlängen die Absorption gemessen. Für die Bestimmung der Reinheit der DNA wurde die Absorption bei den Wellenlängen 230 nm und 280 nm gemessen. Anschließend wird der Quotient der Absorption von $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ bestimmt. Für die Bestimmung des Markierungsgrades wurde die Konzentration der DNA und der Farbstoffe Cy3 und Cy5 bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Lambert-Beer-Gesetz verwendet (Gleichung (4.2)) [19].

$$c = \frac{A}{L \cdot \epsilon} \quad (4.2)$$

Dabei ist L die optische Weglänge, A die Absorbanz und ϵ Extinktionskoeffizient. Der NanoDrop One normieren die Weglänge auf 10,0 mm [19]. Für die Konzentrationsbestimmung der DNA muss die Absorption der Fluorophore bei 260 nm beachtet werden. Dafür wurde der Korrekturfaktor CF_{260} verwendet (Gleichung (4.3)).

$$c_{\text{DNA}} = \frac{A_{260} - (A_{\text{Cy3/Cy5}} \cdot CF_{260})}{\epsilon_{\text{DNA}}} \quad (4.3)$$

Die Bestimmung der Konzentration der Farbstoffe wurde mit Gleichung (4.4) berechnet werden.

$$c_{\text{Cy3/Cy5}} = \frac{A_{\text{Cy3/Cy5}}}{\epsilon_{\text{Cy3/Cy5}}} \quad (4.4)$$

Mit dem in Gleichungen (4.3) und (4.4) bestimmten Konzentrationen, kann der Markierungsgrad der DNA bestimmt werden Gleichung (4.5) [20].

$$\frac{c_{\text{Cy3/Cy5}}}{c_{\text{DNA}}} = \frac{A_{\text{Cy3/Cy5}}}{\epsilon_{\text{Cy3/Cy5}} \cdot c_{\text{DNA}}} \quad (4.5)$$

4.5 Herstellung von Lösungen und Puffern

Für die Herstellung der 5 M NaOH-Lösung wurden 20,00 g NaOH, entsprechen der M_w von 40,00 g/mol abgewogen und in 100 ml diH₂O gelöst. Für die 5 M KOH Lösung wurden 28,06 g KOH, entsprechen der M_w von 56,11 g/mol in 100 ml diH₂O gelöst.

Für die Herstellung der 1 M NaCl-Lösung wurde zuerst 2,92 g NaCl, entsprechen der M_w von 58,44 g/mol abgewogen und in 50 ml diH₂O gelöst. Für die 1 M KCl Lösung wurden 3,73 g KCl, entsprechen der M_w von 74,56 g/mol in 50 ml diH₂O gelöst. Anschließend wurden die hergestellten Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm).

Für die jeweiligen Messungen wurden die Lösungen auf die jeweils benötigte Konzentration verdünnt. Die Verhältnisse für die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Verdünnungsschema für die verwendeten KCl- und NaCl-Lösungen. Die Ausgangskonzentration ist die Stammlösung mit 1 M.

Konzentration	500 mM	250 mM	100 mM
$V_{\text{Ausgangslösung}}$	5,0 ml	2,5 ml	1,0 ml
$V_{\text{ddH}_2\text{O}}$	5,0 ml	7,5 ml	9,0 ml
V_{ges}	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml

Für die Herstellung des HEPES-Puffers wurden 23,83 g HEPES abgewogen und in 70 ml diH₂O gelöst. Für die Einstellung des pH-Werts wurde schrittweise KOH bzw. NaOH hinzugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 7,40 hat. Danach wurde die Probe auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt und sterilfiltriert, mit einer Porengröße von 0,2 µm.

Für die Herstellung des MOPS-Puffers wurden 23,83 g MOPS abgewogen und in 25 ml diH₂O gelöst. Für die Einstellung des pH-Werts wurde schrittweise KOH bzw. NaOH hinzugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 6,50 hatte. Danach wurde die Probe auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und sterilfiltriert, mit einer Porengröße von 0,2 µm.

Für die Herstellung des TRIS HCl-Puffers wurden 23,83 g TRIS HCl abgewogen und in 25 ml diH₂O gelöst. Für die Einstellung des pH-Werts wurde schrittweise KOH bzw. NaOH hinzugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 8,50 hatte. Danach wurde die Probe auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und sterilfiltriert, mit einer Porengröße von 0,2 µm. Aus den jeweiligen Stammlösungen wurden dann die benötigten Konzentrationen verdünnt. Für die jeweilige Puffer-Titration wurde die jeweiligen Konzentrationen hergestellt. Die jeweiligen Verdünnungsschritte sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Darstellung der jeweiligen Verdünnungsschritte für die jeweiligen Puffer

Konzentration	200 mM	100 mM	10 mM	1 mM
$V_{\text{Ausgangslösung}}$	2 ml	1 ml	1 ml	1 ml
$c_{\text{Ausgangslösung}}$	1 M	1 M	100 mM	10 mM
$V_{\text{ddH}_2\text{O}}$	8 ml	9 ml	9 ml	9 ml
V_{ges}	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Durch die Zugabe von KOH bzw. NaOH, befindet sich bereits ein Metallionen hintergrund im Puffer. Das muss bei den folgenden Messungen beachtet werden. Um den Metallionen hintergrund zu bestimmen, kann die Henderson-Hasselbalch Gleichung (2.5) verwendet werden. In Gleichung (4.6) ist dies beispielhaft für eine Probe, mit einem HEPES-Puffer-Hintergrund von 20 mM berechnet.

$$c(\text{K}^+) = 10^{(7,40-7,48)} \cdot 20 \text{ mM} = 16,34 \text{ mM}. \quad (4.6)$$

In den Tabellen A.2 bis A.4 sind die jeweiligen Pufferhintergründe, der jeweiligen Proben aufgelistet. In Tabelle 4.3 sind die jeweiligen pK_S und Molaren Massen der Puffer aufgelistet.

Tabelle 4.3: Auflistung der pK_S bei 25 °C und der Molaren Masse der Puffer HEPES, MOPS und TRIS HCl [21]

	pK_S (25 °C)	M in $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
HEPES	7,48	239,3
MOPS	7,14	209,3
TRIS HCl	8,06	157,6

Die jeweiligen Molaren Massen (M_w) für die Puffer und Lösungen wurden den Verpackungen der Chemikalien entnommen.

4.6 Pipettierschema

Alle zu messenden Proben enthielten eine DNA Konzentration von 0,5 μM in einem Endvolumen von 100 μl . Die entsprechenden Konzentrationen der Puffer und Metallionen, sowie alle anderen Konzentrationen sind im Detail in Tabellen A.2 bis A.4 aufgelistet. Zuerst wurden diH_2O und der jeweilige Puffer vermischt und je nach Probe noch K(I) bzw. Na(I) hinzugegeben. Anschließend wurden diese mit dem Vortexer gemischt und in die 96-Well-Platte pipettiert. Die DNA wird für 2 Minuten bei 70 °C im ThermoShaker erhitzt und anschließend direkt in die jeweiligen Wells der 96-Well-Platte pipettiert.

4.7 Charakterisierung des Spektrometers

4.7.1 Allgemeine Information

Für die Fluoreszenz-emissionsmessung wurde der SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader von der Firma MolecularDevices verwendet. Der iD5 ist ein Multi-Mode Spektrometer. In dieser Arbeit wurde *Fluorescence Intensity Read Mode* und der *Endpoint read type* für die FRET-Messung und für

die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren der *Spectrum read type*. Die Fluoreszenzemission wird in der Einheit relative fluorescence units (RFU) gemessen [22].

Abbildung 4.2 zeigt den Versuchsplatz mit dem Spektrometer.

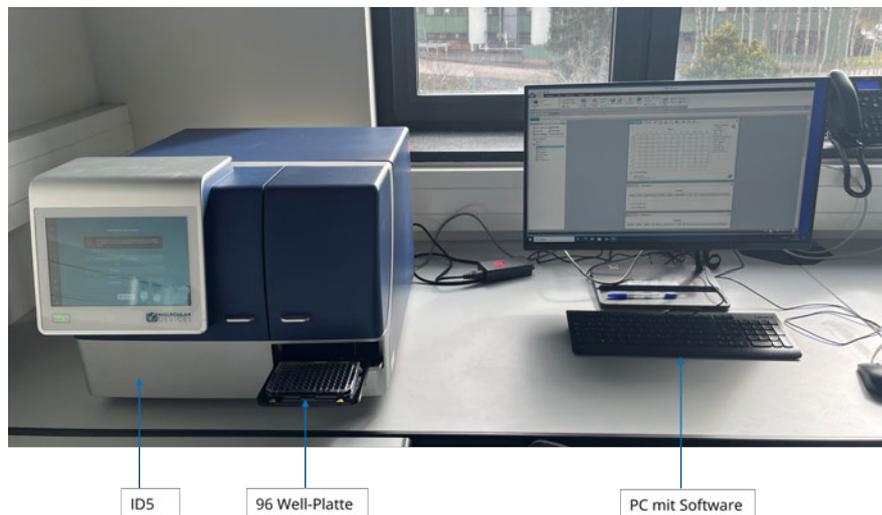


Abbildung 4.2: Versuchsplatz mit SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader und Computer mit der Software „SoftMax Pro“

4.7.2 Technische Daten

Der iD5 kann in einem Wellenlängenbereich von 250 nm bis 830 nm anregen. Die Anregung hat eine Bandbreite von 15 nm. Der Wellenlängenbereich für die Emissionsmessung geht von 270 nm bis 850 nm, mit einer Bandbreite von 25 nm. Die Wellenlängen können in 1 nm Schritte gewählt werden. Der Wellenlängenabstand zwischen Anregung und Emission muss mindestens 20 nm betragen. Für die Wellenlänge Selektion wird ein Monochromator verwendet. Weiterhin können Filter verwendet werden. Die Filter können als Anregungs- oder Emissionsfilter eingesetzt werden. In Tabelle 4.4 sind die vorhandenen Filter für den iD5 aufgelistet. Diese wurden für die Messung nicht verwendet, da die Verwendung des Monochromators genauer war.

Der iD5 hat zwei Detektoren, eine Silizium-Photodiode und eine ultra-gekühlte Photomultiplier-Röhre / Photomultiplier Tube (PMT). Die Photodiode wird für "*bottom read*" verwendet, wie zum Beispiel für Absorptionmessungen, bei welchen das Signal unterhalb der Platte gemessen wird. Die PMT wird für die "*top read*" Messungen verwendet [22].

Tabelle 4.4: Fluoreszenzfilter für den SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader

Artikelnummer	Wellenlänge	Bandbreite
6590-0099	535 nm	25 nm
6590-0105	595 nm	35 nm
6590-0123	660 nm	40 nm

In Abbildung 4.3 ist ein möglicher Fluoreszenzemissionsstrahlengang dargestellt.

Die Anregung erfolgt mit einer Hochleistung-Xenon-Blitzlampe. Der Anregungsstrahl trifft auf einen Monochromator, welcher die erforderliche Wellenlänge einstellt, indem der Strahl aufgespalten wird.

Dieser geht durch die Spaltblende. Durch den *Excitationfilter* können unerwünschte Wellenlängen gefiltert werden, die durch möglichen Beugungsreaktionen an der Spaltblende entstehen. Durch einen teiltransparenten Spiegel wird der Strahl auf die 96-Well-Platte geleitet. In der 96-Well-Platte befindet sich die zu messende Probe. Der emittierte Strahl geht durch den transparenten Spiegel und wird dann an einem weiteren Spiegel reflektiert. Durch den Emissionsfilter werden mögliche Hintergrundsignale gefiltert. Das Signal wird dann am PMT detektiert.

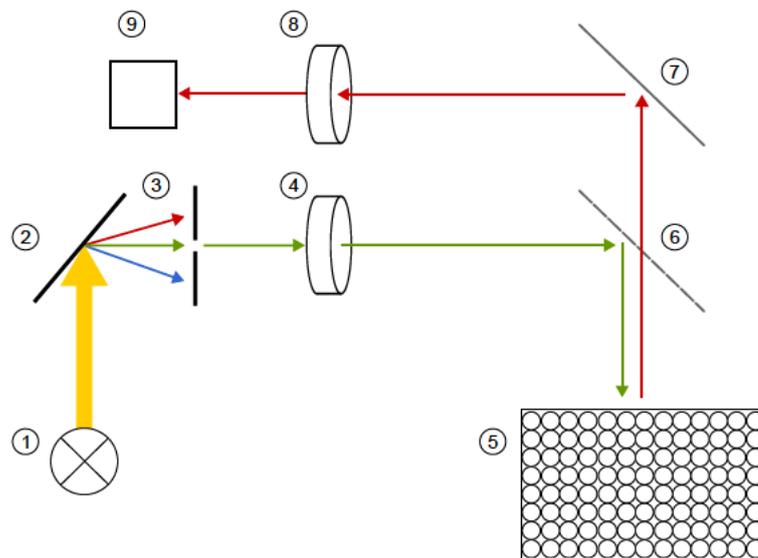


Abbildung 4.3: Darstellung eines Fluoreszenzstrahlengangs. (1 - Hochleistung-Xenon-Blitzlampe, 2 - Monochromator, 3 - Spaltblende, 4 - Excitationfilter, 5 - 96-Well-Platte, 6 - teiltransparenten Spiegel, 7 - Spiegel, 8 - Emissionsfilter, 9 - PMT)

4.8 Messbedingungen

Neben den zu messenden Proben wurde immer ein Blank gemessen. Der Blankwert wurde für die Korrektur des Hintergrundsignals verwendet. Hierbei wurde dH_2O gemessen. Weiterhin wurde die Farbstoffe Cy3 und Cy5 genutzt. Diese sind in dH_2O gelöst und haben eine Konzentration von 10 nM.

Für die Aufnahmen der Fluoreszenzemissionsspektren ist der *Fluorescence Intensity Read Mode* mit dem *Spectrum read type* verwendet worden. Cy3 wurde bei einer Wellenlänge von 505 nm angeregt und das Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 545 nm bis 650 nm in 5 nm Schritten gemessen. Das Spektrum von Cy5 wurde in einem Wellenlängenbereich von 640 nm - 750 nm, in 5 nm Schritten, bei einer Anregung von 600 nm gemessen.

Für die FRET Messungen kann am Spektrometer der *FRET read Mode* eingestellt werden. Darin werden die Wellenlängenpaare für Donor-Anregung/Donor-Emission und Donor-Anregung/Akzeptor-Emission eingestellt/gemessen. In dieser Einstellung kann aber kein Signal für Akzeptor-Anregung/Akzeptor-Emission gemessen werden. Dieser Wert wird allerdings später für die Korrektur der FRET-Werte benötigt (siehe Abschnitt 4.10). Daher wurden die FRET Messungen als *Fluorescence Intensity Endpoint* Messungen durchgeführt. Dabei werden die oben genannten Wellenlängenpaare als Messparameter eingestellt. Die Donor-Anregung ist bei 535 nm, die Donor-Emission bei 595 nm, Akzeptor-Anregung bei 630 nm und Akzeptor-Emission bei 670 nm. Weiterhin soll die Temperaturabhängigkeit des DNA Hairpin dargestellt werden. Dafür wurde die oben beschriebene Messung bei

verschiedenen Temperaturen (zwischen 21 °C und 65 °C) vorgenommen. Die Temperatur wurde dabei immer um 5 °C erhöht. Zwischen jedem Heizschritt und der Messung wurde eine Inkubationszeit von 2 Minuten eingestellt. Außerdem soll das Experiment bei verschiedenen Puffer und pH-Werten durchgeführt werden. Dafür werden unterschiedliche Puffer, mit verschiedenen pH-Werten verwendet. Diese sind HEPES mit einem pH von 7,4, MOPS mit einem pH von 6,5 und TRIS HCl mit einem pH von 8,5.

