

Zeitaufgelöste Charakterisierung struktureller Änderungen von spezifisch modifizierter RNA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Goethe-Universität Frankfurt am Main

von
Henrik Gustmann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2018
(D30)

Vom Fachbereich 14 der
Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Prisner

Datum der Disputation: _____

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	RNA-Label - ζ_m^f und ζ_m	4
2.2	Nukleinsäuren	6
2.2.1	Das Zentrale Dogma der Molekularbiologie und die RNA-Welt-Theorie	6
2.2.2	Vergleich von Aufbau und Struktur der Nukleinsäuren DNA und RNA	6
2.2.3	RNA-Typen und -Funktionen	8
2.2.4	Riboschalter	8
2.3	Mikrobielle Rhodopsine	13
2.3.1	Proteorhodopsine	13
2.3.2	Channelrhodopsine	15
2.4	Spektroskopische Grundlagen	17
2.4.1	Absorption von elektromagnetischer Strahlung	17
2.4.2	Folgeprozesse der Absorption: nichtstrahlende und strahlende Deaktivierung	18
2.4.3	Fluoreszenzeigenschaften	23
2.5	Infrarot-Spektroskopie	26
2.5.1	Grundlagen der Infrarot-Spektroskopie	26
2.5.2	Infrarot-Strahlungsquelle und Detektoren	27
2.5.3	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie	28
2.5.4	Abgeschwächte Totalreflexion	31
2.6	Grundlagen der zeitaufgelösten Spektroskopie	32
2.6.1	Anregungs-Abtast-Experimente	32
2.6.2	Nichtlineare Optik	32
2.6.3	Laser	35
2.7	Reaktionskinetiken	39
2.7.1	Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit	39
2.7.2	Reaktionsordnungen	39
2.7.3	Reaktionsmechanismen	41
3	Material und Methoden	43
3.1	Statische Infrarot-Spektroskopie	43
3.1.1	Labor-Infrastruktur	43
3.1.2	FTIR-Spektrometer	44
3.1.3	Sandwichküvetten	45
3.1.4	Aufnahme und Korrektur stationärer Spektren	45
3.2	Statische UV/vis-Spektroskopie	47
3.2.1	Aufnahme und Korrektur stationärer Spektren	47
3.2.2	Auswertung von Schmelzexperimenten	48
3.2.3	Fluoreszenzquantenausbeutemessung	49

3.2.4	Fluoreszenzanisotropiemessung	49
3.2.5	Aufnahme stationärer UV/vis-Tieftemperaturabsorptionsspektren	50
3.3	Zeitaufgelöste UV/vis-Spektroskopie	53
3.3.1	Ultraschnelle transiente Absorptionsspektroskopie	53
3.3.2	Fluoreszenzlebensdauermessungen	55
3.3.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie	57
3.3.4	Phosphoreszenzlebensdauermessungen	58
3.3.5	Fluoreszenz-Stopped-Flow	59
3.4	Cryotrapping	62
3.4.1	Messung eines Dunkelspektrums	62
3.4.2	Belichtungsmethoden	62
3.4.3	Temperaturrexperimente	63
3.4.4	Datenkorrektur und Auswertung	63
3.5	Probenpräparation	64
3.5.1	RNase-freies Arbeiten	64
3.5.2	FTIR-Proben	64
3.5.3	ζ_m^f - und ζ_m -Proben	65
3.5.4	Proteinproben	66
4	Ergebnisse	68
4.1	FTIR-Spektroskopie an RNA	68
4.1.1	Mononukleotide	68
4.1.2	Modellstränge	70
4.1.3	Purinbindende Aptamere	74
4.1.4	Zusammenfassung und Fazit	78
4.2	ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel	79
4.2.1	Photophysik und Quenchingmechanismus	79
4.2.2	ζ_m^f in RNA-Modellsequenzen	93
4.2.3	ζ_m^f im neomycinbindenden Aptamer	106
4.2.4	Zusammenfassung und Fazit	117
4.3	Cryotrapping von Proteinen	118
4.3.1	Optimierung der Methode	118
4.3.2	GPR	121
4.3.3	GPR _{E108Q}	126
4.3.4	ChR2	131
4.3.5	Fazit und Ausblick	134
5	Resümee und Ausblick	135
5.1	FTIR-Spektroskopie an RNA	135
5.2	ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel	135
5.3	Cryotrapping von Proteinen	138
6	Literaturverzeichnis	139

