

Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren

Josephine Meitzner, Vanessa Schumann, Felix Erichson, Richard Börner

Laserinstitut Hochschule Mittweida | Mittweida University of Applied Sciences

Abstract

Ensemble FRET ist eine etablierte Methode zur thermodynamischen Charakterisierung von Biomolekülen, insbesondere von Nukleinsäuren (NA). Hier soll die Faltungsdynamik einer DNA-Doppelhelix (Duplex) untersucht werden, welche mit zwei Fluorophoren Cy3 als Donor und Cy5 als Akzeptor markiert ist. Durch die Zugabe von monovalenten Metallionen wie K(I) oder Na(I) soll der Faltungszustand und damit die Stabilität der DNA mittels FRET temperaturabhängig charakterisiert werden. Unser Ziel ist es einen zuverlässigen NA-FRET Standard für die thermodynamische Charakterisierung von Nukleinsäuren mittels FRET zu etablieren.

1 Einleitung

Der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist eine etablierte fluoreszenzspektroskopische Methode zur Charakterisierung von Biomolekülen, wie Nukleinsäuren und Proteinen [1]. Dafür wird das Biomolekül mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen, d. h. einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff mit spektralem Überlapp, markiert. Wird der Donorfarbstoff mithilfe einer passenden Lichtquelle angeregt, wird ein Teil der Energie strahlungslos durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Förstermechanismus) auf den Akzeptorfarbstoff übertragen. Dafür müssen sich die Farbstoffe in unmittelbarer räumlicher Nähe (2-10 nm) zueinander befinden. Durch den Anteil der Akzeptorfluoreszenzemission relativ zur Gesamtemission kann FRET und unter bestimmten Annahmen auch der Abstand der Fluorophore zueinander berechnet werden (Abbildung 1a). Bei geeigneter Wahl der Farbstoffposition kann so der Faltungszustand des Biomoleküls beobachtet werden [2].

Die DNA ist eines der wesentlichen (Bio-)moleküle in der Natur. Ausgehend von der Primärstruktur, also der Basenabfolge oder Sequenz, bildet sie mittels komplementärer Basenpaarung nach Watson-Crick eine Doppelhelix. Die Bildung der Doppelhelix (*double stranded* DNA, dsDNA) aus einem Einzelstrang (*single stranded* DNA, ssDNA) ist dabei abhängig von den äußeren Bedingungen, wie der Temperatur und der Konzentration monovalenter Metallionen wie K(I) und Na(I).

FRET wird häufig für die thermodynamische Charakterisierung von Nukleinsäuren verwendet [3]. Dabei kommen Fluoreszenzspektrometer zum Einsatz, die i. d. R. mittels einer Standardprobe kalibriert werden müssen, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern [2; 4]. Hier wird eine Fluoreszenzfarbstoff-markierte DNA-Sequenz vorgestellt, die für die temperaturabhängige Kalibrierung von Fluoreszenzspektrometern genutzt werden soll. Dafür wird der Faltungsprozess einer ssDNA zu einer dsDNA in Abhängigkeit von der Temperatur und der monovalenter Metallionenkonzentration untersucht.

2 Methoden

2.1 Untersuchte DNA-Sequenz und Farbstoffpositionen

Als FRET-Standardprobe soll ein fluoreszenzmarkierter DNA-Einzelstrang dienen (Abbildung 1). DNA ist nicht anfällig gegenüber Degradation und bildet bei entsprechend gewählter Basensequenz eine Doppelhelix. Hier werden die beiden Stränge der Helix durch eine Haarnadelschleife miteinander verbunden. Dies ermöglicht die Beobachtung der Faltung als intramolekulare Reaktion. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Positionierung der Farbstoffe an der DNA, um einen möglichst großen Unterschied des FRET-Werts beim Übergang von der ungefalteten (ssDNA) zur gefalteten (dsDNA) Struktur zu messen. Dafür wurde mittels PyMol das Strukturmodell der DNA-Sequenz erstellt. Die ssDNA wurde in Form einer einzelsträngigen B-Helix (Abbildung 1c) und die dsDNA als doppelsträngige B-Helix mit einem Haarnadelmotiv (Abbildung 1d) erzeugt [5]. Mittels FRETraj wurden die beiden Strukturen *in silico* mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert

und anschließend der zu erwartende, mittlere FRET-Wert berechnet [6]. Dafür wurde das sterisch zugängliche Volumen des Farbstoffs (*free*, *FV* oder *accessible volume*, *AV*) und dessen mögliche Kontakt- bzw. Interaktionsfläche (*contact volume*, *CV*) an der DNA bestimmt. Das sich daraus ergebende *accessible contact volume* (*ACV*) dient als Farbstoffmodell und ermöglicht eine genaue Vorhersage von FRET in der jeweiligen DNA-Konformation [7]. Die fluoreszenzmarkierte DNA-Probe wurde bei Integrated DNA Technologies (IDT) erworben [8] und mittels Vivaspin Zentrifugalfilter entsalzt bevor die finale Salzkonzentration eingestellt wird.

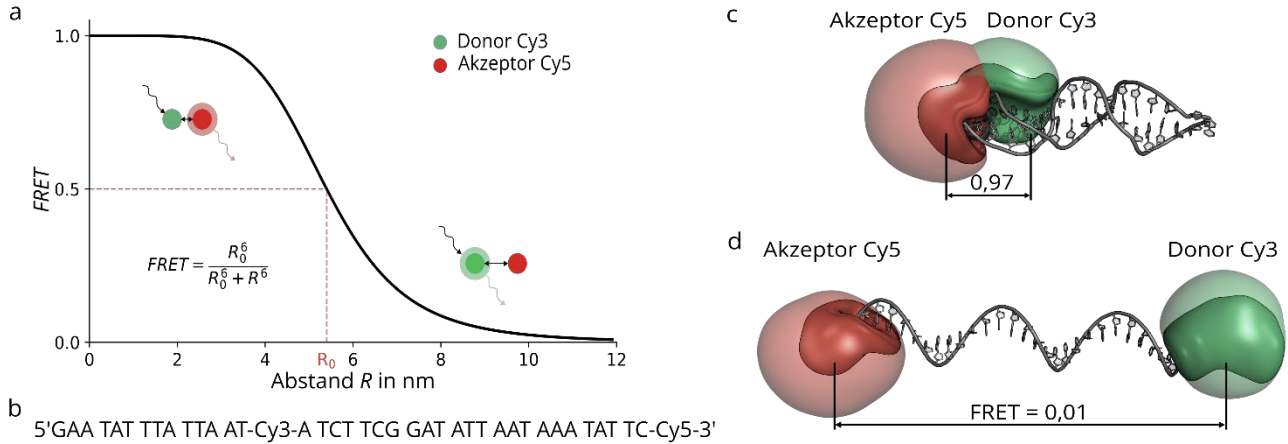


Abbildung 1a: FRET in Abhängigkeit des Fluorophorabstandes von Cy3 und Cy5 mit einem Försterradius $R_0 = 5,4$ nm [9]. b: Sequenz des DNA-FRET-Standards. c: Darstellung des DNA-Doppelstrangs mit den Fluorophoren Cy3 und Cy5, dem entsprechenden ACV-Modell der Farbstoffe und des mittels FRETraj berechneten FRET-Werts. d: ssDNA analog zu c [6].