4.9 Bleed-through und direct excitation

Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge sollte so gewählt werden, dass jeweils nur ein Farbstoff angeregt und gemessen wird. Meist ist diese nicht möglich, sodass bei der Donormessung ein Anteil von Akzeptorsignal mitgemessen werden und umgekehrt. Die Detektion eines Photon im falschen Kanal wird auch als *Crosstalk* bezeichnet. Um dies aus den Messungen zu entfernen, werden zum einen der Knaalüberlappung/*bleed-through* (*bt*) und die direkte Anregung (*direct excitation* (*dE*)) bestimmt und damit die Messwerte korrigiert. Der *bleed-through* des Donors wird definiert als das Donor-Signal, welches bei der Akzeptor-Emission mit detektiert wird. Der *bleed-through* des Akzeptors ist das Verhältnis zwischen Akzeptor-Anregung und Donor-Emission. Der *bleed-through* für den Akzeptor ist Null, da die Intensität bei der Akzeptor-Anregung im Donor Kanal Null ist (Gleichung (4.7)).

$$bt_D = \frac{I_{D,ex}^{A,em}}{I_{D,ex}^{D,em}} \quad bt_A = \frac{I_{A,ex}^{D,em}}{I_{A,ex}^{A,em}} \quad (4.7)$$

Die *direct excitation* des Akzeptors gibt an, wie stark der Akzeptor durch die Donor Anregung mit angeregt wird. Die *dE* des Donor ist das Verhältnis zwischen gemessenen Akzeptorsignal im Donorkanal und gemessenem Donorsignal im Donorkanal. Die *direct excitation* für den Donor ist Null, da die Intensität bei der Akzeptor-Anregung und Donor-Emission Null ist (Gleichung (4.8)) [23].

$$dE_D = \frac{I_{A,ex}^{D,em}}{I_{D,ex}^{D,em}} \quad dE_A = \frac{I_{D,ex}^{A,em}}{I_{A,ex}^{A,em}} \quad (4.8)$$

Für die Bestimmung des *bleed-through* bzw. der *direct excitation*, wurden die reinen Farbstoffe, gelöst in diH₂O gemessen.

4.10 Korrektur der Messdaten

Für die Berechnung von FRET wurden die gemessenen Werte korrigiert. Insgesamt müssen drei Korrekturen vorgenommen werden. Zum einen muss das Hintergrundsignal/*background* (*bg*) von den Messwerten abgezogen werden. Diese werden mit Hilfe des Blanks in diesen Fall diH₂O bestimmt. Aus den ermittelten Werten wird der Mittelwert gebildet und dann von den eigentlichen Messwerten subtrahiert (Gleichung (4.9)).

$$I_{D,ex}^{D,em} = I_{D,ex}^{D,em,0} - bg \quad I_{D,ex}^{A,em} = I_{D,ex}^{A,em,0} - bg \quad (4.9)$$

Zur Korrektur des *bleed-through* wurde dieser mit der Intensität des Akzeptors bei Donor-Anregung multipliziert und dann von der Intensität des Donor bei Donor-Anregung subtrahiert. Die Intensität des Donor bei Donor-Anregung bleibt gleich, da der *bleed-through* für den Akzeptor

Null ist (Gleichung (4.10)).

$$\begin{aligned} I_{D,ex}^{\prime D,em} &= I_{D,ex}^{D,em} - bt_A \cdot I_{D,ex}^{A,em} & I_{D,ex}^{\prime A,em} &= I_{D,ex}^{A,em} - bt_D \cdot I_{A,ex}^{A,em} \\ I_{D,ex}^{D,em} &= I_{D,ex}^{D,em} \end{aligned} \quad (4.10)$$

Die *direct excitation* des Akzeptors wird mit der Intensität des Akzeptors bei Akzeptor-Anregung multipliziert und dann von der Intensität des Akzeptors von Donor-Anregung subtrahiert.

Die Intensität des Donor bei Donor-Anregung wird hier nicht weiter korrigiert, dass die *direct excitation* des Donor Null ist (Gleichung (4.11)) [23].

$$\begin{aligned} I_{D,ex}^{\prime\prime D,em} &= I_{D,ex}^{\prime D,em} - dE_D \cdot I_{A,ex}^{D,em} & I_{D,ex}^{\prime\prime A,em} &= I_{D,ex}^{\prime A,em} - dE_A \cdot I_{A,ex}^{A,em} \\ I_{D,ex}^{\prime\prime D,em} &= I_{D,ex}^{\prime D,em} \end{aligned} \quad (4.11)$$

Mit den korrigierten Werten kann nun FRET berechnet werden (Gleichung (4.12)). Der berechnete FRET-Wert kann anschließend verwendet werden, um den Abstand der Fluorophore zu berechnen (Gleichung (2.10))[2].

$$FRET = \frac{I_{D,ex}^{\prime\prime A,em}}{I_{D,ex}^{\prime\prime D,em} + I_{D,ex}^{\prime\prime A,em}} \quad (4.12)$$

4.11 Datenanalyse durch Hill-Funktion

Die Hill-Funktion (Gleichung (4.13)) wurde eingeführt, um das Verhalten von Rezeptor-Liganden-Bindungen zu beschreiben. Dabei gibt der Hill-Koeffizient (n) den Anstieg der Funktion an, L die Ligandenkonzentration, K_D ist die Dissoziationskonstante und θ gibt den Anteil der gebundenen Rezeptor-Liganden an. Der Wendepunkt der Funktion gibt Ligandenkonzentration mit halber Besetzung / *ligand concentration producing half occupation* (k_A) an und kann mit Gleichung (4.14) bestimmt werden [24, 25]. In Abbildung 4.4 ist die Hill-Funktion dargestellt.

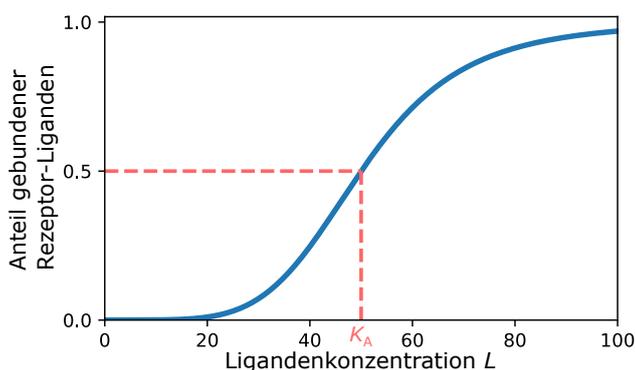


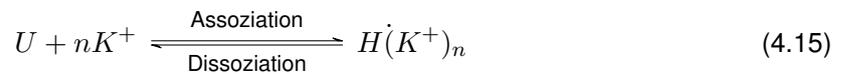
Abbildung 4.4: Hill-Funktion mit ein n von 5 und k_A von 50.

$$\theta = \frac{[L]^n}{K_D + [L]^n} \quad (4.13)$$

$$K_D = K_A^n \quad (4.14)$$

Das Verhalten des zu untersuchenden *Hairpins* mit Metallionen ähnelt der Liganden-Rezeptor-Bindung, wobei die DNA der Rezeptor für die Metallionen (Liganden) ist. Die Bildung des *Hairpins* wird mittels FRET gemessen. Dabei zeigen hohe FRET-Werte die Bildung des *Hairpin* (H) und geringe FRET-Werte zeigen den ungebundenen Zustand (U). Die Reaktion mit zwei Zuständen kann

über die Gleichung (4.15) beschrieben werden. Es ist zu erwarten, dass durch die Zugabe von monovalenten Metallionen es zur Änderung des FRET-Wertes und damit zur Bildung des *Hairpins* kommt.



Diese Zustandsänderung wird von Gerhardy et. al. [3] mittels einer Hill-Funktion beschrieben. Für die Herleitung von der Hill-Funktion für die Zustandsänderung wird Dissoziationskonstante (K_D) mit der Gleichgewichtskonstante / *equilibrium constant* (k_{eq}) gleich gesetzt. Die dazugehörige k_{eq} für die Metallionen ist in Gleichung (4.16) beschrieben.

$$k_{eq,K^+} = \frac{[U][K^+]^n}{[H \cdot [K^+]_n]} \quad (4.16)$$

Daraus lässt sich die Hill Funktion bilden (Gleichung (4.17)).

$$f_H([K^+]) = \frac{[K^+]^n}{k_{eq,K^+} + [K^+]^n} \quad (4.17)$$

Die Funktion f_H stellt dabei den Anteil des Zustandes H dar, also den gebildeten *Hairpin*. Dabei ist n der zugehörige Hill-Koeffizient und k_{eq} die Gleichgewichtskonstante. Weithin soll die Änderung FRET von einem geringen zu einem höheren FRET dargestellt werden. Dadurch ergibt sich die folgende Funktion (Gleichung (4.18)) [3].

$$FRET = FRET_{\min} + (FRET_{\max} - FRET_{\min}) \cdot \frac{[K^+]^n}{k_{eq} + [K^+]^n} \quad (4.18)$$

Mit der bestimmten Gleichgewichtskonstante und dem Hill-Koeffizienten kann die k_A bestimmt werden [3].

$$k_A = \sqrt[n]{k_{eq}} \quad (4.19)$$

4.12 FRET Vorhersage mittels Accesible contact Volumen

Um FRET vor den Experimenten abschätzen zu können, wurde mithilfe von PyMOL und FRETraj das Volumen berechnet, indem sich die Fluorophore an den Markierungspositionen befinden können (accessible contact volume (ACV)), um dann eine mittlere Distanz sowie FRET zwischen zwei ACV's zu bestimmen. Untersucht wurden zwei Strukturmodelle des *Hairpins* im gefalteten und ungefalteten Zustand. Die Strukturmodelle wurden von Felix Erichson zur Verfügung gestellt. Die Atome an denen die ACV bestimmt wurden sind für Cy5 DC38-O3' also 3' Ende der DNA. Für Cy3 wurde eine Labeleingposition bestimmt bei DT4-C4 und eine weitere bei DT14-C4. Für die mittleren FRET und Distanzwerte wurden jeweils 1000000 Distanzen zwischen den ACV berechnet. Für die Berechnung des FRET Wertes wurde ein R_0 von 5,4 nm verwendet. Die Interaktion der Farbstoffe mit der DNA wurde mit einem Kontaktvolumenanteil von 0,25 für beide Farbstoffe angenommen. Die Parametrisierung der ACV wurde anhand der Literatur für die Farbstoffe vorgenommen [26].

In Abbildung 4.5 ist das mittels PyMOL und FRETraj erstellt DNA Model dargestellt. Unter (a) ist eine

ungefaltete einzelsträngige B DNA Helix dargestellt, mit der Fluorephoren Cy3 und Cy5. Unter (b) ist die gefaltete doppelsträngige DNA dargestellt, mit den jeweiligen Fluorophoren. Cy5 ist am 3'-Ende markiert und Cy3 jeweils an einem Thymin an 4. und 14. Position.

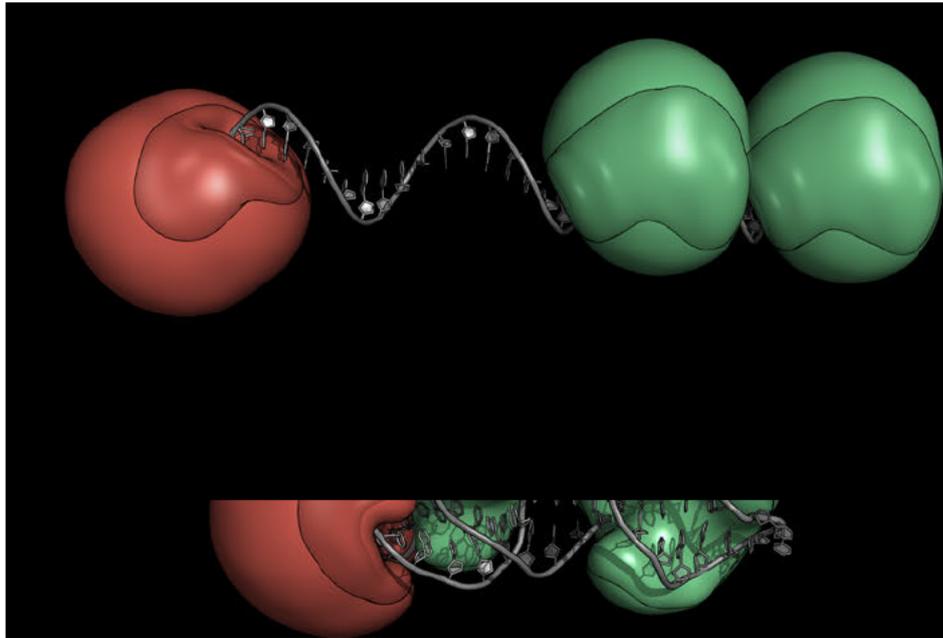


Abbildung 4.5: Darstellung der DNA mit ACV der Farbstoffe. a: ssDNA in Form einer B-Helix mit den Fluorophore Cy3 und Cy5. b: dsDNA mit den jeweiligen Fluorophore.

In Tabelle 4.5 sind die mittleren theoretische bestimmten FRET-Wert für die zwei Fluorophorpaare aufgelistet.

Tabelle 4.5: Mittlerer theoretischer FRET-Werte für die beiden DNA-Proben im gefaltetem und ungefaltetem.

	DNA T4	DNA T14
ungefaltet	0,01	0,11
gefaltet	0,97	0,45

5 Ergebnisse

5.1 Qualitätskontrolle der DNA

Mittels NanoDrop One wurde für die entsalzte DNA ein β von $1485,81 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ bestimmt. Damit ergibt sich eine Konzentration von $115,7 \pm 2,31 \text{ }\mu\text{M}$. Der Fehler von β liegt bei Proben mit einem β größer $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ bei 2 %.

In Tabelle 5.1 sind die Mittelwerte der Absorptionsmessung mit der Standardabweichung für die Reinheitsbestimmung der DNA aufgelistet.

Tabelle 5.1: Mittlere Absorbanz der DNA Sequenz T4 bei verschiedenen Wellenlängen.

λ	260 nm	230 nm	280 nm	555 nm	646 nm
Abs	$0,35 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$

In Tabelle 5.2 sind die Verhältnisse von A260/280 und A260/230 aufgelistet. Die jeweiligen Fehler wurden mittels Fehlerfortpflanzung bestimmt.

Tabelle 5.2: Verhältnisse der Wellenlängen.

A260/280	A260/230
$1,81 \pm 0,16$	$3,09 \pm 0,51$

In Tabelle 5.3 sind die mit Gleichungen (4.3) und (4.4) berechneten Konzentrationen der DNA T4 Probe und der Farbstoffe Cy3 und Cy5 und den mittels Gleichung (4.5) bestimmten Labelgrad aufgelistet.

Tabelle 5.3: Konzentration der DNA T4 Probe und Farbstoffe Cy3 und Cy5 und den daraus resultierenden Labelgrad der Farbstoffe an die DNA.

	Cy3	Cy5
c(DNA) in μM	$0,853 \pm 0,026$	$0,849 \pm 0,026$
c(Farbstoff) in μM	$0,76 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,07$
Labelgrad	$0,89 \pm 0,15$	$0,96 \pm 0,11$
Labelgrad in %	89 ± 15	96 ± 11

In Abbildung 5.1 ist das UV/Vis Spektrum der DNA T4 Probe in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 850 nm dargestellt. Das Spektrum wurde mit dem NanoDrop One aufgenommen. Es sind drei Absorptionsmaxima zu erkennen. Diese liegen bei 260 nm für die DNA, bei 555 nm für Cy3 und bei 646 nm für Cy5.

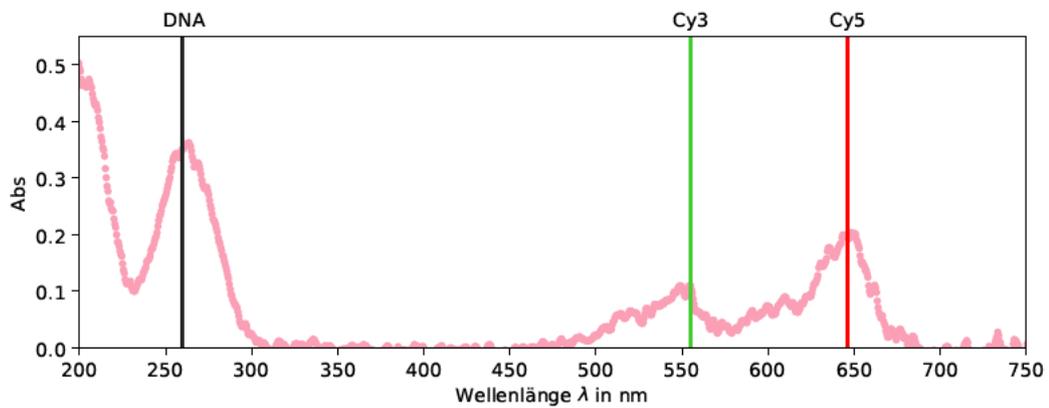


Abbildung 5.1: UV/VIS-Spektrum der DNA T4 Probe in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 750 nm. Die Konzentration der DNA war 1 μM und war in diH_2O gelöst. Es wurde in einem Messintervall von 0,5 nm gemessen.