7	Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8	Anhang	150
8.1	ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel	150
8.1.1	Photophysik und Quenchingmechanismus.....	150
8.1.2	ζ_m^f in RNA-Modellsequenzen	152
8.1.3	ζ_m^f im neomycinbindenden Aptamer.....	158
9	Indices	168
9.1	Abkürzungsverzeichnis	168
9.2	Abbildungsverzeichnis	173
9.3	Tabellenverzeichnis.....	176
10	Wissenschaftliche Beiträge.....	178
10.1	Eigene Publikationen in Zusammenhang mit dieser Arbeit.....	178
10.2	Andere eigene Publikationen.....	178
10.3	Wissenschaftliche Vorträge und Präsentationen.....	178
11	Eidesstattliche Erklärung	179
12	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung und Motivation

Einer der wichtigsten Sinne des Menschen ist von jeher das farbige Sehen. Dementsprechend lernen schon Kinder ganz intuitiv, Dinge aufgrund ihrer Farbe und Farbtintensität zu erkennen, zu unterscheiden und zu beurteilen. Dies ist wichtig, um zum Beispiel die Qualität von Nahrungsmitteln beurteilen oder um ganz allgemein Gefahren in der Umwelt erkennen zu können.

Ausgehend von diesen Überlegungen ist es nicht verwunderlich, dass die optische Spektroskopie eine der ältesten und etabliertesten qualitativen und quantitativen Analysemethoden ist. Schließlich basiert diese Methode prinzipiell auf der Beurteilung von Farbe und Farbtintensität der untersuchten Proben. Allgemein ist es hierbei also möglich, Substanzen auf Grundlage der Lage und Form ihres Absorptions- bzw. Emissionsspektrums zu identifizieren. Diese Eigenschaften sind wiederum auf Zustandsänderungen der äußeren Elektronen der beobachteten Atome oder Moleküle zurückzuführen. Außerdem kann, basierend auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetz, eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen werden. Dabei sind die vielen Methoden der optischen Spektroskopie vergleichsweise zeitsparend sowie instrumentell verhältnismäßig einfach und kostengünstig. Außerdem wird nur relativ wenig Probe für eine Untersuchung benötigt, die darüber hinaus auch noch weitgehend zerstörungsfrei abläuft. Aufgrund dieser Vorteile findet die optische Spektroskopie breite Anwendung in Industrie, Medizin, Umweltschutz und Forschung.

So spielt optische Spektroskopie auch eine große Rolle bei der Erforschung von biologischen Prozessen und Substanzen, als Beispiel seien hier zunächst der Sehprozess oder die Photosynthese genannt. Dabei geht man aber weit über die grundlegende qualitative und quantitative Analyse einzelner Stoffe hinaus, sodass man Struktur- und Dynamikinformationen erhält. Entsprechend bekam das Feld unter anderem durch die Entwicklung von zeitaufgelösten Methoden einen großen Schub. Hierbei spielten unter anderem die Entwicklung der Blitzlichtphotolyse (Eigen, Norrish, Porter, 1949; Nobelpreis 1967)^{1,2}, des Lasers (Maiman, 1960)³, der Laserspektroskopie (Bloembergen, Schawlow; Nobelpreis 1981) sowie der Femtosekundenspektroskopie (Zewail; Nobelpreis 1999) eine entscheidende Rolle.⁴

Trotz dieser Weiterentwicklungen ergeben sich für die optische Spektroskopie bei einigen biologischen Molekülen, wie z.B. Nukleinsäuren, konzeptionelle Probleme, da diese im sichtbaren Spektralbereich keine Absorption oder Emission zeigen. Dementsprechend muss hier nicht nur der sichtbare (vis) Bereich des elektromagnetischen Spektrums untersucht werden, sondern auch der ultraviolette (UV) und infrarote (IR) Spektralbereich.

Speziell im Fall von Nukleinsäuren sind allerdings die zu beobachtenden Änderungen im UV-Bereich (260 nm), zum Beispiel im Fall einer Ligandenbindung, sehr unspezifisch. Außerdem zeigen weder die Nukleinsäuren noch ein Großteil der Liganden eine Emission. Trotzdem wird UV/vis-Spektroskopie weithin in der Nukleinsäureforschung eingesetzt. Um dies zu ermöglichen, gibt es verschiedenste Herangehensweisen.