2.2 Bestimmung des Markierungsgrads einer fluoreszenzmarkierten DNA-Probe

Zur Bestimmung des Markierungsgrades der mittels Vivaspin aufgereinigten, entsalzten, fluoreszenzmarkierten DNA wurde das Absorptionsspektrum einer 100 nM Probe in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 850 nm gemessen (NanoDrop One, Thermofisher) und die Absorption bei 260 nm, 555 nm und 646 nm bestimmt. Mittels der bekannten dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ und des Lambert-Beer-Gesetzes $c = \frac{A}{L \cdot \epsilon}$ wurde sowohl die Farbstoff-korrigierte Konzentration der DNA ($\epsilon = 405\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [8] und die Konzentration der beiden Farbstoffe Cy3 ($\epsilon = 150\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [10] und Cy5 ($\epsilon = 250\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [11] bestimmt. Damit wird der Markierungsgrad der Probe $\frac{c_{\text{Cy3/Cy5}}}{c_{\text{DNA}}} = \frac{A_{\text{Cy3/Cy5}}}{\epsilon_{\text{Cy3/Cy5}} \cdot c_{\text{DNA}}}$ berechnet [2; 12].

2.3 Thermodynamische Charakterisierung der DNA mittels FRET

Für die Bestimmung der experimentellen FRET-Werte wurden die Fluoreszenzintensitäten der Farbstoffe Cy3 und Cy5 für die DNA bei verschiedenen Metallionenkonzentrationen $[\text{K}(\text{I})]$ oder $[\text{Na}(\text{I})] = 0 \dots 516$ mM in HEPES-Puffer pH 7,4 bei verschiedenen Temperaturen $T = 21 \text{ }^\circ\text{C} - 65 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen (Fluoreszenzplattenlesegerät ID5, Mol. Devices). Dafür wurden die Fluoreszenzintensitäten für die Donor-Emission $I_{\text{D,ex}}^{\text{D,em}}$ und Akzeptor-Emission $I_{\text{D,ex}}^{\text{A,em}}$ bei Donor-Anregung sowie die Akzeptor-Emission $I_{\text{A,ex}}^{\text{A,em}}$ bei Akzeptor-Anregung gemessen. Dafür wurde sowohl der Fluoreszenzhintergrund (*background*) im jeweiligen Kanal, die Kanalüberlappung (*spectral cross-talk*) zusammengesetzt aus *bleed-through* (bt) des Donorfarbstoffs (Cy3) und *direct excitation* (dE) des Akzeptorfarbstoffs (Cy5) und die Fluoreszenzintensitäten nach Standardprotokollen zu $bt_{\text{D}} = 0,09532$ und $dE_{\text{A}} = 0,05151$ bestimmt, korrigiert und FRET ohne sogenannte gamma-Korrektur berechnet [13]

$$FRET = \frac{I_{\text{D,ex}}^{\text{A,em}}}{I_{\text{D,ex}}^{\text{D,em}} + I_{\text{D,ex}}^{\text{A,em}}} \quad (1)$$

2.4 Datenanalyse

Die Stabilisierung der DNA-Duplex-Struktur durch die Zugabe von monovalenten Metallionen entspricht einer Liganden-Rezeptor-Bindung. Die DNA fungiert als Rezeptor für die Metallionen (Liganden) und wird mit einer Hill-Funktion beschrieben [3; 14]

$$FRET = FRET_{\min} + (FRET_{\max} - FRET_{\min}) \cdot \frac{[K^+]^n}{K_{\text{eq}} + [K^+]^n} \quad (2)$$

Der Hill-Koeffizient n gibt den Anstieg der Funktion im Wendepunkt der S-Kurve an und ist ein Maß für die Anzahl an Liganden. K_{eq} ist die Gleichgewichtskonstante (*equilibrium constant*). Mit den bestimmten Regressionsparameter K_{eq} und n wird die Ligandenkonzentration bei halber Besetzung der Bindungsstellen $K_A = \sqrt[n]{K_{\text{eq}}}$ bestimmt [3].

3 Ergebnisse

Die Modellstrukturen des NA-FRET-Standards im ungefalteten (ssDNA) und gefalteten (dsDNA) Zustand ergeben einen FRET-Wert von 0,01 und 0,97. Dieser FRET-Wert entspricht der Transfereffizienz E nach Förster bzw. einem idealen FRET-Experiment bei isotroper Farbstofforientierung ($\kappa = 0,66$), idealen Farbstoffen ($QY = 1$) und einer spektral unabhängigen Detektionseffizienz ($\gamma = 1$).