In Abbildung 5.2 sind Fluoreszenzemissionsspektren der DNA T4 Probe für die Anregung von Cy3 (a) und Cy5 (b) aus der K(I) Titration dargestellt. Die Fluoreszenzemissionsspektren von Cy3 wurden in einen Wellenlängenbereich von 545 nm bis 650 nm gemessen und für Cy5 in einen Wellenlängenbereich von 640 nm bis 750 nm. Das Fluoreszenzmaximum für Cy3 liegt bei 565 nm und für Cy5 bei 665 nm. Bei der Anregung von Cy3 ist zu erkennen, dass mit zunehmender K(I) Konzentration die Fluoreszenzintensität abnimmt. Die Fluoreszenzintensität bei Cy3 ist für die K(I)-Konzentrationen 0,00 mM und 0,08 mM deutlich höher, als bei höheren K(I)-Konzentrationen. Bei der Anregung von Cy5 ist zu erkennen, dass mit steigender K(I) Konzentration die Intensität abnimmt und sich bei einer Intensität von $1,5 \cdot 10^7$ einpendelt. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzmaximums in Abhängigkeit der K(I) Konzentration ist im jeweiligen Diagramm oben rechts dargestellt. Im Vergleich der beiden Diagramme ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität von Cy3 kleiner ist als die von Cy5.

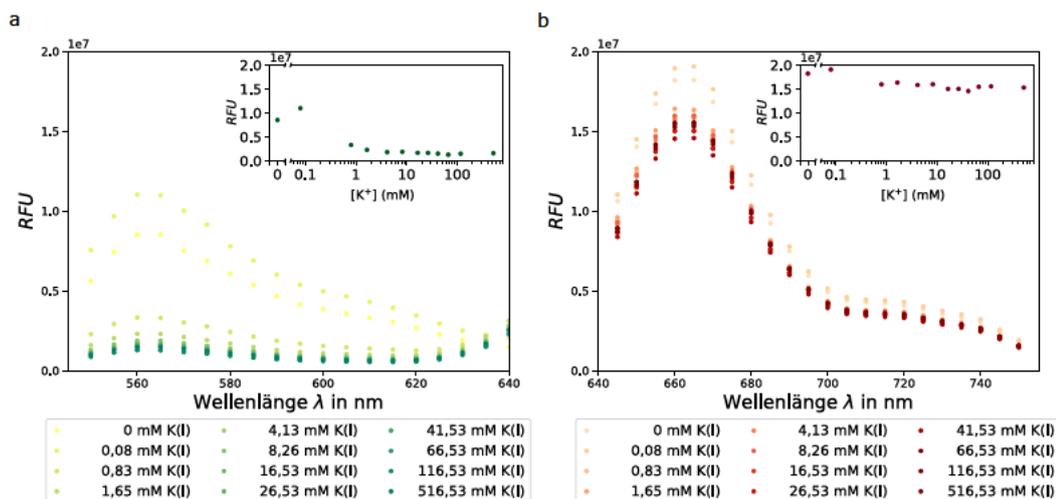


Abbildung 5.2: Fluoreszenzemissionsspektren von der an der DNA markierten Fluorophore. Der hinzugegebene Puffer ist TRIS HCl mit einem pH von 8,5. a: RUF in Abhängigkeit der Wellenlänge von Cy3 bei verschiedenen K(I) Konzentrationen im Wellenlängenbereich von 545 bis 650 nm, gemessen in 5 nm Intervallen, bei einer Anregung von 505 nm. b: RUF in Abhängigkeit der Wellenlänge von Cy5 bei verschiedenen K(I) Konzentrationen im Wellenlängenbereich von 640 bis 750 nm, gemessen in 5 nm Intervallen, bei einer Anregung von 600 nm.

In Abbildung 5.3 sind Fluoreszenzemissionsspektren der DNA T4 Probe für die Anregung von Cy3 (a) und Cy5 (b) bei einer Na(I) Titration dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensitäten für beide Farbstoffe mit steigender Ionenkonzentration abnimmt. Auch im Fluoreszenzspektrum von Cy3 ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzspektren bei den K(I)-Konzentrationen von 0,00 mM und 0,08 mM deutlich größere Intensitäten hat, als bei höheren K(I)-Konzentrationen.

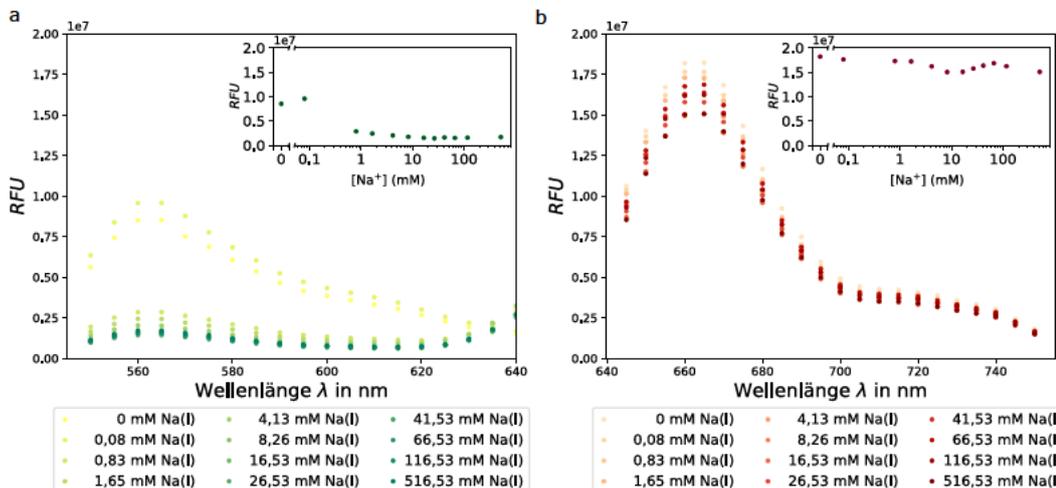


Abbildung 5.3: Fluoreszenzemissionsspektren von der an der DNA T4 markierten Fluorophore. Der hinzugegebene Puffer ist TRIS HCl mit einem pH von 8,5. a: RUF in Abhängigkeit der Wellenlänge von Cy3 bei verschiedenen Na(I) Konzentrationen im Wellenlängenbereich von 545 bis 650 nm, gemessen in 5 nm Intervallen, bei einer Anregung von 505 nm. b: RFU in Abhängigkeit der Wellenlänge von Cy5 bei verschiedenen Na(I) Konzentrationen im Wellenlängenbereich von 640 bis 750 nm, gemessen in 5 nm Intervallen, bei einer Anregung von 600 nm.

5.2 Korrekturmatrix für Cy3 und Cy5

In Tabellen 5.4 und 5.5 ist die jeweilige Korrekturmatrix mit den entsprechenden Emissionswerten der Farbstoffe für Cy3 und Cy5 dargestellt.

Tabelle 5.4: Korrekturmatrix für Cy3

	em λ Donor	em λ Akzeptor
ex λ Donor	102963	9814
ex λ Akzeptor	0	240

Tabelle 5.5: Korrekturmatrix für Cy5

	em λ Donor	em λ Akzeptor
ex λ Donor	693	3172
ex λ Akzeptor	0	61581

Mit Hilfe der Korrekturmatriizen kann der bt des Donors und die dE des Akzeptors berechnet werden (Gleichungen (4.7) und (4.8)).

$$bt_D = 0,09532$$

$$dE_A = 0,05151$$

Mit der Berechnung des bt und dE kann die Korrektur der Messwerte vorgenommen werden und FRET berechnet werden (Gleichungen (4.9) bis (4.12)). Die berechneten FRET-Werte werden grafisch in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt.

5.3 FRET in Abhängigkeit der Metallionenkonzentration

5.3.1 K(I) bzw. Na(I) Titration für die DNA T14 und DNA T4

In den folgenden Abbildungen ist FRET in Abhängigkeit der K(I)- bzw. Na(I)-Konzentration der beiden DNA-Proben dargestellt. Der pH-Wert wird durch einen HEPES-Puffer stabilisiert.

In Abbildung 5.4 ist die Abhängigkeit der Na(I) Konzentration von FRET, für die DNA T14 dargestellt. Diese wurde in einem Temperaturbereich von 24,5 °C bis 65 °C dargestellt. Der pH-Wert des HEPES-Puffers betrug 7,4. Es ist mit zunehmender Na(I) Konzentration ein Anstieg von FRET zu erkennen, bis zu einer Konzentration von 66,64 mM. Ab einer Konzentration von 91,64 mM sinkt der FRET-Wert. Weiterhin ist zu erkennen, dass mit steigender Temperatur FRET abnimmt.

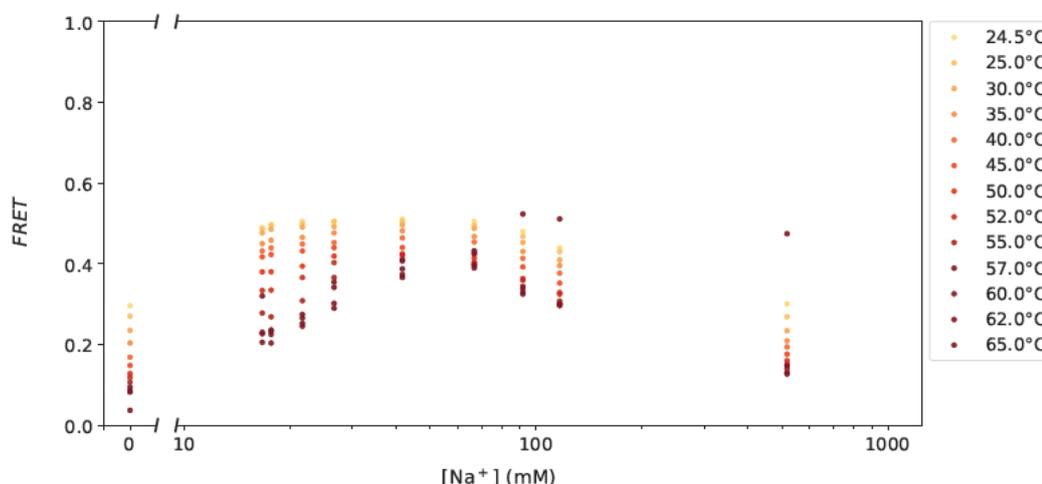


Abbildung 5.4: FRET in Abhängigkeit der Na(I) Konzentration in einem Temperaturbereich von 24,5 °C bis 65 °C für die DNA T14. Der pH-Wert des HEPES-Puffers betrug 7,4.

In Abbildung 5.5 ist die Abhängigkeit der K(I) Konzentration von FRET, für die DNA T14 Probe dargestellt. Im Vergleich zur Na(I) Titration ist kein großer Unterschied zu erkennen.

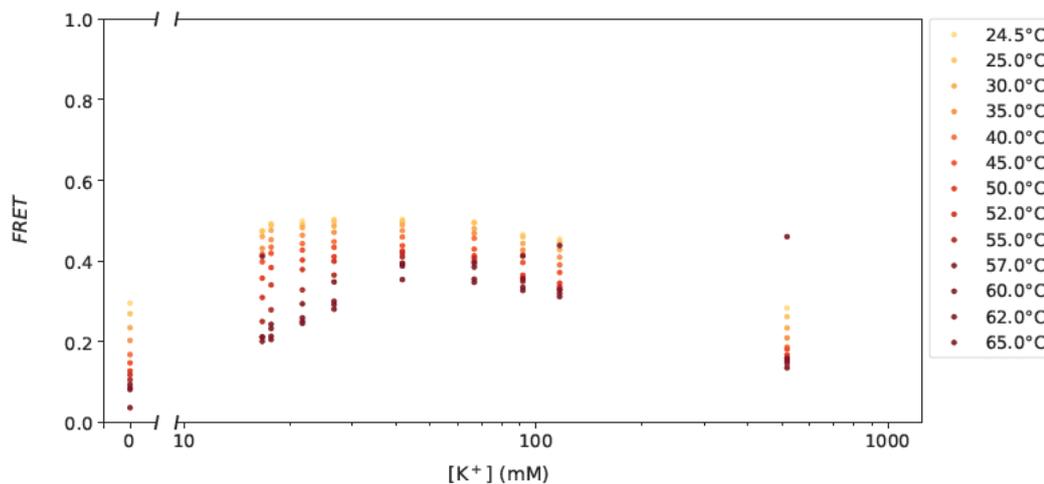


Abbildung 5.5: FRET in Abhängigkeit der $K(I)$ Konzentration in einem Temperaturbereich von 24,5 °C bis 65 °C für die DNA T14. Der pH-Wert des HEPES-Puffers betrug 7,4.

Für die Metallionen Titration von der DNA-Probe T14, war es nicht möglich die FRET-Funktion anzupassen. Für weitere Experimente wurde die DNA T4 Probe verwendet. In Abbildung 5.6 ist FRET in Abhängigkeit der $K(I)$ Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21 °C bis 65 °C dargestellt. Der dazugehörige Puffer ist HEPES. Der pH-Wert wurde mit KOH eingestellt und beträgt 7,4. Ohne Zugabe von $K(I)$ liegt der FRET-Wert bei ca. 0,03. Durch die Zugabe von 0,08 mM $K(I)$ konnte keine Änderung der FRET-Werte im Vergleich zu 0 mM beobachtet werden. Erst ab einer $K(I)$ -Konzentration von 0,83 mM steigen die FRET-Werte an. Der FRET-Wert bei 0,08 mM ist 0,04 (25 °C), wohingegen der FRET-Wert der 0,83 mM Probe bei 0,24 (25 °C) liegt. Wird die $K(I)$ -Konzentration weiter erhöht, steigen die FRET-Werte weiter an. Bei einer Konzentration von 4,14 mM $K(I)$ ist bei Raumtemperatur (25 °C) ein FRET-Wert von 0,85 erreicht und steigt durch die weite Zugabe von $K(I)$ auf 0,87 an. Durch die Temperaturerhöhung steigen die FRET-Werte es mit zunehmender $K(I)$ -Konzentration an. Ab einer Konzentration von 116,64 mM sind für alle Temperaturbereiche der maximale FRET-Wert erreicht. Diese liegen zwischen 0,8 bis 0,87. Es ist zu erkennen, dass der FRET-wert bei hohen Konzentrationen Temperaturstabil ist. Für die einzelnen Temperaturen wurden die Hill-Funktion angepasst (Gleichung (4.18)). Es ist zu erkennen, dass ab einer Temperatur von 45 °C die angepasste Funktion von den Messwerten abweicht. Die Regressionsparameter für die Hill-Funktion und deren Fehler für diese Messung sind in Tabelle C.2 aufgelistet.

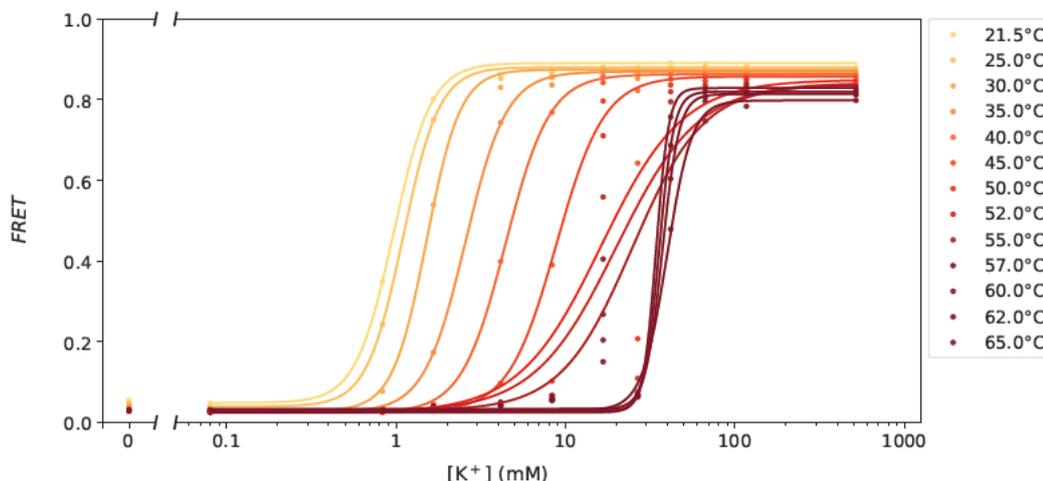


Abbildung 5.6: FRET in Abhängigkeit der K(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der hinzugegebener Puffer ist HEPES mit einem pH von 7,4. Mit angepasster Hill Funktion für die jeweiligen Temperaturen.

In Abbildung 5.7 ist FRET in Abhängigkeit der Na(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21 °C bis 62 °C dargestellt. Der hinzugegebene Puffer ist HEPES. Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt und ist 7,4. Wie in Abbildung 5.6 ist zu erkennen, dass ab eine Na(I) Konzentration von 0,83 mm FRET bei Raumtemperatur auf 0,24 steigt. Bei einer Konzentration von 4,14 mM Na(I) ist bei Raumtemperatur (25 °C) ein FRET-Wert von 0,85 erreicht. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Na(I) Konzentration der FRET-Wert ansteigt. Bei Erhöhung der Temperatur steigt der FRET-Wert erst bei höheren Temperaturen an. Für die Konzentrationen 116,64 mM und 516,64 mM Na(I) ist ein leichtes Abfallen der FRET-Werte zu erkennen. Für die Messwerte wurden für die jeweiligen Temperaturen die Hill-Funktion angepasst. Die Regressionsparameter und deren Fehler sind in Tabelle C.3 aufgelistet.