Weit verbreitet sind z.B. die unspezifische oder auch die spezifische Markierung von Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Markermolekülen, man spricht in diesem Zusammenhang von Fluoreszenzlabeln. Das Fluoreszenzsignal dieser Marker (Label) zeigt wesentliche, spezifische Änderungen bei Bindungsprozessen von Liganden oder Hybridisierungen. Hierbei können vor allem die spezifisch angebrachten Marker als lokale Sonden dienen. Eine Voraussetzung dafür ist allerdings, dass man die Eigenschaften dieser Marker möglichst genau kennt.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Nukleinsäuren ist die IR-Spektroskopie. Im Unterschied zur UV/vis-Spektroskopie untersucht man hierbei keine Zustandsänderungen der äußeren Elektronen, sondern Änderungen des Schwingungszustands des Moleküls. Deshalb sind prinzipiell keine Modifikationen, wie das Anbringen von Markern, nötig, um spezifische Informationen mittels IR-Spektroskopie zu erlangen. Allerdings erhält man bei größeren Makromolekülen eine Vielzahl von IR-Absorptionsbanden. Dementsprechend ist hier die Signalzuordnung und Interpretation besonders kritisch. Als Interpretationshilfe müssen deshalb häufig Vergleichsspektren für jede Probenart erzeugt und ausgewertet werden.

Verschiedene Hilfsmittel und Verfahren ermöglichen also den Einsatz von statischer und zeitaufgelöster optischer Spektroskopie in der Nukleinsäureforschung. Hierbei wird sie in Kombination mit vielen anderen analytischen Methoden wie z.B. der Elektronenspinresonanz (*electron paramagnetic resonance*, EPR), der Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) oder der Massenspektrometrie (MS) eingesetzt.

Nukleinsäuren sind seit Jahrzehnten ein Schwerpunkt internationaler Forschungsprojekte. Während Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) hauptsächlich als relativ haltbarer Speicher der

Erbinformationen dient, kann die wesentlich fragilere Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) genetische Informationen übertragen und dient dabei als Vermittler bei der Proteinbiosynthese. Das sogenannte „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“ wurde 1958 von Francis Crick aufgestellt und beschreibt im Prinzip diesen Informationstransfer.⁵ Demnach kann DNA repliziert oder in RNA transkribiert werden. Die RNA wird dann zu einem Protein translatiert. Ein Informationsfluss vom Protein zur DNA oder RNA, also zum Erbgut, ist somit nach dem Dogma nicht möglich.

RNA wirkt allerdings nicht nur als Informationsüberträger, sondern kann auch katalytische oder genregulatorische Funktionen haben. Diesen katalytischen und regulatorischen Funktionen wird großes wissenschaftliches Interesse entgegengebracht, um zunächst die Regulierungsmechanismen innerhalb von Zellen besser verstehen zu können. Weiterführend könnten sich dadurch eventuell Ansatzpunkte für Krankheitstherapien und Medikamente finden lassen.

Außerdem sind diese regulatorischen Eigenschaften essenziell für die sogenannte „RNA-Welt-Theorie“.^{6,7} Demnach basierte das erste Leben auf der Erde hauptsächlich auf RNA. Damit dies möglich ist, muss RNA nicht nur in der Lage sein, genetische Informationen zu konservieren und zu übertragen, sondern RNA muss sich selbst auch replizieren und modifizieren können (Ribozyme; Nobelpreis 1989, Altman, Cech).^{8,9} Dementsprechend muss es in RNA auch Mechanismen zur Kontrolle von chemischen Prozessen geben. Nur so könnte ein auf RNA basierender Organismus auf Umwelteinflüsse reagieren,¹⁰ was eine Grundvoraussetzung des Lebens darstellt. Genau diese Aufgaben können regulatorische RNAs, wie die sogenannten Riboschalter (auch *Riboswitches*), übernehmen.^{11–14}

Riboschalter findet man in der 5'-untranslatierten Region (*untranslated region*, UTR) bakterieller mRNAs.¹⁰ Diese Moleküle sind komplett aus RNA aufgebaut und man kann sie sich als molekulare Schalter vorstellen, die die Genexpression kontrollieren. Konzeptionell besteht ein Riboswitch aus zwei Untereinheiten, dem Aptamer und der Expressionsplattform. Das Aptamer bindet, üblicherweise sehr spezifisch, kleine organische Moleküle, aber auch Ionen (allgemein: Liganden). Diese Ligandenbindung induziert Änderungen in der Sekundärstruktur des Riboswitches, welche wiederum die Expressionsplattform des Riboswitches beeinflussen. Je nach Riboswitch ermöglicht oder verhindert eine Veränderung der Faltung der Expressionsplattform die Genexpression. So kann z.B. eine stabile Faltung der Expressionsplattform verhindern, dass die genetischen Informationen der betreffenden RNA von einem Ribosom gelesen und in ein Protein translatiert werden (*off-switch*). Alternativ kann die Translation durch das Ribosom aber auch erst durch eine Veränderung der Faltung ermöglicht werden (*on-switch*). Dadurch repräsentiert der gebundene oder ungebundene, beziehungsweise der gefaltete oder ungefaltete Zustand den An- oder Auszustand (*on/off-state*) des Riboschalters. Durch die üblicherweise sehr hohe Bindungseffizienz und Ligandenspezifität spielt die Aptamerregion die Schlüsselrolle in diesem Regulierungsmechanismus.¹⁵