Die Berechnung des Markierungsgrades der DNA-Probe ergab, dass $89 \pm 15 \%$ der Moleküle mit Cy3 und $96 \pm 11 \%$ der Moleküle mit Cy5 markiert wurden. Auf eine Korrektur der FRET-Werte bzgl. des einzelmarkierten Anteils wurde dahingehend verzichtet.

In Abbildung 2 werden die mit Gleichung 1 berechneten und korrigierten FRET-Werte in Abhängigkeit der $K(I)$ -Konzentration in einem Temperaturbereich von 21 °C (Raumtemperatur, RT) bis 65 °C dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit steigender $K(I)$ -Konzentration der FRET-Wert zunimmt. Bei Raumtemperatur und ohne Metallionenhintergrund, also gelöst in diH_2O , liegt der FRET-Wert bei 0,04. Mit steigender $K(I)$ -Konzentration beginnt der FRET-Wert bis zu einer Konzentration von 4,14 mM auf 0,85 zu steigen. Mit steigender Temperatur steigen die FRET-Werte erst mit höheren $K(I)$ -Konzentration an. Bei hohen $K(I)$ -Konzentration ($> 50 \text{ mM}$) sind die FRET-Werte nahezu unabhängig von dem untersuchten Temperaturbereich.

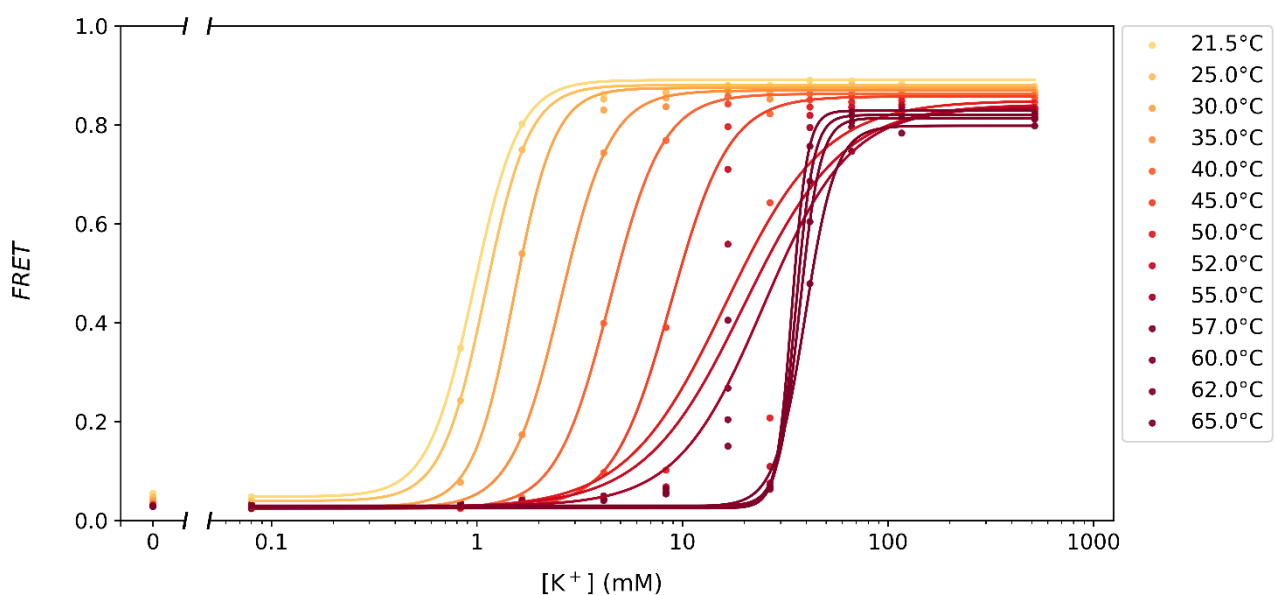


Abbildung 2: FRET in Abhängigkeit der $K(I)$ -Konzentration, in einem Temperaturbereich von 21,5 °C bis 65 °C für die DNA-Probe, mit HEPES-Puffer, bei einem pH-Wert von 7,4. Mit angepasster Hill-Funktion für die jeweiligen Temperaturen [15].