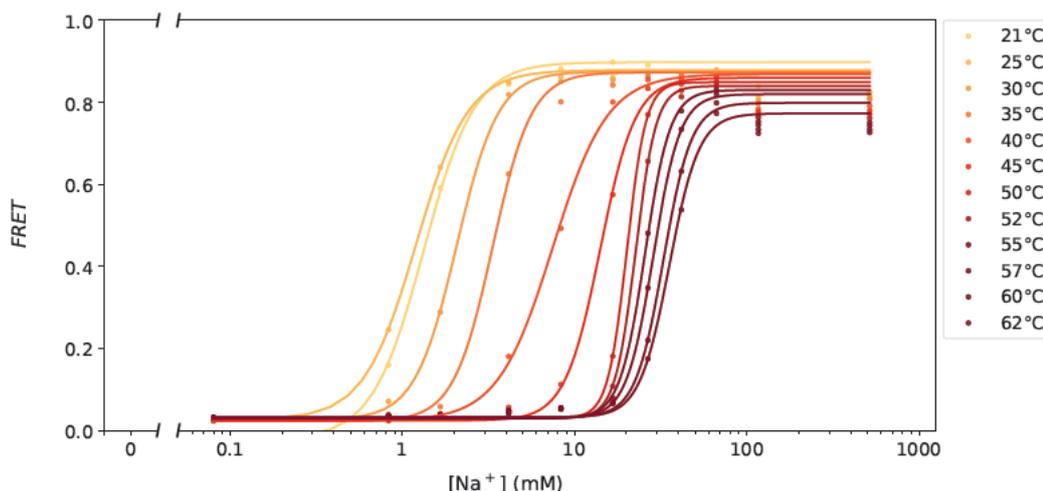


Abbildung 5.7: FRET in Abhängigkeit der Na(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21 °C bis 62 °C, für die DNA T4 Probe. Der hinzugegebener Puffer ist HEPES mit einem pH von 7,4. Mit angepasster Hill Funktion für die Temperaturen 25 °C und 65 °C.

In Abbildung 5.8 sind die Regressionsparameter k_{eq} und n der Hill-Funktion und der aus dem Regressionsparameter bestimmte k_A in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt, für die K(l)- und Na(l)-Titration mit HEPES-Puffer. In a) ist k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur für die K(l)-Titration dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die k_{eq} -Werte mit steigender Temperatur ansteigen. Ab einer Temperatur über 45 °C fallen die Werte leicht ab. In Tabelle C.2 ist zu sehen, dass ab einer Temperatur von 45 °C der Fehler der Regressionsparameter zunimmt. In b) ist n über die Temperatur dargestellt. Das Diagramm zeigt, dass n mit steigender Temperatur relative stabil bleibt. Ab einer Temperatur von 45 °C schwankt n . Die Änderung vom n ist auch in der Abbildung 5.6 zu erkennen, dass sich der Anstieg der Funktionen, ab 45 °C ändert. In Abbildung c) ist k_A in Abhängigkeit der Temperatur für die K(l)-Titration. Mit steigender Temperatur ist ein Anstieg der k_A -Werte zu erkennen. In den Diagrammen d bis e sind k_{eq} , n und k_A in Abhängigkeit der Temperatur der Na(l)-Titration dargestellt. Es ist ein ähnliches Verhalten der Parameter wie bei der K(l)-Titration zu erkennen.

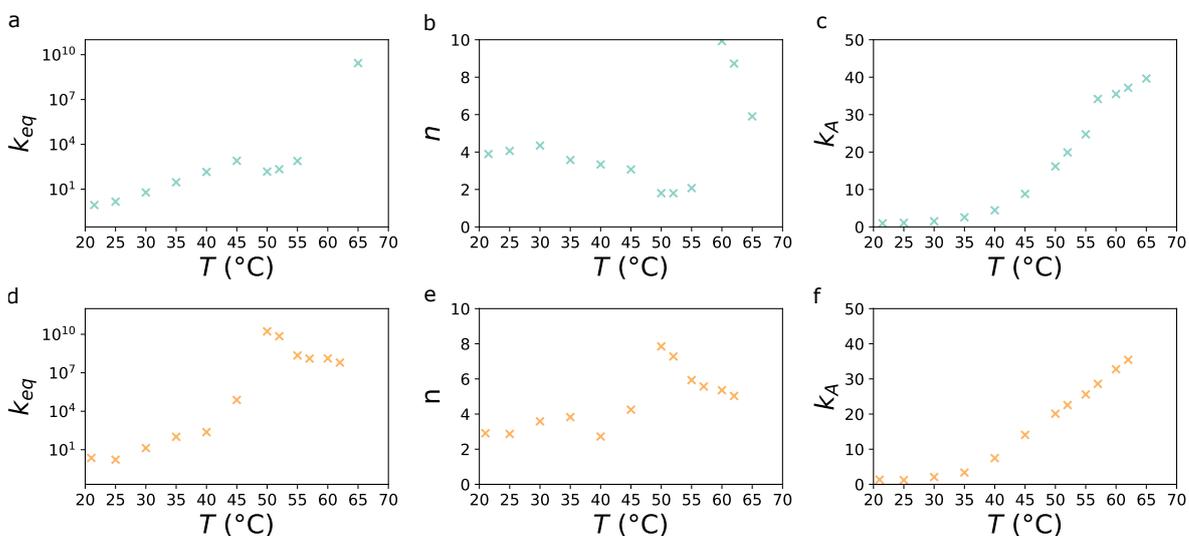


Abbildung 5.8: Darstellung der Regressionsparameter der Hill-Funktion und dem daraus bestimmten k_A mit HEPES Puffer. a: k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(l) Titration. b: n in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(l) Titration. c: k_A in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(l) Titration. d: k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(l). e: n in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(l) Titration. f: k_A in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(l) Titration.

5.3.2 Unterschiedliche Puffer

In den folgenden Abbildungen ist K(l)-Titration in Abhängigkeit von FRET für die MOPS- und TRIS HCl-Puffer dargestellt. In Abbildung 5.9 ist FRET in Abhängigkeit der K(l) Konzentration dargestellt. Der verwendete Puffer ist MOPS mit einem pH von 6,5. Die K(l) Titration wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 mM bis 522,91 mM K(l) und einem Temperaturbereich von 22 °C bis 65 °C aufgenommen. Der FRET-Wert bei der DNA-Wasserprobe (0,00 mM K(l)) liegt bei 0,05 (25 °C). Durch die Zugabe von 0,09 mM K(l) steigt der FRET-Wert auf 0,15 an und erreicht bei einer Konzentration von 1,83 mM K(l) einen FRET-Wert von 0,85. Durch die Erhöhung der K(l)-Konzentration bis 522,91 mM steigt der FRET bis auf einen Wert von 0,89. Bei Erhöhung der Temperatur steigt der FRET-Wert erst bei zunehmender K(l)-Konzentration an. Es ist zu erkennen, dass auch bei hohen Temperatur hohe FRET-Werte erreicht werden. Die maximal erreichten FRET-Werte liegen zwischen

0,83 und 0,90. Weiterhin wurden die Hill-Funktion für jede Temperatur angepasst. Bei den Temperaturen 22° bis 30 °C liegen zwischen dem minimalen FRET-Wert und dem maximalen FRET-Wert keine Messwerte. Es ist zu erkennen, dass die Hill-Funktion für die Temperaturen 35 °C und 40 °C stark von den Messwerten abweichen.

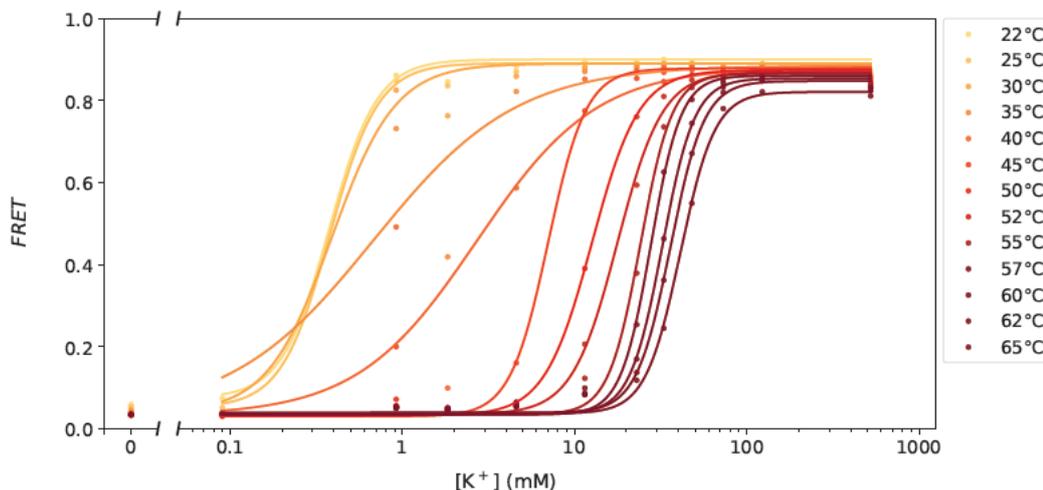


Abbildung 5.9: FRET in Abhängigkeit der K(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 22 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der hinzugegebener Puffer ist MOPS mit einem pH von 6,5. Mit angepasster Hill Funktion.

In den Abbildung 5.10 ist FRET in Abhängigkeit der K(I) Konzentration dargestellt, mit einem TRIS HCl Puffer, bei ein pH von 8,5. Bei Raumtemperatur ist ein Anstieg der FRET-Werte aber einer K(I)-Konzentration von 0,08 mM zuerkennen. Der FRET-Wert liegt bei 0,06 (25 °C). Bei einer K(I)-Konzentration von 0,83 bei 25 °C liegt der FRET-Wert bei 0,6 und steigt durch Erhöhung der K(I) Konzentration bis 0,81. Bei steigenden Temperaturen steigen die FRET-Werte erst bei höheren K(I)-Konzentrationen an. Die maximalen FRET-Werte liegen bei einem FRET zwischen 0,61 und 0,83. Für alle Temperaturen wurde die Hill-Funktion angepasst

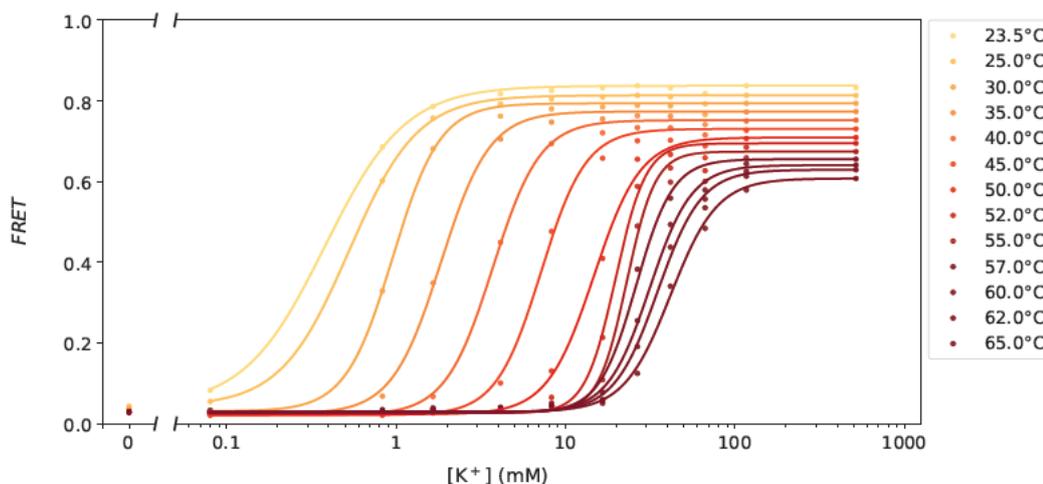


Abbildung 5.10: FRET in Abhängigkeit der K(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der hinzugegebener Puffer ist TRIS HCl mit einem pH von 8,5. Mit angepasster Hill Funktion für die Temperaturen 25 °C und 65 °C.

Im Vergleich zu der Titration mit HEPES steigt bei den Titrations mit MOPS und TRIS HCl schon bei geringeren Ionenkonzentrationen FRET an. Weiterhin sind Unterschiede bei den maximalen FRET-Werten zu erkennen. Bei der Messung mit dem MOPS-Puffer wurden die höchsten FRET-Werte gemessen und beim TRIS HCl-Puffer die geringsten.

In Abbildung 5.8 sind k_{eq} , k_A und n in Abhängigkeit der Temperatur T dargestellt für die K(I) Titration mit MOPS und TRIS HCl. In den oberen Diagrammen (a-c) wurde eine K(I) Titration mit TRIS HCl dargestellt. Die unteren Diagramme zeigen eine K(I) (d-f) Titration mit MOPS.

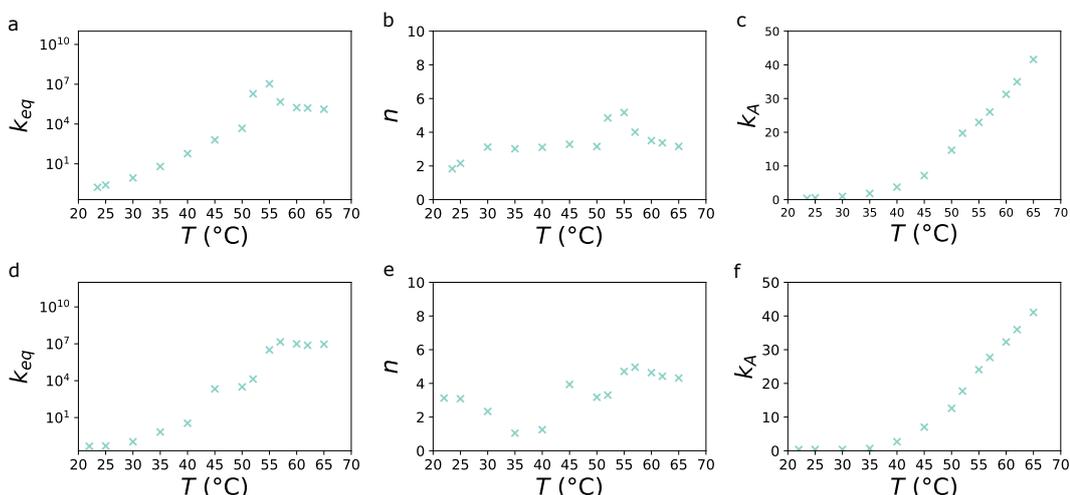


Abbildung 5.11: Darstellung der Regressionsparameter der Hill-Funktion und dem daraus bestimmten k_A für die Puffer TRIS HCl und MOPS, für die DNA T4 Probe. a: k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(I) Titration, mit TRIS HCl Puffer. b: k_A in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(I) Titration mit TRIS HCl Puffer. c: n in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(I) Titration mit TRIS HCl Puffer. d: k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur T für d K(I) Titration mit MOPS Puffer. e: k_A in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(I) Titration mit Mops Puffer. f: n in Abhängigkeit der Temperatur T für die K(I) Titration mit MOPS Puffer.

Auch die Titration mit MOPS und TRIS HCl wurde mit Zugabe von Na(I) durchgeführt. Die entsprechenden Abbildungen B.1 und B.2 befinden sich im Anhang. Es ist wie bei der K(I)- bzw. Na(I)-Titration mit HEPES keine signifikante Änderung der FRET-Werte oder der Regressionsparameter zu erkennen.

5.4 FRET in Abhängigkeit der Temperatur

In Abbildung 5.12 ist FRET in Abhängigkeit der Temperatur, für die DNA T4 Probe, in einem Konzentrationsbereich von 0,00 mM bis 516,64 mM K(I) bzw. Na(I) dargestellt. Es wurde einen HEPES Puffer hinzugegeben, der ein pH-Wert von 7,4 hat. Dieser wurde mit KOH bzw. mit NaOH eingestellt. Die 0,00 mM Probe ist DNA mit diH_2O , ohne Zugabe von Puffer. Bei den Konzentrationen von 0,00 mM und 0,08 mM fällt FRET mit steigenden Temperaturen leicht ab. Ab einer Konzentration von 0,83 mM ist eine deutlichere Änderung von FRET mit steigender Temperatur zu erkennen. Bei einer Temperatur von 65 °C liegen die FRET Werte in einem Bereich von 0,15 bis 0,3 für Konzentrationen bis 41,64 mM. Ab einer Konzentration von 41,64 mM ist FRET bei 65 °C deutlich größer. Bei den Konzentrationen von 66,64 mM bis 516,64 mM ist keine größere Veränderung von FRET zu erkennen.