Natürliche Riboschalter wurden zuerst 2002 in Bakterien entdeckt.^{16–18} Allerdings war es schon lange vorher möglich, artifizielle Aptamere für eine Vielzahl von Liganden zu erzeugen.¹¹ Dies geschah mittels *in-vitro*-Selektion und Evolution von RNA-Sequenzen. Die Schlüsseltechnologie dazu ist heute der sogenannte SELEX-Prozess (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).^{19–21} Die mittels SELEX gefundenen Aptamere können als Biosensoren, Marker (*tags*) zur Visualisierung von RNA- und Proteinverteilungen in lebenden Zellen, als Arzneimittel oder auch zur Genregulation eingesetzt werden.¹⁵ Artifizielle Aptamere haben also ein breites Anwendungsspektrum und ermöglichen außerdem Rückschlüsse auf die Funktion von Riboswitches.

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich deshalb auch mit der Entwicklung und Etablierung von Methoden der optischen Spektroskopie zur Aufklärung von RNA-Dynamiken und -Strukturen im Allgemeinen und der Erforschung von Aptamerbindungsmechanismen im Besonderen. Hierbei werden die spektroskopischen Methoden zunächst ausgiebig an simplen RNA-Modellsystemen getestet, um dann für die Beantwortung konkreter Fragestellungen an Aptameren eingesetzt zu werden.

Eine der dazu verwendeten Methoden ist die FTIR-Spektroskopie. Hierfür wurden zunächst kritische Parameter wie verschiedenste Messeinstellungen oder die Probenpräparation ausgiebig an RNA-Modellsträngen getestet und so die Methode etabliert. Anschließend wurde eine statische Bindungsstudie am adenosin- sowie am guanosinbindenden Aptamer vorgenommen. Hierbei war es möglich, die Vor- und Nachteile, sowie die Möglichkeiten, aber auch die Grenzen auszuloten, die diese Methode bietet.

Der Hauptteil dieser Doktorarbeit beschäftigt sich allerdings mit der Charakterisierung und der Anwendung des quasi bifunktionellen RNA-Markers (auch *RNA-Labels*) C_m^f . Hierbei wurden zunächst die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften des Markers in wässriger Lösung untersucht. In diesem Zusammenhang

wurde ζ_m^f direkt mit dem EPR-Marker ζ_m verglichen. Obwohl ζ_m^f und ζ_m große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, ist ζ_m^f ein relativ starker Fluorophor, während die Fluoreszenz von ζ_m sehr schnell und effizient gelöscht wird (sog. *quenching*). Der dafür verantwortliche Quenchingmechanismus wurde ausgiebig untersucht, wodurch ein tiefergehendes Verständnis der Photodynamik, sowohl von ζ_m , als auch von ζ_m^f , erreicht werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde ζ_m^f in RNA-Modellstränge eingebaut, um den Einfluss der RNA auf die Photochemie des Markers zu untersuchen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich das Label sehr gut für Hybridisierungs- und Ligandenbindungsstudien eignet. Deshalb wurde ζ_m^f schließlich in ein artifizielles Aptamer eingebaut, um dessen Bindungskinetik zu untersuchen.