An die FRET-Werte wurden bei verschiedenen Temperaturen eine Hill-Funktion nach Gleichung 2 angepasst. In Abbildung 3 sind die Regressionsparameter für die Hill-Funktion (n , K_{eq}) sowie die berechnete Assoziationskonstante K_A in Abhängigkeit der Temperatur für die K(I)- und Na(I)-Titration dargestellt. Das Modell der Hill-Funktion passt bis zu einer Temperatur von 40 °C sehr gut zu den FRET-Messwerten, bei höheren Temperaturen weicht die angepasste Funktion jedoch immer stärker von den Messwerten ab und die Regressionsparameter n und K_{eq} schwanken stark. Diese Schwankungen sind für K_A nicht sichtbar; die Schwankungen von n und K_{eq} gleichen sich demnach gegenseitig aus. K_A bleibt bis zu einer Temperatur von 35 °C nahezu konstant bei 2 mM und steigt dann bei steigender Temperatur linear bis auf 40 mM unabhängig vom jeweiligen monovalenten Metallion an.

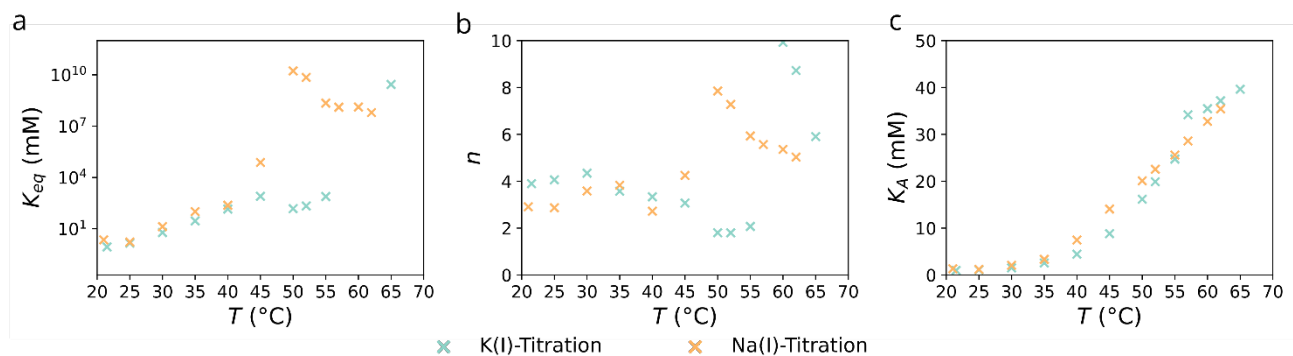


Abbildung 3: Darstellung der Regressionsparameter der Hill-Funktion und der daraus bestimmten Assoziationskonstante K_A für die K(I)-Titration (blau) und die Na(I)-Titration (orange). Der Regressionsfehler für K_{eq} und n liegt bei niedrigen Temperaturen unter 10 %. Bei Raumtemperatur und K(I)-Hintergrund ergibt sich $K_{eq}(T = 21 \text{ °C}) = 0,871 \text{ mM} \pm 0,056 \text{ mM}$ und $n(T = 21 \text{ °C}) = 3,89 \text{ mM} \pm 0,025 \text{ mM}$. Der Regressionsfehler nimmt mit steigender Temperatur zu. Bei Temperaturen über 40 °C liegt der Regressionsfehler für K_{eq} bei über 100 % und für n zwischen 25 % und 50 %. Der pH-Wert ist 7,4 und wurde mittels eines HEPES-Puffers eingestellt (16 mM monovalenter Metallionenhintergrund). a: K_{eq} , b: n und c: K_A in Abhängigkeit von der Temperatur T .