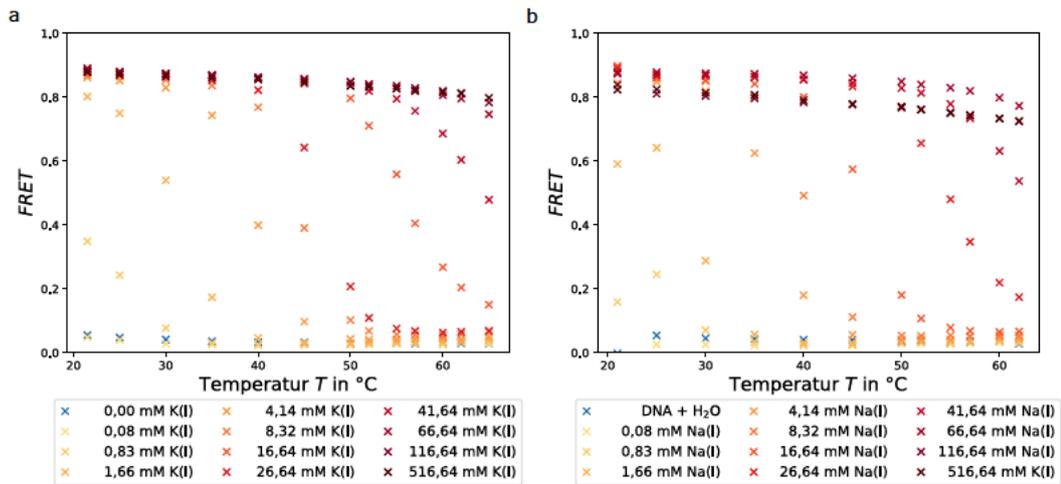


Abbildung 5.12: FRET in Abhängigkeit der Temperatur für die DNA T4 Probe, bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der pH-Wert ist 7,4 und wurde mit einem HEPES Puffer eingestellt. a: Zugabe von K(I) b: Zugabe von NaCl

In Abbildung 5.13 ist FRET in Abhängigkeit der Temperatur, in einem Konzentrationsbereich von 0,00 mM bis 522,91 mM K(I) bzw. Na(I) dargestellt. Es wurde einen MOPS Puffer hinzugegeben, der ein pH-Wert von 6,5 hat. Dieser wurde mit KOH bzw. mit NaOH eingestellt. Die 0,00 mM Probe ist DNA mit diH₂O, ohne Zugabe von Puffer. Im Vergleich mit HEPES ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

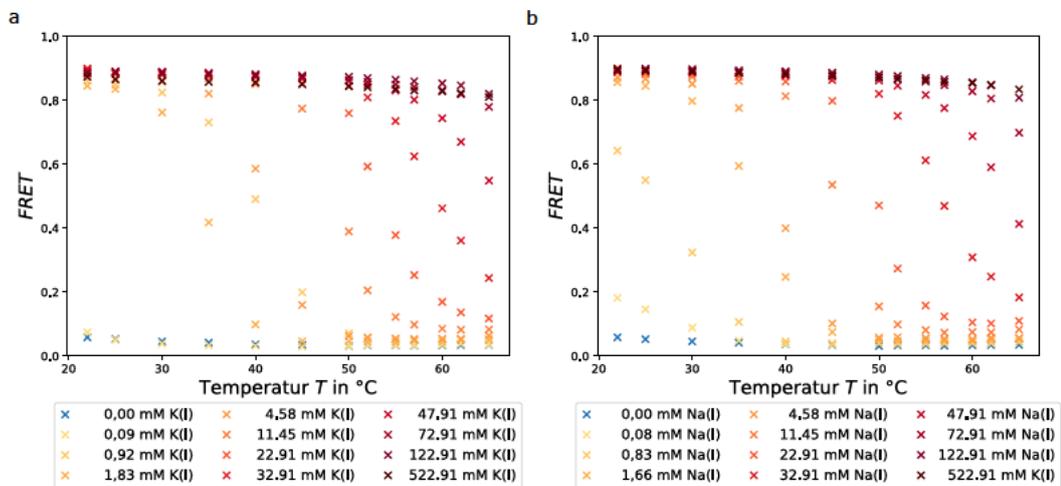


Abbildung 5.13: FRET in Abhängigkeit der Temperatur bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen in einem Temperaturbereich von 22 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der pH-Wert ist 6,5 und wurde mit einem MOPS Puffer eingestellt. a: Zugabe von K(I) b: Zugabe von NaCl

In Abbildung 5.14 ist FRET in Abhängigkeit der Temperatur, in einem Konzentrationsbereich von 0,00 mM bis 516,53 mM K(I) bzw. Na(I) dargestellt. Es wurde einen TRIS HCl Puffer hinzugegeben, der ein pH-Wert von 8,5 hat. Dieser wurde mit KOH bzw. mit NaOH eingestellt. Die 0,00 mM Probe ist DNA mit diH₂O, ohne Zugabe von Puffer. Im Vergleich mit HEPES und MOPS ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Mit steigender Temperatur sinkt die FRET-Werte, auch bei höheren K(I) bzw. Na(I) Konzentrationen ab.

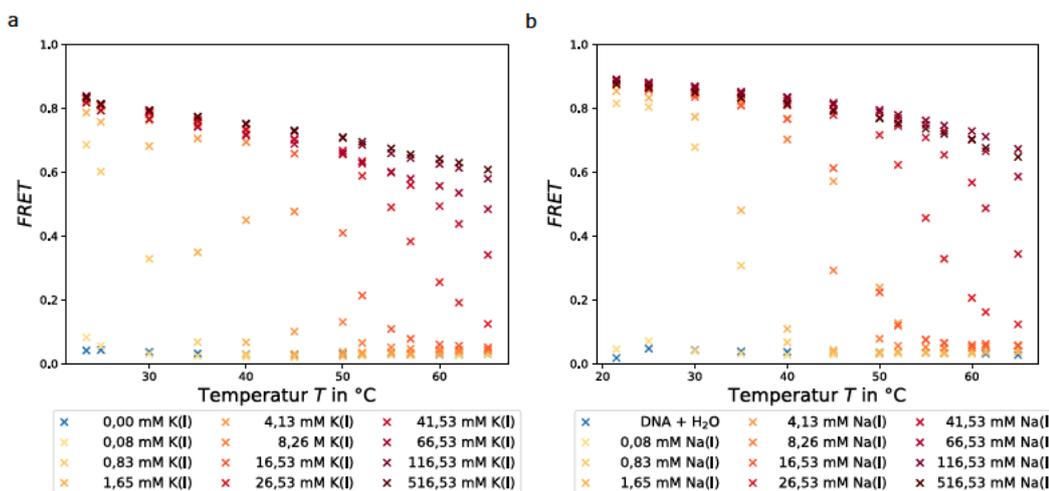


Abbildung 5.14: FRET in Abhängigkeit der Temperatur bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C. Der pH-Wert ist 8,5 und wurde mit einem TRIS HCl Puffer eingestellt. a: Zugabe von K(I) b: Zugabe von NaCl

In Abbildung 5.15 ist FRET in Abhängigkeit von Abstand R dargestellt. Für die Bestimmung von R wurde die Gleichung (2.10) nach R umgestellt und die im Experimente bestimmte FRET-Werte eingesetzt. Dafür wurden die FRET-Werte der K(I) bzw. Na(I) Titration mit HEPES über den gesamten Temperaturbereich verwendet. Für R_0 wurde 5,4 nm eingesetzt, da dies der Försterradius für das Farbstoffpaar Cy3/Cy5 ist [15]. Weiterhin wurde anschließend die FRET Funktion (Gleichung (2.10)) angepasst.

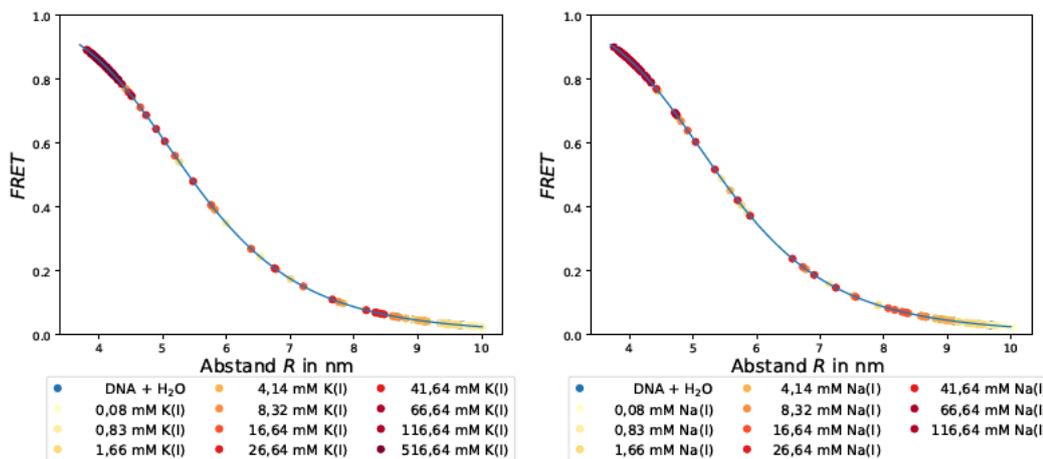


Abbildung 5.15: Darstellung der FRET Werte über den Abstand R , für die DNA T4 Probe. Mit angepasster FRET-Funktion. Der pH-Wert des HEPES-Puffers betrug 7.4

5.5 Vergleich FRET vorhersage mit Experiment

Um das Experiment mit dem theoretische bestimmten Werten zu vergleichen, werden die maximalen bzw. minimalen gemessenen FRET Werte betrachtet. Bei der DNA T14 Probe weichen die minimalen FRET-Werte von den theoretische bestimmte werten ab. Der mittels Experiment bestimmte FRET-Wert bei Raumtemperatur war 0,26 (Tabelle C.1) und der theoretisch bestimmte, lag bei 0,11. Der

maximale bestimmte FRET-Wert für die DNA T14 Probe war 0,50. Dieser ist leicht höher als der theoretisch bestimmte Wert von 0,45.

Für die DNA T4 Probe wurde ein theoretischer FRET-Wert von 0,01 im ungebundenen Zustand bestimmt. Die minimalen FRET-Werte im Experiment lagen bei ca. 0,03. Der theoretische maximal bestimmte FRET-Wert ist für die DNA T4 Probe 0,91. Die im Experiment bestimmten FRET-Werte lagen bei Raumtemperatur bei 0,87 mit HEPES, 0,89 mit MOPS und 0,81 mit TRIS HCl-Puffer. In Tabelle 5.6 sind die minimalen FRET-Werte des mittels Experiment, bei 25 °C aufgelistet.

Tabelle 5.6: Mittel Experiment bestimmte minimale FRET-Werte bei 25 °C

	HEPES T14	HEPES T4	MOPS T4	TRIS HCl T4
K(l)	0,262	0,048	0,051	0,043
Na(l)	0,269	0,026	0,147	0,071

In Tabelle 5.7 sind die maximalen FRET-Werte des mittels Experiment, bei 25 °C aufgelistet.

Tabelle 5.7: Mittel Experiment bestimmte maximale FRET-Werte bei 25 °C

	HEPES T14	HEPES T4	MOPS T4	TRIS HCl T4
K(l)	0,503	0,880	0,891	0,814
Na(l)	0,505	0,879	0,900	0,881

6 Diskussion

6.1 Qualitätskontrolle der DNA

Das Verhältnis von A260/280 zeigt eine mögliche Verunreinigung durch Proteinen. Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0 kann davon ausgegangen werden, dass die DNA rein ist. Das Verhältnis von A260/230 zeigt eine mögliche Verunreinigung durch Salze, Zucker oder andere organische Materialien. Liegt der Wert zwischen 2,0 und 2,2 kann da von ausgegangen werden, dass keine dieser Verunreinigungen vorhanden sind [27–29].

Da das Verhältnis von A260/280 $1,81 \pm 0,16$ bestätigt die Reinheit. Das Verhältnis von A260/230 ist $3,09 \pm 0,51$. Das Verhältnis ist damit größer als die Literaturwerte [28], dennoch kann das von ausgegangen werden keine Verschmutzung vorliegt. Das ist auch im UV-VIS-Spektrum (Abbildung 5.1) der DNA T4 Probe zu erkennen.

Der Markierungsgrade der Fluorophore an die DNA T4 Probe ist für Cy3 88 % und für Cy5 96 %. Demzufolge sind 96 % der DNA T4 Probe mit Cy5 markiert und 88 % mit Cy3. Dadurch kann angenommen werden, dass der Großteil der DNA T4 Probe mit beiden Fluorophoren markiert ist und die Messungen interpretierbare Ergebnisse liefern, die der Interaktion zweier Fluorophore an einem DNA-Molekül zugrunde liegen.

Durch die Fluoreszenzintensitätsmaxima können die Fluorophore eindeutig zugeordnet werden Abbildungen 5.2 und 5.3. Für Cy3 liegt das Fluoreszenzmaiximum bei einer Wellenlänge von 570 nm [11] und für Cy5 bei 662 nm [12]. Im Vergleich der Messwerte mit den Literaturwerten für die Fluoreszenzemissionamaximals von Cy3 und Cy5 sind geringe Abweichungen zu erkennen. Die Ursache dafür liegt im Messintervall von 5 nm. In Tabelle 6.1 sind die Literaturwerte und die im Experiment bestimmten Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima aufgelistet.

Tabelle 6.1: Bestimmte und Literaturwerte für die Wellenlänge bei den maximalen Fluoreszenzintensitäten

Farbstoff	Messwert	Literaturwert [11, 12]
Cy3	565 nm	570 nm
Cy5	665 nm	662 nm

In den Fluoreszenzemissionsspektren (Abbildungen 5.2 und 5.3) ist zu erkennen, dass mit steigender K(I)- bzw. Na(I)-Konzentration die Fluoreszenzintensität abnimmt. Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten bei Cy3, bei den Konzentrationen 0,00 mM und 0,08 mM K(I) bzw. Na(I) im Vergleich zu höheren K(I)- bzw. Na(I) zeigt, dass nicht bzw. geringe Vorhandensein von FRET. Bei den geringen Konzentrationen liegt die DNA ungebunden vor, wodurch keine bzw. nur ein geringer Teil der Donorenergie auf den Akzeptor übertragen werden. Dadurch ist Fluoreszenzintensität des Donors bei den geringen Konzentrationen deutlich höher [2]. Weiterhin muss die Wechselwirkung zwischen der Fluorophoren und der DNA-Probe beachtet werden. Durch die Zugabe von K(I) bzw. Na(I) kommt es zu einer Zunahme der Wechselwirkung zwischen der DNA und den Fluorophoren. Dadurch wird der Kontaktbereich zwischen der DNA und dem Fluorophor größer, wodurch die Emission abnimmt [13].

6.2 DNA T14 ist nicht als FRET Standard einsetzbar

Es wurden anhand der theoretische ermittelten mittleren FRET-Wert erwartet, dass bei beiden DNA-Proben die Faltung des DNA *Hairpins*, durch die Änderung von FRET zu erkennen ist. Die Experimente haben gezeigt, dass die T14 Probe nicht als FRET Standard einsetzbar ist, da zum einen die FRET-Werte sinken bei hohem Metallionen hintergrund, was genau das Gegenteil der zu erwartenden Verhalten darstellt. Da eigentlich durch die Zugabe von Metallionen die Faltung des Hairpin stabilisiert werden soll [7]. Weiterhin für die Messwerte keine Hillfunktion angepasst werden kann. Zuletzt decken sich die hohen FRET-Werte der DNA-Wasser-Probe nicht mit den theoretisch bestimmten Werte. Die theoretischen Werte zeigen nur einzelne Momentaufnahmen der DNA und können daher nur die experimentellen Werten schätzen. Allerdings sollte die DNA in der Wasser-Probe, also ohne Metallionen, ungefaltet vorliegen, sodass der Abstand zwischen den Farbstoffen ausreichen groß ist, dass keine hohen FRET-Werte bestimmt werden. Die Vermutung für die hohen FRET-Werte von der DNA T14 Probe bei keinem Matallionen hintergrund ist, dass die Abstände der Fluorophore im ungefalteten Zustand zu geringe ist, weswegen ein höhere FRET gemessen worden ist als erwartete. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Experimente die DNA T4 Probe verwendet, da bei dieser deutlicher zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand unterschieden werden kann.