Dabei handelte es sich um das neomycinbindende Aptamer (N1), welches aus nur 27 Nukleotiden aufgebaut ist und damit eines der kleinsten bisher bekannten artifiziiellen Aptamere ist. Das Aptamer bindet mit sehr hoher Affinität das Antibiotikum Neomycin. Mittels statischen und zeitaufgelösten Mischexperimenten konnte die Bindungskinetik des Aptamers beobachtet werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit geht es ebenfalls um die Entwicklung und Etablierung eines spektroskopischen Werkzeuges. Dabei stehen allerdings nicht Nukleinsäuren, sondern Rhodopsine im Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. Hierbei handelt es sich um photosensitive Membrantransportproteine. Diese sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung, bei der zeitaufgelöste optische Spektroskopie im IR- und UV/vis-Bereich eine wichtige Rolle spielt. Die Proteine durchlaufen nach optischer Anregung einen sehr schnellen Photozyklus mit mehreren Intermediaten. Es ist möglich, diese Intermediate dank transientser Absorptionsmessungen mit sehr guter zeitlicher und spektraler Auflösung zu beobachten. Allerdings besteht der Bedarf, diese Intermediate statisch zu präparieren, um sie näher charakterisieren und mit anderen Methoden, wie z.B. der Festkörper-NMR, vergleichen zu können.

Ein spektroskopisches Werkzeug zum Präparieren von frühen Photointermediaten ist kryogenes Einfangen (sog. *Cryotrapping*) dieser Intermediate. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Cryotrapping und die anschließende statische UV/vis-Absorptionsspektroskopie der fixierten (getrappten) Zustände optimiert und an einer Reihe von Rhodopsinen demonstriert.

2 Theoretische Grundlagen

In den folgenden Unterkapiteln werden einige theoretische Grundlagen und Hintergründe zu den verwendeten Proben sowie zu den angewendeten Spektroskopie- und Auswertemethoden vorgestellt. Hierbei wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben. Vielmehr soll dieser Teil der Arbeit Begriffe und Konzepte erklären, die zum besseren Verständnis aller weiteren Kapitel beitragen. Dabei dienen die Ausführungen zu den verwendeten Proben vor allem der Erklärung und Einordnung der verschiedenen Projekte und den damit verbundenen Experimenten. Für genauere und weiterführende Informationen zu den einzelnen Unterkapiteln sei hier auf die dort zitierten, entsprechenden Übersichtsartikel und Lehrbücher verwiesen.

2.1 RNA-Label - ζ_m^f und ζ_m

Bei der spektroskopischen Untersuchung von strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Nukleinsäuren verwendet man häufig sogenannte Marker.^{22,23,32–38,24–31} Die Art und Eigenschaften dieser Marker sind von der verwendeten spektroskopischen Methode, der Probe und der konkreten Fragestellung geprägt. Dementsprechend sind inzwischen allein für das Feld der Nukleinsäureforschung eine Vielzahl verschiedenster Marker entwickelt worden.^{22,25–27,30,36–38,39–47} Eine Besonderheit stellen hierbei die Label ζ -Spin und ζ^f bzw. ζ_m -Spin und ζ_m^f dar, die von der isländischen Arbeitsgruppe Prof. Dr. Snorri Th. Sigurdsson (Science Institute, University of Iceland) entwickelt wurden (Abbildung 2.1a).^{48–55}

Bei ζ -Spin handelt es sich um ein Nitroxid, welches als sogenanntes Spinlabel in der Elektronenspinresonanzspektroskopie (*electron paramagnetic resonance*, EPR) eingesetzt wird. Dabei wird ausgenutzt, dass es als Cytidin-Analogon an spezifischen Stellen in DNA-Stränge eingebaut werden kann (Abbildung 2.1b). Durch das Nitroxid wird so ein stabiles Radikal innerhalb der DNA platziert, sodass sich nun statische EPR-Messungen vornehmen lassen. Die eigentliche Stärke des ζ -Spin-Labels kommt allerdings erst bei doppelt markierten Proben zum Tragen. Denn in diesem Fall ist es möglich, den Abstand der beiden ungepaarten Spins mittels PELDOR-Spektroskopie (*Pulsed Electron Electron Double Resonance*) zu bestimmen. Dabei wird ausgenutzt, dass ζ -Spin verhältnismäßig klein und innerhalb eines DNA-Strangs relativ unbeweglich ist. Das Nitroxid kann sich nicht frei im Raum drehen und Verbiegungen senkrecht zur Längsachse des Moleküls sind ebenfalls nur sehr eingeschränkt möglich. Dies gilt vor allem innerhalb eines DNA-Doppelstrangs, also wenn ζ -Spin eine Watson-Crick-Basenpaarung mit Guanin eingeht. In diesem Fall kann die Position des Nitroxids sehr genau definiert werden. Entsprechend erhält man mittels der PELDOR-Messungen schmale Abstandsverteilungen zwischen den Label-Positionen. Außerdem ist es möglich, neben einer genauen Abstandsbestimmung auch relative Orientierungsinformationen aus den EPR-Messungen zu extrahieren. Entsprechend dieser Stärken wurde der Marker inzwischen in mehreren EPR-Studien erfolgreich eingesetzt. Federführend hierbei war die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Prisner (Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main), die mittels ζ -Spin beispielsweise die Flexibilität einer DNA-Doppelhelix untersucht und den Abstand sowie die Orientierung verschiedener Sekundärstrukturelemente zueinander im kokainbindenden Aptamer bestimmt hat.^{50,52,54} Insgesamt kann ζ -Spin also als etabliertes EPR-spektroskopisches Werkzeug angesehen werden. Allerdings ist über die Photophysik des Labels wenig bis gar nichts bekannt.