4 Diskussion

4.1 K(I) und Na(I) führen zur stabilen Faltung der dsDNA

Es wurde der Einfluss von Kalium- und Natriumionen auf die temperaturabhängige Faltung einer ssDNA untersucht. Kalium- und Natriumionen besitzen eine geschlossene elektronische Schalenstruktur und interagieren hauptsächlich durch Coulomb-Interaktionen mit Atomen oder Molekülen [16]. Es wurde erwartet, dass durch die Zugabe von K(I) bzw. Na(I) die Bildung des DNA-Duplex stabilisiert wird, da die positiv geladenen Metallionen das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA-Sequenz elektrostatisch abschirmen [17]. Dieses Verhalten der DNA konnte mittels FRET nachgewiesen werden (Abbildung 2). Bei Raumtemperatur und einer geringen K(I)-Konzentration ist der FRET-Wert sehr gering. Daraus kann geschlossen werden, dass der Abstand der Farbstoffe groß zueinander ist und die DNA ungefalt und damit als ssDNA vorliegt. Mit steigender K(I)-Konzentration beginnt sich die ssDNA zur dsDNA zu falten, wodurch der FRET-Wert im Mittel ansteigt. Im Übergangsbereich liegen die beiden Zuständen ssDNA und dsDNA also gemeinsam, aber unterschiedlich populiert vor, bis die DNA schließlich vollständig in den gefalteten Zustand der Doppelhelix übergeht.

4.2 Temperaturerhöhung wirkt der Bildung von dsDNA entgegen

Neben der K(I)- bzw. Na(I)-Abhängigkeit wurde auch FRET in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. Dabei ist zu erkennen, dass mit steigender Temperatur FRET erst mit höheren K(I)-Konzentrationen ansteigt (Abbildung 2). Durch die Erhöhung der Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den organischen Basen aufgeschmolzen, da die zugeführte Energie höher ist als die Bindungsenergie zwischen den Basen [18]. Die Temperaturerhöhung wirkt der Stabilisierung durch monovalente Metallionen entgegen. Dieser Effekt wird ab einer Temperatur von 35 °C sichtbar. Unterhalb dieser Temperatur ist die notwendige Konzentration

an monovalenten Metallionen K_A zur Stabilisierung der Duplexstruktur konstant. Oberhalb dieser Temperatur steigt K_A linear an.

4.3 Beurteilung der Regressionsparameter der Hill-Funktion

Die Anpassung der Hill-Funktion nach Gleichung 2 an die Messwerte soll einen besseren Vergleich von verschiedenen Messungen ermöglichen. Bis zu einer Temperatur von 40 °C ist eine gute Anpassung der Hill-Funktion möglich. Bei höheren Temperaturen ist eine deutliche Abweichung der Funktion von den Messwerten zu erkennen und die Regressionsparameter (n , K_{eq}) schwanken stark. Dieser Effekt gleicht sich jedoch bei der Berechnung von K_A aus. Damit ist die mittlere Metallionenkonzentration beim Übergang von ssDNA zu dsDNA sehr gut bestimmbar.

4.4 FRET-Vorhersage stimmt mit Experiment überein

Die experimentell ermittelten FRET-Werte stimmen gut mit den theoretischen FRET-Werten überein. Mögliche Abweichungen sind dadurch zu erklären, dass die Bestimmung über die ACV nur eine Momentaufnahme der Struktur zeigt und im Experiment auch Dynamiken der DNA gemessen worden sind. Weiterhin wurde im Experiment keine gamma-Korrektur und keine Korrektur der Markierungseffizienz durchgeführt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von monovalenten Metallionen die Bildung des DNA-Duplex stabilisiert und in einem Temperaturbereich bis 65 °C gemessen werden kann. Dabei ist eine minimale Konzentration von 1,66 mM K(I) bzw. Na(I) notwendig. Im Experiment konnten dabei klare Unterschiede in den FRET-Werten des gefalteten und ungefalteten Zustandes gemessen werden. Demnach eignet sich die hier untersuchte fluoreszenzmarkierte DNA-Probe als FRET-Standard für die Kalibrierung von Fluoreszenzspektrometern.