6.3 K(I) und Na(I) führen zur stabilen Faltung des DNA-Hairpin-Motives für die DNA T4 Probe

Die neu entworfene DNA-Probe hat im Vergleich zur vorherigen geänderte Markierungspositionen. Damit soll erreicht werden, dass eine deutlichere Änderung der FRET-Werte zustande kommt, wenn die DNA aus dem ungefalteten Zustand übergeht. Diese Zustandsänderung wird durch Metallionen hervorgerufen. Es wurde sowohl der Einfluss von Kalium, als auch von Natrium untersucht. Kalium- bzw. Natriumionen haben eine geschlossene, elektronische Schalenstruktur. Deswegen interagieren diese hauptsächlich durch elektrostatische Kräfte mit anderen Atomen oder Molekülen [7]. Es wurde erwartete, dass mit zunehmender K(I) bzw. Na(I) Konzentration sich der DNA Einzelstrang mehr zum *Hairpin* faltet, da die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ion und DNA stärker wird, wodurch die negative Ladung des DNA Rückgrat ausgeglichen wird [8]. Durch die Faltung des *Hairpin*, ändert sich der Abstand der Farbstoffe zueinander und damit kommt es zur einer Änderung von FRET. In Abbildungen 5.6, 5.7, 5.9, 5.10, B.1 und B.2 ist dieses Verhalten der DNA zu erkennen. Bei geringen Metallionenkonzentration ist zu erkennen, dass bei Raumtemperatur sehr geringe FRET Werte gemessen worden sind. Daraus lässt sich schließen, dass die DNA als Einzelstrang vorliegt und die bisher zugegebene Menge an Metallionen nicht ausreicht, um die Faltung der DNA zu unterstützen. Erst ab einer Konzentration von 0,8 mM Metallionen hintergrund wurde bei Raumtemperatur höhere FRET Werte gemessen, woraus abgeleitet werden kann, dass sich die Fluorophore durch die Faltung der DNA angenähert haben. Weiterhin wurde für alle Messungen gezeigt, dass mit Zunahme der monovalenten Metallionenkonzentration der FRET Wert steigt. Daraus lässt sich schließen, dass sich die ssDNA zu einer dsDNA gefaltet hat.

Für die Bildung des *Hairpin* wurden Kaliumionen bzw. Natriumionen hinzugegeben. Bei dem Vergleich der Messung ist zu erkennen, da es keinen Unterschied gibt, wenn K(I) bzw. Na(I) verwenden worden sind. Beide Ionen haben einen ähnlichen Einfluss auf die DNA und führen zur Faltung des *Hairpins*. Auch bei Änderungen des pH-Werts oder Puffer ist zwischen den Messungen mit K(I) und denen mit Na(I) kein Unterschied zu erkennen. Auch die Bestimmung der Hill-Funktion war

für alle Messbedingungen anwendbar [13]. Somit konnten für die DNA T4, mittels FRET, Änderungen im Faltungszustand nachgewiesen werden. Damit kann die DNA T4 als Standard-Probe für FRET-Experimente im Labor eingesetzt werden.

6.4 Puffer und pH-Werte scheinen Einfluss auf die Messungen zu haben

Bei der Messung von FRET in Abhängigkeit der K(I)- bzw. Na(I)-Konzentration wurde gezeigt, dass es Unterschiede zwischen Puffer HEPES, MOPS und TRIS HCl gibt. Bei jedem Puffer konnte die Zunahme von FRET mit steigender Ionenkonzentration gezeigt werden, aber es waren Unterschiede bei den maximalen FRET-Werten zu erkennen und den Konzentrationen ab denen der FRET-Wert angestiegen ist [2]. HEPES und MOPS haben dabei ähnliche Ergebnisse erbracht (Abbildungen 5.6 und 5.9). Die Unterschiede lagen dabei bei den maximalen FRET-Werten, diese waren bei MOPS leicht höher, aber im gleichen Bereich und diese waren auch über die Temperatur stabil, bei hohen Ionenkonzentrationen. Bei MOPS sind die FRET-Werte schon bei geringeren K(I)- bzw. Na(I)-Konzentration angestiegen (0,09 mM), als bei HEPES (0,83 mM). Diese Unterschiede liegen wahrscheinlich an den unterschiedlichen pH-Werten der Puffer, da die Puffer von der Struktur sehr ähnlich zueinander sind (Abbildung 6.1). Da kann aber nicht mit Sicherheit gesagt werden, da die Puffer nicht bei gleichem pH-Wert gemessen worden sind.

Bei der Messung mit dem TRIS HCl-Puffer ist zu erkennen, dass bei höheren K(I)- bzw. Na(I)-Konzentrationen der FRET-Wert nicht temperaturstabil ist (Abbildung 5.10). Weiterhin steigt der FRET-Wert schon bei geringeren Konzentrationen an, wie beim MOPS-Puffer. Es wird vermutet, dass die geringere Temperaturstabilität bei hohen Ionenkonzentrationen am TRIS HCl-Puffer liegen, da diese bei den anderen Puffer nicht zu erkennen war und sich die Struktur von TRIS HCl von der anderen unterscheidet. Für eine genauere Bewertung der Puffer und pH-Wert Abhängigkeit sind weitere Messungen mit gleichem pH-Wert für die Puffer.

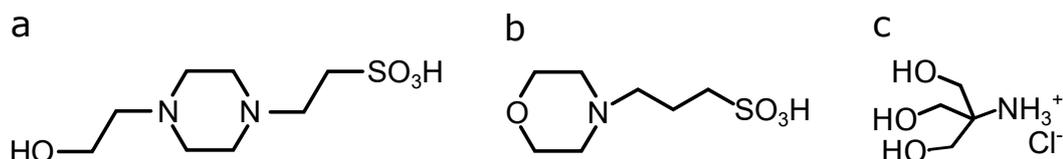


Abbildung 6.1: Strukturformel der Puffer. a: HEPES, b: MOPS, c: TRIS HCl

6.5 Beurteilung der Regressionsparameter

Für den Vergleich der Ergebnisse der K(I)- bzw. Na(I)-Titration wurden die Regressionsparameter und k_A in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt (Abbildungen 5.8 und 5.11). Die Regressionsparameter der Hill-Funktion sollen einen Vergleich der jeweiligen Messungen ermöglichen. Bei k_{eq} und k_A ist zu erkennen, dass diese mit zunehmender Temperatur ansteigen (Abbildungen 5.8 und 5.11). Mit steigenden Temperaturen ist eine höhere Konzentration von K(I) nötig, um die schnellere Dissoziation der Metallionen von der DNA auszugleichen. Um die Genauigkeit der Hill-Funktion abschätzen zu können, wurden die Standardabweichung der Regressionsparameter und durch Fehlerfortpflanzung der Fehler von k_A bestimmt (Tabellen C.2 bis C.7). Für die Entstehung der Fehler Regressionsparameter müssen verschiedene Gegebenheiten beachtet werden. Zum einen die Wahl

der Messpunkte und deren Anzahl. Für eine gute Anpassung der Hill-Funktion an die Messwerte ist es wichtig dass vor und nach dem Anstieg der Funktion ausreichende Messwerte vorhanden sind und dass auch in der Nähe des Wendepunkts der Funktion sich Messwerte befinden. Das Problem von zu wenig bzw. schlecht verteilten Messpunkten sind für die Puffer MOPS und TRIS HCl zu erkennen (Abbildungen 5.9 und 5.10). Bei niedrigen Temperaturen sind zwischen dem minimalen und maximalen FRET-Wert keine weiteren Messwerte, wodurch die Genauigkeit der Hill-Funktion für diese Temperaturen abnimmt.

Einen größeren Einfluss auf den Fehler hat die Verdunstung der Probe und der damit verbundene Änderung der Konzentrationen. Messung des Volumens nach dem Experiment haben gezeigt, dass ca. 50 %, als ca. 50 μ l Probe verdunstet sind. Allgemein kann gesagt werden, dass sich durch die Verdunstung die Messbedingungen ändern. Durch diese starke Volumenabnahme könnte sich die Konzentration der Metallionen demzufolge verdoppeln. Das könnte auch einen Einfluss auf den pH-Wert haben, vor allem bei den Proben mit einer hohen Ionenkonzentration.

6.6 Aufschmelzen des DNA-*Hairpins* konnte auch mittels FRET gezeigt werden

Konkrete Schmelzkurvenanalysen werden durch die direkte Messung des DNA-Signals bei 260 nm durchgeführt [9]. Da die Faltung mittels FRET gezeigt werden konnte, sollte auch das Aufschmelzen und der Zusammenhang mit der Ionenkonzentration gezeigt werden.

Durch eine Temperaturerhöhung soll das Aufschmelzen der DNA gezeigt werden. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den organischen Basen aufgeschmolzen bzw. die zugeführte Energie durch die Temperaturerhöhung ist größer als die Bindungsenergie zwischen den kanonischen Basenpaaren [5]. Im Experiment war zu erkennen, dass FRET mit zunehmender Temperatur gefallen ist (Abbildungen 5.12 bis 5.14). Das zeigt, dass aufschmelzen der DNA. Durch das Aufschmelzen wird der Abstand zwischen den Fluorophoren geringer, wodurch die Effizienz von FRET geringer wird [2].

Ab einer Konzentration von ca. 41 mM kann kein vollständiges Absinken der FRET-Werte beobachtet werden, auch bei hohen Temperaturen. Ab dieser Temperatur wird der *Hairpin* so stark von den Ionen stabilisiert, dass Temperaturen über 65 °C nötig wären, um das Aufschmelzen der DNA zu bewirken [8]. Diese Daten können nicht aufgenommen werden, da der iD5 nur bis 65 °C messen kann.

6.7 FRET Vorhersage stimmt mit Experiment überein

Für DNA T4 stimmen die experimentell ermittelten FRET-Werte gut mit den durch die ACV bestimmten FRET-Werten überein. Die theoretisch bestimmten FRET-Werte zeigten nur eine Momentaufnahme der Struktur, wohingegen das Experiment Dynamik zeigt, daher sind Abweichungen zwischen Theorie und Experiment möglich. Das Experiment beweist trotzdem, dass deutliche Unterschiede in den FRET-Signalen zwischen gefalteten und ungefalteten Zuständen gemessen werden und die DNA T4 daher ein geeigneter FRET-Standard im Labor ist.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte eine DNA Sequenz mittels fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen charakterisiert werden. FRET ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Struktur von Biomolekülen [2, 3]. Die zu untersuchende DNA bildet ein Hairpin-Motiv im gefalteten Zustand aus. Um diese Faltung zeigen zu können, wurde die DNA so entworfen, dass die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 im ungefalteten Zustand weit genug voneinander entfernt sind, damit kein oder nur ein geringes FRET-Signal messbar ist, aber im gefalteten Zustand ein deutlicher Anstieg von FRET erkennbar wird. Mittels FRET konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von K(I) und Na(I) die Bildung eines DNA Hairpin-Motivs gefördert und stabilisiert werden konnte. Dabei ist ein Metallionenhintergrund von mindestens 1,66 mM bei Raumtemperatur, mit HEPES-Puffer nötig. Neben den Einflüssen dieser beiden Ionen und ihren Konzentrationen wurden weitere Bedingungen wie Puffer und pH-Wert untersucht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verschiedenen Puffer und pH-Werten Einfluss auf die DNA Sequenz hatten. Dabei haben die Puffer HEPES und MOPS ein ähnliches Verhalten gezeigt. Bei dem TRIS HCl Puffer wurde ein anderes Verhalten gezeigt, als wie bei HEPES und MOPS. Dabei ist nicht klar, ob diese Ergebnisse durch den Puffer oder sich anderen pH-Wert zustand gekommen sind. Da alle Messungen mit unterschiedlichen Bedingungen in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 65 °C gemessen wurden, konnte auch das Aufschmelzen der DNA mittels FRET gezeigt werden. Dabei ist auch deutlich geworden, dass 65 °C bei hohen Ionenkonzentrationen (ab 66,64 mM beim HEPES-Puffer) nicht ausreichen, um die DNA aufzuschmelzen. Damit konnte gezeigt werden, dass mit der DNA-Sequenz unter vielen verschiedenen Bedingungen deutliche Änderungen der FRET-Werte zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand gemessen werden konnten. Abschließen kann also gesagt werden, dass sich die DNA Sequenz als Standard im Labor eingesetzt werden kann. Weitere Untersuchungen sind aber für den TRIS HCl Puffer und den basischen pH-Bereich nötig.

Zum einen die Messung von HEPES und MOPS bei einem gleichen pH-Wert. Weiterhin sollte das Verhalten von TRIS HCl auf die DNA weiter untersucht werden, um die Ursachen für die Unterschiede zwischen HEPES bzw. MOPS zu erörtern. Dafür sollte die Messung mit TRIS HCl in einen neutralen pH-Bereich gemessen werden. Danach könnte die pH-Stabilität der Farbstoffe Cy3 und Cy5 untersucht werden. Für Messungen mit Temperaturabhängigkeit ist es wichtig, eine Möglichkeit zur Verhinderung des Verdunstens der Probe zu finden, damit bei stabilen Bedingungen die Messung durchgeführt werden kann. Zum Schluss könnte noch die Temperaturabhängigkeit von FRET mittels einer Anpassung einer Schmelzkurve untersucht werden und die Schmelztemperatur T_m bestimmt werden. Zum weiteren Vorgehen könnte noch die Temperaturabhängigkeit von FRET mittels einer Anpassung einer Schmelzkurve untersucht werden, wie in Abbildung 7.1, angedeutet. Auf diese Weise könnte die Schmelztemperatur T_m bestimmt werden.

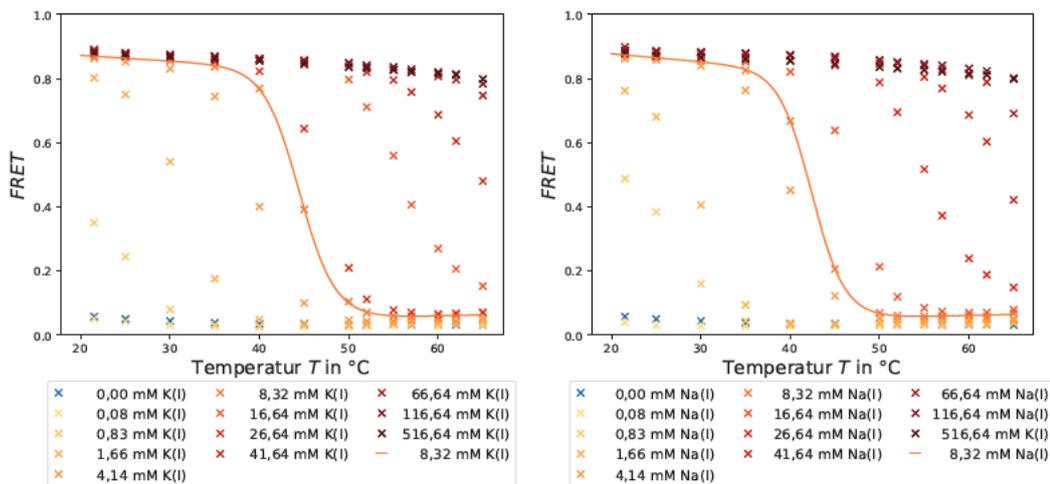


Abbildung 7.1: FRET in Abhängigkeit der Temperatur für die DNA T4 Probe, bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C. Der pH-Wert des HEPES-Puffers betrug 7.4. Für die K(I)- bzw. Na(I)-Konzentration von 8,32 mM wurde eine mögliche Schmelzkurve angepasst. links: Zugabe von K(I) rechts: Zugabe von NaCl

Anhang A: Messprotokolle

In den folgenden Tabellen A.1 bis A.4 sind die Pipettierschemas für die jeweiligen Probenherstellungen, für die verschiedene Puffer aufgelistet. Dabei wird die Gesamtkonzentration von K(I) bzw. Na(I) angegeben. Das Volumen und die Ausgangskonzentrationen von den hinzugegebenen KCl- bzw. NaCl-Lösungen. Weiterhin das Volumen der DNA und deren Ausgangskonzentration. Das benötigte Volumen an diH₂O pro Probe. Das Volumen und die Ausgangskonzentration der jeweiligen Puffer und die Pufferkonzentration der einzelnen Proben.

Tabelle A.1: Pipettierschema für Messung des HEPES Puffer mit der DNA T4 Probe.