Dabei handelt es sich bei ζ -Spin um eine sogenannte Fluorophor-Nitroxid-Verbindung (FNRO \cdot). Diese Verbindungsklasse zeichnet sich dadurch aus, dass ein Fluorophor und eine Nitroxidgruppe direkt miteinander verbunden sind. Dies führt üblicherweise dazu, dass die Fluoreszenz des Fluorophors effizient durch die Nitroxidgruppe gelöscht wird (sog. *quenching*).^{56–58}

Wie genau diese intra- oder auch intermolekularen Fluoreszenzlöschungen durch Nitroxide ablaufen, ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Die ersten entsprechenden Studien dazu wurden vor rund 40 Jahren gemacht.^{59–62} Seitdem wurde eine Vielzahl von mehr oder weniger etablierten Mechanismen bzw. auch Kombinationen aus verschiedenen Mechanismen für unterschiedliche Fluorophor-Nitroxid-Kombinationen veröffentlicht.^{57,59,68–77,60,78,79,61–67} Üblicherweise werden dabei Anregungsenergietransfer (*excitation-energy transfer*, EET) nach dem Förster- (FT) oder dem Dexter- (DT) Mechanismus, Elektrontransfer (ET), elektronenaustauschinduziertes verstärktes Intersystem Crossing (*enhanced intersystem crossing*, EISC) sowie verstärkte interne Konversion (*enhanced internal conversion*, EIC) diskutiert. Hierbei können alle genannten Mechanismen im Prinzip anteilig zur gesamten Quenchingrate (k_q) beitragen:

$$k_q = k_{FT} + k_{DT} + k_{ET} + k_{EISC} + k_{EIC} \quad \text{Formel 2.1}$$

Im Fall von ζ -Spin gab es bis jetzt allerdings noch keine explizite Untersuchung bezüglich der Fluoreszenzlöschung. Dementsprechend sind die Aufklärung des Quenchingmechanismus im Speziellen und die photophysikalischen Details des Labels im Allgemeinen durchaus interessante Forschungsziele.

Dies wird noch deutlicher, wenn man bedenkt, dass der direkte synthetische Vorläufer des Nitroxids ζ -Spin das Amin ζ^f ist. Im Fall des Amins kommt es zu keiner Fluoreszenzlöschung.⁴⁸ Dementsprechend kann ζ^f als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Die beiden Marker ζ -Spin und ζ^f können also über Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen ineinander überführt werden (Abbildung 2.1c).⁴⁸ Dies ist sogar möglich, wenn die Marker in DNA eingebaut sind. Deshalb spricht man hier von bifunktionellen DNA-Markern:⁴⁸ Beide Label sind praktisch isosterisch zueinander und ermöglichen dadurch eine sehr hohe und direkte Vergleichbarkeit zwischen EPR- und Fluoreszenzspektroskopie.^{80,81} Mit Blick auf den Mechanismus der Fluoreszenzlöschung von ζ_m bietet die große Ähnlichkeit zwischen dem paramagnetischen, nicht fluoreszenten ζ_m und dem diamagnetischen, fluoreszenten ζ_m^f ebenfalls interessante Vergleichsmöglichkeiten. Dadurch kann der intramolekulare Fluoreszenzlöschungsmechanismus genauer untersucht und aufgeklärt werden.

In ersten statischen Fluoreszenzstudien mit DNA-Modellsträngen konnte gezeigt werden, dass die ζ^f -Emission sehr empfindlich auf die Mikroumgebung des Fluorophors reagiert.⁸⁰⁻⁸⁴ Dadurch war es zum Beispiel möglich, Fehlpaarungen (*mismatches*) innerhalb eines DNA-Doppelstrangs zu erkennen, wobei gleichzeitig die falsch gepaarte Gegenbase identifiziert werden konnte.⁸¹⁻⁸⁴ Alles in allem ist der Fluorophor im Vergleich zum Spinlabel allerdings noch weitaus weniger spektroskopisch etabliert und charakterisiert.