6 Danksagung / Angaben zu Fördermittelgebern

J.M. bedankt sich für die finanzielle Unterstützung durch das Ausbildungsstipendium des Vereins Laserinstitut Mittelsachsen e.V. R.B. bedankt sich für die finanzielle Unterstützung durch die Hochschule Mittweida sowie die Kofinanzierung durch die Europäische Union und durch Steuermittel auf der Grundlage des vom Sächsischen Landtag beschlossenen Haushaltes (ESF Plus Nachwuchsforscher:innengruppe LaNa-Sax).

7 Literaturverzeichnis

- [1] Förster, Th. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik* 437 (1-2), S. 55–75.
- [2] Lakowicz, Joseph R. (2010): Principles of fluorescence spectroscopy, Third edition, corrected at 4th printing 2010. New York Springer.
- [3] Gerhardy, Stefan; Oborská-Oplová, Michaela; Gillet, Ludovic; Börner, Richard; van Nues, Rob; Leitner, Alexander et al. (2021): Puf6 primes 60S pre-ribosome nuclear export at low temperature. In: *Nature communications* 12 (1), S. 4696.
- [4] Anne Katrin Winkler (2021): Characterization of metal ion dependent binding and folding of a ribosomal tertiary contact by optical spectroscopy, Masterarbeit, Hochschule Mittweida | University of Applied Sciences, Mittweida, Laserinstitut Hochschule Mittweida.
- [5] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger LCC.
- [6] Steffen, Fabio D.; Sigel, Roland K. O.; Börner, Richard (2021): FRETraj: integrating single-molecule spectroscopy with molecular dynamics. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 37 (21), S. 3953–3955.

- [7] Steffen, Fabio D.; Cunha, Richard A.; Sigel, Roland K.O.; Börner, Richard (2023): FRET-guided modeling of nucleic acids. In: *Biorxiv* <https://doi.org/10.1101/2023.08.07.552238>.
- [8] Integrated DNA Technologies: OligoAnalyzer™ Tool. Online verfügbar unter <https://eu.idtdna.com/site/order/oligoentry>, zuletzt geprüft am 14.03.2024.
- [9] R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön und E. Westhof (221E2015): Handbook of RNA biochemistry, Second, completely revised and enlarged edition. Weinheim, Germany Wiley-VCH.
- [10] Lumiprobe (2024): Cy3 NHS ester. Online verfügbar unter <https://de.lumiprobe.com/p/cy3-nhs-ester>, zuletzt aktualisiert am 12.03.2024.
- [11] Lumiprobe: Cy5 NHS ester. Online verfügbar unter <https://de.lumiprobe.com/p/cy5-nhs-ester>, zuletzt geprüft am 12.03.2023.
- [12] Thermofisher (2011): Calculate dye:protein (F/P) molar ratios.
- [13] Börner, Richard; Kowerko, Danny; Hadzic, Mélodie C. A. S.; König, Sebastian L. B.; Ritter, Marc; Sigel, Roland K. O. (2018): Simulations of camera-based single-molecule fluorescence experiments. In: *PLoS one* 13 (4), e0195277.
- [14] Bisswanger, Hans (2005): Enzymkinetik, Theorie und Methoden, 3., völlig neu bearb. Aufl. Weinheim Wiley-VCH.
- [15] Josephine Meitzner (2023): Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren, Bachelorarbeit, Hochschule Mittweida | University of Applied Sciences, Laserinstitut Hochschule Mittweida.
- [16] Draper, David E. (2004): A guide to ions and RNA structure. In: *RNA (New York, N.Y.)* 10 (3), S. 335–343.
- [17] J. C. Bowman, T. K. Lenz, N. V. Hud und L. D. Williams (2012): Cations in charge: magnesium ions in RNA folding and catalysis. In: *Current opinion in structural biology*, S. 262–272.
- [18] Cantor, Charles R.; Saenger, Wolfram (1984): Principles of Nucleic Acid Structure. New York, NY Springer New York.