[K(I)/Na(I)]	K(I)/Na(I)	DNA	H ₂ O	HEPES	[HEPES]
0,00 mM	-	1 µl	49 µl	-	0 mM
16,64 mM	-	1 µl	44 µl	5 µl	10 mM
17,64 mM	5 µl (0,01 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
21,64 mM	5 µl (0,05 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
26,64 mM	5 µl (0,1 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
41,64 mM	5 µl (0,25 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
66,64 mM	5 µl (0,5 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
91,64 mM	5 µl (0,75 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
116,64 mM	5 µl (1 M)	1 µl	39 µl	5 µl	10 mM
516,64 mM	22 µl (1 M)	1	22 µl	5 µl	10 mM

Tabelle A.2: Pipettierschema für Messung des HEPES Puffer mit der DNA T14 Probe.

[K ⁺ /Na ⁺]	KCl/NaCl	DNA	diH ₂ O	HEPES	[HEPES]
0,00 mM	0	2 µl (25 µM)	98 µl	0	0,00 mM
0,08 mM	-	2 µl (25 µM)	97 µl	1 µl (10 mM)	0,10 mM
0,83 mM	-	2 µl (25 µM)	97 µl	1 µl (100 mM)	1,00 mM
1,66 mM	-	2 µl (25 µM)	96 µl	2 µl (100 mM)	2,00 mM
4,14 mM	-	2 µl (25 µM)	93 µl	5 µl (100 mM)	5,00 mM
8,32 mM	-	2 µl (25 µM)	97 µl	1 µl (100 mM)	10,00 mM
16,64 mM	-	2 µl (25 µM)	88 µl	10 µl (200 mM)	20,00 mM
26,64 mM	10 µl (100 mM)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (200 mM)	20,00 mM
41,64 mM	10 µl (250 mM)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (200 mM)	20,00 mM
66,64 mM	10 µl (500 mM)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (200 mM)	20,00 mM
116,64 mM	10 µl (1 M)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (200 mM)	20,00 mM
516,64 mM	44 µl (1M)	2 µl (25 µM)	48 µl	10 µl (200 mM)	20,00 mM

Tabelle A.3: Pipettierschema für Messung des MOPS Puffers mit der DNA T14 Probe.

[K ⁺ /Na ⁺]	KCl/NaCl	DNA	H ₂ O	MOPS	[MOPS]
0,00 mM	0	2 µl (25 µM)	98 µl	0	0,00 mM
0,09 mM	-	2 µl (25 µM)	94 µl	4 µl (10 mM)	0,40 mM
0,46 mM	-	2 µl (25 µM)	96 µl	2 µl (100 mM)	2,00 mM
0,92 mM	-	2 µl (25 µM)	94 µl	4 µl (100 mM)	4,00 mM
1,83 mM	-	2 µl (25 µM)	90 µl	8 µl (100 mM)	8,00 mM
4,58 mM	-	2 µl (25 µM)	97 µl	2 µl (1000 mM)	20,00 mM
11,45 mM	-	2 µl (25 µM)	94 µl	5 µl (1000 mM)	50,00 mM
22,91 mM	-	2 µl (25 µM)	88 µl	10 µl (1000 mM)	100,00 mM
32,91 mM	10 µl (100 mM)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (1000 mM)	100,00 mM
47,91 mM	10 µl (250 mM)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (1000 mM)	100,00 mM
72,91 mM	10 µl (500 mM)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (1000 mM)	100,00 mM
122,91 mM	10 µl (1 M)	2 µl (25 µM)	78 µl	10 µl (1000 mM)	100,00 mM
522,91 mM	44 µl (1M)	2 µl (25 µM)	48 µl	10 µl (1000 mM)	100,00 mM

Tabelle A.4: Pipettierschema für Messung des TRIC HCl Puffers mit der DNA T14 Probe.

[K ⁺ /Na ⁺]	KCl/NaCl	DNA	H ₂ O	TRIS	[TRIS]
0	0	2 µl (25 µM)	98 µl	0	0,00 mM
0,08 mM	-	2 µl (25 µM)	95 µl	3 µl (1 mM)	0,03 mM
0,83 mM	-	2 µl (25 µM)	95 µl	3 µl (10 mM)	0,30 mM
1,65 mM	-	2 µl (25 µM)	92 µl	6 µl (10 mM)	0,60 mM
4,13 mM	-	2 µl (25 µM)	83 µl	15 µl (10 mM)	1,50 mM
8,26 mM	-	2 µl (25 µM)	95 µl	3 µl (100 mM)	3,00 mM
16,53 mM	-	2 µl (25 µM)	88 µl	6 µl (100 mM)	6,00 mM
26,53 mM	10 µl (100 mM)	2 µl (25 µM)	82 µl	6 µl (100 mM)	6,00 mM
41,53 mM	10 µl (250 mM)	2 µl (25 µM)	82 µl	6 µl (100 mM)	6,00 mM
66,53 mM	10 µl (500 mM)	2 µl (25 µM)	82 µl	6 µl (100 mM)	6,00 mM
116,53 mM	10 µl (1 M)	2 µl (25 µM)	82 µl	6 µl (100 mM)	6,00 mM
516,53 mM	44 µl (1M)	2 µl (25 µM)	48 µl	6 µl (100 mM)	6,00 mM

Anhang B: Konzentrationsabhängigkeit von FRET

In den Abbildungen B.1 und B.2 sind die Na(I) Titrations, der DNA T4 Probe, für die Puffer MOPS und TRIS HCl dargestellt.

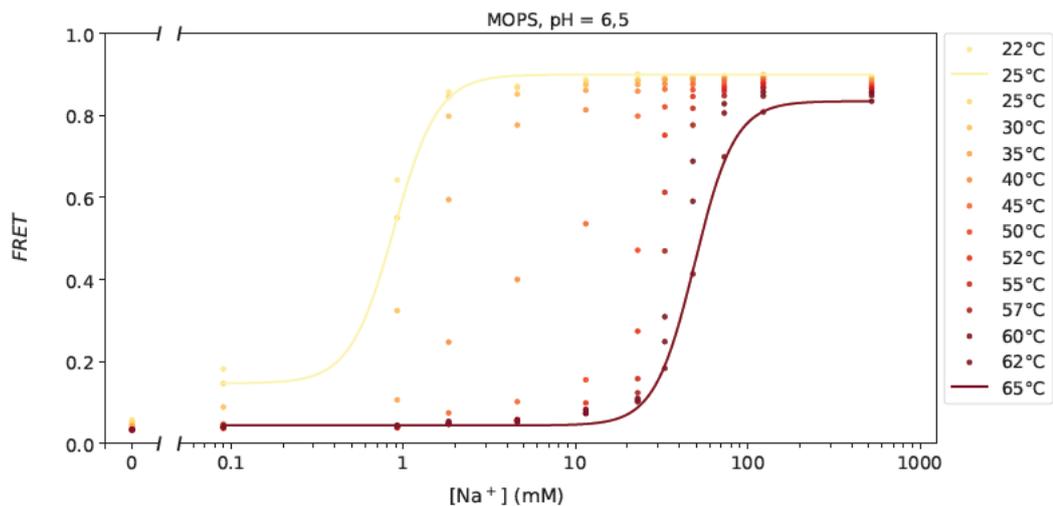


Abbildung B.1: FRET in Abhängigkeit der Na(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 22 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der hinzugegebene Puffer ist MOPS mit einem pH von 6,5. Mit angepasster Hill-Funktion für die Temperaturen 25 °C und 65 °C.

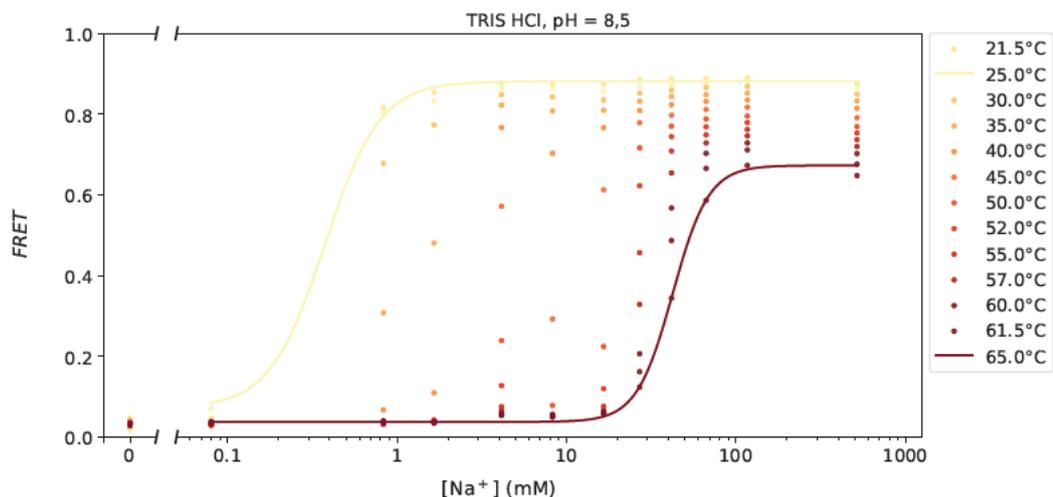


Abbildung B.2: FRET in Abhängigkeit der Na(I) Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C, für die DNA T4 Probe. Der hinzugegebene Puffer ist TRIS HCl mit einem pH von 8,5. Mit angepasster Hill-Funktion für die Temperaturen 25 °C und 65 °C.

In Abbildung B.3 sind die Regressionsparameter für die Hill-Funktion der Na(I)-Titration mit TRIS HCl-Puffer (a - c) und MOPS-Puffer (d - f) dargestellt.

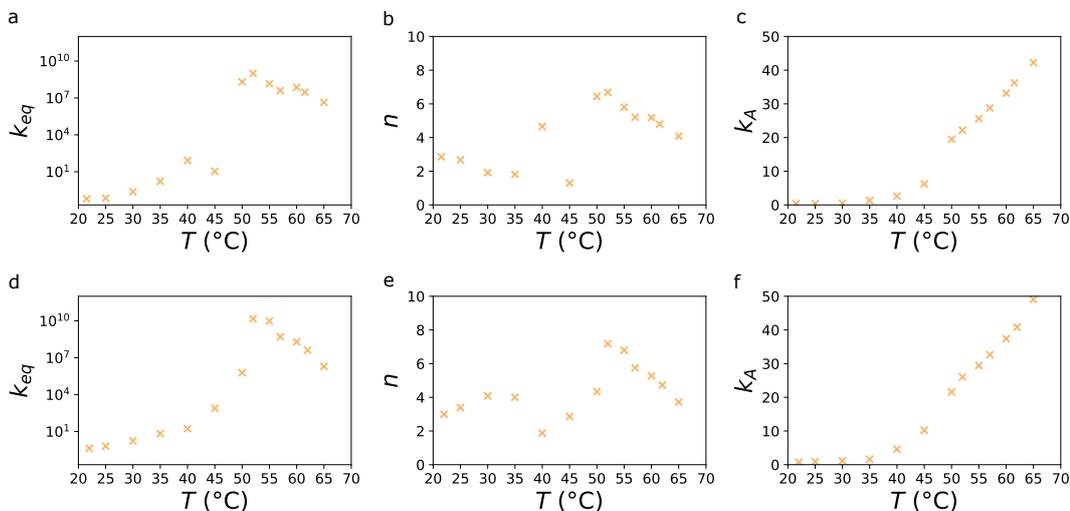


Abbildung B.3: Darstellung der Regressionsparameter der Hill-Funktion und dem daraus bestimmten k_A für die Puffer TRIS HCl und MOPS. a: k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(I) Titration, mit TRIS HCl Puffer. b: k_A in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(I) Titration mit TRIS HCl Puffer. c: n in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(I) Titration mit TRIS HCl Puffer. d: k_{eq} in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(I) Titration mit MOPS Puffer. e: k_A in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(I) Titration mit Mops Puffer. f: n in Abhängigkeit der Temperatur T für die Na(I) Titration mit MOPS Puffer.

Anhang C: Regressionsparameter

In Tabelle C.1 sind die minimalen und maximalen FRET-Werte der DNA T14 Probe im Temperaturbereich von 24,5 °C bis 65 °C

Tabelle C.1: Minimale und Maximale FRET-Werte für die K(I) bzw. Na(I) Titration der DNA T14 Probe.

T in °C	K(I)		Na(I)	
	FRET _{min}	FRET _{max}	FRET _{min}	FRET _{max}
24,5	0,284	0,503	0,301	0,511
25	0,262	0,499	0,269	0,505
30	0,234	0,490	0,234	0,496
35	0,210	0,475	0,209	0,481
40	0,187	0,460	0,194	0,464
45	0,181	0,438	0,176	0,440
50	0,168	0,425	0,160	0,424
52	0,161	0,420	0,151	0,421
55	0,146	0,411	0,140	0,411
57	0,135	0,395	0,130	0,407
60	0,152	0,392	0,127	0,396
62	0,158	0,388	0,147	0,424
65	0,214	0,461	0,236	0,523

In den folgenden Tabellen sind die Regressionsparameter der Hill-Funktions aufgelistet. Weiterhin wurde der FRET für k_{eq} bestimmt.

Tabelle C.2: Regressionsparameter der K(I) Titration von HEPES

T in °C	k_{eq} in mM	n	k_A in mM	FRET _{min}	FRET _{max}
21,5	0,871 ± 0,058	3,90 ± 0,26	0,965 ± 0,019	0,048	0,891
25	1,468 ± 0,084	4,06 ± 0,17	1,099 ± 0,020	0,040	0,880
30	6,0 ± 1,2	4,35 ± 0,39	1,51 ± 0,13	0,028	0,875
35	29,0 ± 3,9	3,57 ± 0,13	2,56 ± 0,19	0,026	0,869
40	143 ± 48	3,34 ± 0,22	4,43 ± 0,88	0,024	0,863
45	800 ± 1500	3,07 ± 0,83	8,82 ± 11	0,026	0,857
50	150 ± 420	1,80 ± 0,93	16 ± 48	0,024	0,849
52	220 ± 670	1,80 ± 0,98	20 ± 67	0,027	0,841
55	770 ± 2700	2,1 ± 1,1	25 ± 83	0,029	0,836
57	$7,5 \cdot 10^{14} \pm 2,3 \cdot 10^{19}$	11,7 ± 8,4	34 ± 49000	0,030	0,829
60	$2,4 \cdot 10^{15} \pm 4,3 \cdot 10^{16}$	9,9 ± 4,8	35 ± 130	0,025	0,820
62	$5,0 \cdot 10^{13} \pm 6,4 \cdot 10^{14}$	8,7 ± 3,5	37 ± 110	0,033	0,814
65	$2,7 \cdot 10^9 \pm 1,4 \cdot 10^{10}$	5,9 ± 1,4	40 ± 69	0,030	0,798

Tabelle C.3: Regressionsparameter der Na(I) Titration von HEPES

T in °C	k_{eq} in mM	n	k_{A} in mM	FRET _{min}	FRET _{max}
21	$2,28 \pm 0,40$	$2,91 \pm 0,38$	$1,33 \pm 0,13$	-0,022	0,898
25	$1,67 \pm 0,24$	$2,87 \pm 0,35$	$1,20 \pm 0,09$	0,026	0,879
30	$13,4 \pm 5,0$	$3,58 \pm 0,58$	$2,06 \pm 0,46$	0,026	0,875
35	101 ± 120	$3,83 \pm 0,81$	$3,3 \pm 1,9$	0,022	0,873
40	237 ± 190	$2,72 \pm 0,39$	$7,5 \pm 4,3$	0,023	0,869
45	$7,6 \cdot 10^4 \pm 1,6 \cdot 10^5$	$4,25 \pm 0,74$	14 ± 14	0,024	0,860
50	$1,7 \cdot 10^{10} \pm 6,6 \cdot 10^{10}$	$7,9 \pm 1,4$	20 ± 21	0,030	0,849
52	$7,1 \cdot 10^9 \pm 2,8 \cdot 10^{10}$	$7,3 \pm 1,3$	23 ± 25	0,030	0,840
55	$2,2 \cdot 10^8 \pm 9,1 \cdot 10^8$	$5,9 \pm 1,3$	26 ± 35	0,028	0,830
57	$1,3 \cdot 10^8 \pm 4,2 \cdot 10^8$	$5,6 \pm 1,0$	29 ± 35	0,030	0,820
60	$1,3 \cdot 10^8 \pm 3,3 \cdot 10^8$	$5,36 \pm 0,71$	33 ± 31	0,032	0,799
62	$6,3 \cdot 10^7 \pm 1,3 \cdot 10^8$	$5,03 \pm 0,58$	35 ± 29	0,031	0,773