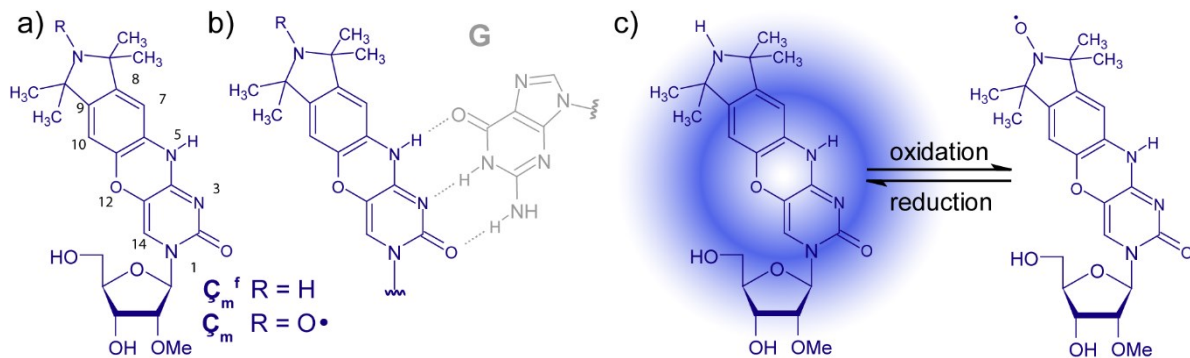


Abbildung 2.1. a) Struktur und b) Basenpaarungseigenschaften von ζ_m und ζ_m^f mit Guanin. c) Umwandlung von ζ_m^f in ζ_m und umgekehrt über Reduktion bzw. Oxidation.

Dies gilt in noch größerem Ausmaß für die entsprechenden RNA-Versionen der beiden Label (Abbildung 2.1). Diese Label werden ζ_m bzw. ζ_m^f genannt und unterscheiden sich strukturell lediglich durch eine Methoxy-Schutzgruppe an der 2'-C-Position der Ribose von ihren DNA-Entsprechungen.^{85,86}

Während es im Fall von ζ_m erste EPR-Messungen an RNA-Modellsystemen gibt, wurde ζ_m^f bis jetzt noch nicht als RNA-Fluoreszenzlabel eingesetzt. Hierbei kann generell davon ausgegangen werden, dass sich die photophysikalischen Eigenschaften von ζ^f und ζ_m^f sehr ähneln müssen. Allerdings gibt es auch, wie oben erwähnt, für ζ^f keine zeitaufgelösten Messungen, sodass über die Photophysik der Fluoreszenzmarker genauso wenig bekannt ist wie über die Photophysik der Spinlabel.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen der Spinlabel ζ_m und der Fluoreszenzlabel ζ_m^f genauer mit optischen Spektroskopiemethoden untersucht und charakterisiert werden. Dabei können im Prinzip drei Projektschritte unterschieden werden, die in der Folge kurz umrissen werden:

Zunächst soll die Photophysik von ζ_m und ζ_m^f möglichst genau untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Fluoreszenzlöschungsmechanismus für ζ_m . Im zweiten Schritt wird dann ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel getestet. Dazu wird der Fluorophor in verschiedene RNA-Modellsequenzen eingebaut. Hierdurch soll vor allem geklärt werden, ob und inwiefern das Emissionssignal des Fluorophors abhängig von der direkten chemischen Umgebung des Markers ist. Des Weiteren wird ζ_m^f schließlich zur Beantwortung einer biochemischen Fragestellung herangezogen. Es wird die Ligandenbindungsdynamik des neomycinbindenden Aptamers mit Hilfe von ζ_m^f markierten Aptamerproben untersucht.