Tabelle C.4: Regressionsparameter der K(I) Titration von MOPS

T in °C	k_{eq} in mM	n	k_{A} in mM	FRET _{min}	FRET _{max}
22	$0,047 \pm 0,023$	$3,128 \pm 0,98$	$0,38 \pm 0,18$	0,074	0,900
25	$0,049 \pm 0,022$	$3,089 \pm 0,89$	$0,38 \pm 0,16$	0,051	0,891
30	$0,11 \pm 0,05$	$2,336 \pm 0,66$	$0,39 \pm 0,18$	0,039	0,890
35	$0,67 \pm 0,26$	$1,047 \pm 0,39$	$0,68 \pm 0,35$	0,033	0,886
40	$3,5 \pm 2,2$	$1,253 \pm 0,45$	$2,7 \pm 2,4$	0,032	0,882
45	2100 ± 3700	$3,936 \pm 0,87$	$7,0 \pm 6,0$	0,029	0,878
50	3200 ± 1900	$3,176 \pm 0,23$	$12,6 \pm 4,6$	0,031	0,874
52	$1,3 \cdot 10^4 \pm 9.000$	$3,307 \pm 0,23$	$17,7 \pm 7,0$	0,034	0,870
55	$3,2 \cdot 10^6 \pm 6,1 \cdot 10^6$	$4,708 \pm 0,59$	24 ± 20	0,034	0,865
57	$1,4 \cdot 10^7 \pm 2,2 \cdot 10^7$	$4,962 \pm 0,46$	28 ± 18	0,034	0,860
60	$9,9 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^7$	$4,636 \pm 0,33$	32 ± 16	0,036	0,854
62	$7,5 \cdot 10^6 \pm 7,4 \cdot 10^6$	$4,419 \pm 0,28$	36 ± 17	0,039	0,847
65	$9,2 \cdot 10^6 \pm 1,2 \cdot 10^7$	$4,315 \pm 0,35$	41 ± 25	0,036	0,821

Tabelle C.5: Regressionsparameter der Na(I) Titration von MOPS

T in °C	k_{eq} in mM	n	k_A in mM	FRET _{min}	FRET _{max}
22	$0,434 \pm 0,030$	$3,00 \pm 0,38$	$0,757 \pm 0,044$	0,182	0,901
25	$0,649 \pm 0,044$	$3,40 \pm 0,36$	$0,881 \pm 0,030$	0,147	0,900
30	$1,72 \pm 0,17$	$4,09 \pm 0,33$	$1,142 \pm 0,039$	0,089	0,898
35	$6,7 \pm 3,1$	$4,00 \pm 0,79$	$1,61 \pm 0,34$	0,048	0,895
40	$17,4 \pm 6,8$	$1,88 \pm 0,24$	$4,6 \pm 1,9$	0,038	0,891
45	780 ± 290	$2,86 \pm 0,15$	$10,2 \pm 2,6$	0,036	0,887
50	$6,2 \cdot 10^5 \pm 1,3 \cdot 10^6$	$4,34 \pm 0,65$	22 ± 20	0,040	0,881
52	$1,5 \cdot 10^{10} \pm 3,15 \cdot 10^{10}$	$7,18 \pm 0,67$	26 ± 16	0,038	0,877
55	$9,6 \cdot 10^9 \pm 1,64 \cdot 10^{10}$	$6,80 \pm 0,5$	29 ± 15	0,039	0,871
57	$5,1 \cdot 10^8 \pm 5,75 \cdot 10^8$	$5,75 \pm 0,33$	33 ± 13	0,040	0,866
60	$2,0 \cdot 10^8 \pm 1,78 \cdot 10^8$	$5,27 \pm 0,25$	37 ± 13	0,040	0,857
62	$4,1 \cdot 10^7 \pm 3,48 \cdot 10^7$	$4,73 \pm 0,23$	41 ± 15	0,040	0,849
65	$2,0 \cdot 10^6 \pm 1,54 \cdot 10^6$	$3,72 \pm 0,21$	49 ± 21	0,044	0,835

Tabelle C.6: Regressionsparameter der K(I) Titration mit TRIS HCl Puffer

T in °C	k_{eq} in mM	n	k_A in mM	FRET _{min}	FRET _{max}
23,5	$0,170 \pm 0,011$	$1,829 \pm 0,078$	$0,380 \pm 0,029$	0,042	0,837
25	$0,252 \pm 0,014$	$2,15 \pm 0,17$	$0,528 \pm 0,039$	0,043	0,814
30	$0,866 \pm 0,055$	$3,12 \pm 0,22$	$0,955 \pm 0,023$	0,031	0,794
35	$6,26 \pm 0,93$	$3,02 \pm 0,25$	$1,84 \pm 0,18$	0,024	0,774
40	59 ± 24	$3,11 \pm 0,28$	$3,72 \pm 0,90$	0,021	0,752
45	640 ± 440	$3,28 \pm 0,34$	$7,2 \pm 2,9$	0,021	0,730
50	4800 ± 3800	$3,15 \pm 0,28$	$14,7 \pm 7,2$	0,023	0,709
52	$1,9 \cdot 10^6 \pm 3,82 \cdot 10^6$	$4,85 \pm 0,67$	20 ± 17	0,026	0,695
55	$1,1 \cdot 10^7 \pm 2,73 \cdot 10^7$	$5,17 \pm 0,79$	23 ± 23	0,029	0,674
57	$4,7 \cdot 10^5 \pm 7,82 \cdot 10^5$	$4,01 \pm 0,51$	26 ± 22	0,027	0,655
60	$1,7 \cdot 10^5 \pm 1,78 \cdot 10^5$	$3,51 \pm 0,30$	31 ± 19	0,028	0,641
62	$1,6 \cdot 10^5 \pm 1,34 \cdot 10^5$	$3,37 \pm 0,24$	35 ± 18	0,028	0,629
65	$1,3 \cdot 10^5 \pm 9,14 \cdot 10^4$	$3,16 \pm 0,19$	42 ± 19	0,029	0,608

Tabelle C.7: Regressionsparameter der Na(I) Titration mit TRIS HCl Puffer

T in °C	k_{eq} in mM	n	k_A in mM	FRET _{min}	FRET _{max}
21,5	$0,062 \pm 0,014$	$2,85 \pm 0,55$	$0,378 \pm 0,100$	0,045	0,890
25	$0,07 \pm 0,02$	$2,67 \pm 0,59$	$0,37 \pm 0,12$	0,071	0,881
30	$0,234 \pm 0,031$	$1,92 \pm 0,28$	$0,469 \pm 0,085$	0,040	0,868
35	$1,63 \pm 0,22$	$1,81 \pm 0,22$	$1,31 \pm 0,14$	0,031	0,852
40	81 ± 87	$4,7 \pm 1,1$	$2,6 \pm 1,2$	0,026	0,835
45	$10,9 \pm 9,4$	$1,30 \pm 0,40$	$6,2 \pm 7,7$	0,028	0,817
50	$2,1 \cdot 10^8 \pm 1,3 \cdot 10^9$	$6,4 \pm 2,2$	19 ± 39	0,030	0,795
52	$9,9 \cdot 10^8 \pm 3,3 \cdot 10^9$	$6,7 \pm 1,1$	22 ± 22	0,032	0,779
55	$1,5 \cdot 10^8 \pm 3,1 \cdot 10^8$	$5,80 \pm 0,64$	26 ± 19	0,033	0,762
57	$4,0 \cdot 10^7 \pm 5,5 \cdot 10^7$	$5,21 \pm 0,42$	29 ± 16	0,031	0,746
60	$7,6 \cdot 10^7 \pm 8,2 \cdot 10^7$	$5,18 \pm 0,31$	33 ± 14	0,032	0,728
61,5	$3,0 \cdot 10^7 \pm 3,8 \cdot 10^7$	$4,79 \pm 0,35$	36 ± 19	0,037	0,711
65	$4,4 \cdot 10^6 \pm 4,3 \cdot 10^6$	$4,09 \pm 0,26$	42 ± 20	0,037	0,673

Anhang D: Fehlerrechnung

Mit Gleichung (D.1) kann der Fehler für die Konzentrationsbestimmung der DNA mittels β (Gleichung (4.1)). Der Fehler für β laut Bedienungsanleitung mit 2 % angenommen [19].

$$\Delta c_{\text{DNA}} = \pm \left| \frac{1}{M} \cdot \Delta \beta \right| \quad (\text{D.1})$$

Mit Gleichung (D.2) kann der Fehler für das Verhältnis von A260/280 bestimmt werden. Diese Rechnung ist analog für die Bestimmung des Fehlers von A260/230 anwendbar. Für die Abweichung der Absorption wurde die Standardabweichung der Messwerte gebildet.

$$\Delta A_{260/280} = \pm \left| \frac{1}{A_{280}} \cdot \Delta A_{260} \right| + \left| \frac{A_{260}}{A_{280}^2} \cdot \Delta A_{280} \right| \quad (\text{D.2})$$

Mit Gleichung (D.3) kann der Fehler für die Konzentrationsbestimmung mittels Absorption und ϵ bestimmt werden (Gleichung (4.3)). Für die Abweichung der Absorption wurde die Standardabweichung der Messwerte gebildet.

$$\Delta c(\text{DNA}) = \pm \left| \frac{1}{\epsilon_{\text{DNA}}} \cdot \Delta A_{260} \right| + \left| -\frac{CF_{\text{Cy3}}}{\epsilon_{\text{Cy3}}} \cdot \Delta A_{555} \right| \quad (\text{D.3})$$

Mit Gleichung (D.4) wurde der Fehler der Konzentration der Farbstoffe bestimmt.

$$\Delta c(\text{Cy3}) = \pm \left| \frac{1}{\epsilon_{\text{Cy3}}} \cdot \Delta A_{555} \right| \quad (\text{D.4})$$

In Gleichung (D.5) ist die Bestimmung des Fehlers der Markierungsgrad dargestellt.

$$\Delta = \pm \left| \frac{1}{c(\text{DNA})} \cdot c(\text{Cy3}) \right| + \left| \frac{c(\text{Cy3})}{c(\text{DNA})} \cdot \Delta c(\text{DNA}) \right| \quad (\text{D.5})$$

Die Fehler der Regressionsparameter der Hill-Funktion wurde mittels Python bestimmt. Dafür wurde *lmfit* verwendet [30].

```

1 filter_DNA = 'KCl'
2
3 temps = df_II["temperature ( C )"].unique()
4 num=-1
5 for i in temps[:]:
6     num+=1
7     filtered_df = df_II[(df_II["temperature ( C )"] == i) & (df_II["DNA"] ==
8         filter_DNA)].sort_values(["concentration (mM)"])
9     def hill_funktion(x,min,max, k_eq,n):
10        return min + (max - min) * (x**n / (k_eq+ x**n))
11    hill = lmfit.Model(hill_funktion)

```

```
11 pars = hill.make_params(min = dict(value = min(filtered_df["FRET"]), vary
    = False), max = dict(value = max(filtered_df["FRET"]), vary = False), k =
    dict(value = 1, min = 0.01), n = dict(value = 1, min = 0.01))
12 out = hill.fit(filtered_df["FRET"], pars, x=filtered_df["concentration (
    mM)"])
13 result = out.minimize()
14 print(i), print(lmfit.fit_report(result.params))
```

Für die Bestimmung des Fehlers von k_A wurde die Gleichung (D.6) verwendet.

$$\Delta k_A = \pm \left| \frac{k_{\text{eq}}^{\frac{1}{n}-1}}{n} \cdot \Delta k_{\text{eq}} \right| + \left| -\frac{k_{\text{eq}}^{\frac{1}{n}} \ln(k_{\text{eq}})}{n^2} \cdot \Delta n \right| \quad (\text{D.6})$$

Literaturverzeichnis

- [1] L. Stryer, *Stryer Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2018.
- [2] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer New York, NY, 2006.
- [3] „Puf6 primes 60S pre-ribosome nuclear export at low temperature.“, *Nat Commun*, Jg. 5, Nr. 2, S. 467–477, Feb. 2021, ISSN: 0006-2960. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24964-2>.
- [4] J. Meitzner, „Spektroskopische Charakterisierung eines DNA Hairpinmotivs“.
- [5] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer New York, NY, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5190-3>.
- [6] P. Heinrich, M. Müller und L. Graeve, Hrsg., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin, Heidelberg. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.
- [7] D. D. E., „A guide to ions and RNA structure“, Jg. 10,3, S. 335–343, 2004. DOI: 10.1261/rna.5205404. Adresse: <https://doi.org/10.1261/rna.5205404>.
- [8] J. C. Bowman, T. K. Lenz, N. V. Hud und L. D. Williams, „Cations in charge: magnesium ions in RNA folding and catalysis.“, *Current opinion in structural biology*, Jg. 22 3, S. 262–72, 2012. Adresse: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:30672881>.
- [9] J.-L. Mergny und L. Lacroix, „Analysis of Thermal Melting Curves“, *Oligonucleotides*, Jg. 13, Nr. 6, S. 515–537, 2003, PMID: 15025917. DOI: 10.1089/154545703322860825.
- [10] Lumiprobe. „Cyaninfarbstoffe“. (), Adresse: <https://de.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes> (besucht am 28.08.2023).
- [11] Lumiprobe. „Cy3 NHS ester“. (), Adresse: <https://de.lumiprobe.com/p/sulfo-cy3-nhs-ester> (besucht am 12.06.2023).
- [12] Lumiprobe. „Cy5 NHS ester“. (), Adresse: <https://de.lumiprobe.com/p/sulfo-cy5-nhs-ester> (besucht am 12.06.2023).
- [13] F. D. Steffen, R. K. O. Sigel und R. Börner, „An atomistic view on carbocyanine photophysics in the realm of RNA“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Jg. 18, S. 29 045–29 055, 42 2016. DOI: 10.1039/C6CP04277E. Adresse: <http://dx.doi.org/10.1039/C6CP04277E>.
- [14] L. J. Peter Atkins, „Chemie - einfach alles“, in R. Faust, Hrsg. Wiley-VCH, S. 477–484, ISBN: 978-3-527-31579-6.
- [15] R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön und E. Westhof, „Handbook of RNA Biochemistry“, en, in Wiley-VCH Verlag GmbH, 2015, S. 504, ISBN: 978-3-527-32776-8.
- [16] IDT, Techn. Ber., 2021.
- [17] IDT, Techn. Ber.
- [18] Sartorius, *Vivaspin 500 µl and 2 ml, Technical data and operating instructions*.
- [19] *NanoDrop One Bedienungsanleitung*, 2016.
- [20] T. F. Scientific, „Calculate dye-protein(F/P) molar ratios“, Techn. Ber., 2011.
- [21] C. R. G. +. C. KG, „Biologische Puffer“, Techn. Ber., 2016, S. 2.
- [22] *SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader User Guide*, 2022.

- [23] R. Börner, D. Kowerko, M. Hadzic, S. König, M. Ritter und R. Sigel, „Simulations of camera-based single-molecule fluorescence experiments“, *PLOS ONE*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195277>.
- [24] H. Bisswanger, „Enzymkinetik: Theorie und Methoden“, in Wiley-VCH, S. 30, ISBN: 9783527603299. DOI: <https://doi.org/10.1002/3527603298>.
- [25] Wikipedia, *Enzymkinetik — Wikipedia, die freie Enzyklopädie*, [Online; Stand 29. September 2023], 2023. Adresse: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Enzymkinetik&oldid=230410104%7D>.
- [26] F. D. Steffen, R. K. O. Sigel und R. Börner, „FRETraj: integrating single-molecule spectroscopy with molecular dynamics“, *Bioinformatics*, Jg. 37, Nr. 21, S. 3953–3955, Sep. 2021, ISSN: 1367-4803. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab615. eprint: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-pdf/37/21/3953/50337830/btab615.pdf>. Adresse: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab615>.
- [27] J. Arnemann, „DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung“, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A. M. Gressner und T. Arndt, Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, S. 719–719, ISBN: 978-3-662-48986-4. DOI: 10.1007/978-3-662-48986-4_3464. Adresse: https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464.
- [28] S. Loughrey und B. Matlock, *Acclaro phenol contaminant ID Detection of phenol in nucleic acid samples using the NanoDrop One spectrophotometer*. Adresse: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/TN52918-Acclaro-Phenol-Tech-Note-NanoDrop-One.pdf>.
- [29] S. Loughrey und B. Matlock, *Acclaro Protein Contaminant ID Detection of Protein in Nucleic Acid Samples Using the NanoDrop One Spectrophotometer*. Adresse: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/acclaro-protein-contaminant-id-detection-nucleic-acid-samples-TN52853.pdf>.
- [30] M. Newville, T. Stensitzki, D. B. Allen und A. Ingargiola, *LMFIT: Non-Linear Least-Square Minimization and Curve-Fitting for Python*, Version 0.8.0, Sep. 2014. DOI: 10.5281/zenodo.11813. Adresse: <https://doi.org/10.5281/zenodo.11813>.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich – Josephine Meitzner – an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt oder anderweitig veröffentlicht.

Mittweida, 30. September 2023

Ort, Datum



Josephine Meitzner