2.2 Nukleinsäuren

Wichtige Eigenschaften lebender Organismen sind die Fähigkeit ihr eigenes Erbgut zu reproduzieren und einen eigenen Energiestoffwechsel betreiben zu können, wobei ein wesentlicher Bestandteil des Energiestoffwechsels die Synthese von Proteinen darstellt. Wie allerdings Erbinformationen weitergegeben bzw. reproduziert werden können und welche Substanzen letztendlich daran beteiligt sind, war noch bis in die Mitte des vergangenen Jahrhunderts ein Streitpunkt der Forschung. Erst als es 1953 James Watson, Francis Crick und Maurice Wilkins, durch erhebliche Vorarbeit von Rosalind Franklin, gelang, die Struktur der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu lösen, konnte die Frage nach dem Träger der Erbinformationen beantwortet werden.^{87,88}

2.2.1 Das Zentrale Dogma der Molekularbiologie und die RNA-Welt-Theorie

Auf der Basis der DNA-Struktur stellte Francis Crick, wie schon in der Einleitung erwähnt, nur wenige Jahre später (1958) das sogenannte „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“ auf, welches den Informationstransfer zwischen Erbgut (DNA) und der Proteinbiosynthese beschreibt.⁵ Demnach dient DNA als dauerhafter Speicher der Erbinformationen, kann aber auch vervielfältigt oder in Ribonukleinsäure (RNA) transkribiert (umgeschrieben) werden. Die RNA dient demnach als Vermittler und Transporteur der Informationen. In dieser Eigenschaft wird sie schließlich zu einem Protein translatiert (übersetzt bzw. übertragen). Ein umgekehrter Informationsfluss vom Protein zur DNA oder RNA, also zum Erbgut, ist nach dem Dogma nicht möglich.^{87,88}

Wie schon in der Einleitung angesprochen ist inzwischen allerdings klar, dass RNA nicht nur als Informationsüberträger wirkt. Vielmehr kann RNA auch katalytische oder genregulatorische Funktionen haben. Diese sind essenziell für die sogenannte „RNA-Welt-Theorie“.^{6,7} Diese Theorie besagt, dass das erste Leben auf der Erde auf RNA basierte. Dabei wirkte die RNA als Träger der genetischen Information, übernahm aber gleichzeitig Kontroll- und Steuerungsaufgaben bei chemischen Prozessen innerhalb der frühen Organismen. Dadurch soll es der RNA möglich gewesen sein, auf Umwelteinflüsse zu reagieren.^{6,7,10-14,87,88}

2.2.2 Vergleich von Aufbau und Struktur der Nukleinsäuren DNA und RNA

Um solche Regulationsprozesse erforschen und verstehen zu können, ist es hilfreich, die Grundstrukturen und Merkmale von RNA und DNA zu kennen (Abbildung 2.2). Die Nukleinsäuren DNA und RNA sind lineare biologische Polymere. Die entsprechenden Monomere werden Nukleotide genannt und sind aus einer Nukleinbase, einem Zucker (Pentose) und einer Phosphatgruppe aufgebaut. Über Phosphodiesterbrücken an den 3'-C- und 5'-C-Positionen des Zuckers sind die einzelnen Nukleotide im Polymer miteinander verknüpft, deshalb spricht man von einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung. Die über die Phosphate verknüpften Zucker bilden dadurch quasi das Rückgrat der Nukleinsäuren. Dieses Zucker-Phosphatrückgrat ist strukturgebend für die verschiedenen Nukleinsäuren. Je nachdem ob es sich bei dem verknüpfenden Zucker um eine Desoxyribose oder eine Ribose handelt, spricht man von DNA oder RNA. Die beiden Zucker unterscheiden sich dementsprechend nur durch eine OH-Gruppe am 2'-C des Zuckers.⁸⁷

Jede Phosphodiesterbindung trägt eine negative Ladung, was zur Abstoßung von nukleophilen Gruppen führt. Die Bindung ist deshalb weniger hydrolyseempfindlich als andere Ester, wie etwa Carbonsäureester. Dies erhöht generell die Stabilität und damit die Lebensdauer der Nukleinsäuren. Die fehlende 2'-OH-Gruppe bei DNA erhöht die Hydrolyseresistenz noch weiter. Dieser Unterschied in der Hydrolyseempfindlichkeit ist der Grund, weswegen DNA als Langzeitspeicher genetischer Information verwendet wird, während RNA als eher kurzlebig angesehen werden muss.⁸⁷

Am 1'-C des Zuckers befindet sich eine sogenannte Nukleobase. Die Einheit aus Zucker und Base wird Nukleosid genannt. In DNA kann als Nukleobase entweder ein Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T) vorkommen. In RNA ist Thymin durch Uracil (U) ersetzt (Abbildung 2.2). Über die Abfolge der Basen im Nukleinsäurestrang, die sogenannte Sequenz oder Primärstruktur, sind die genetischen Informationen kodiert.⁸⁷

Die Basen sind zudem komplementär zueinander, bilden also Wasserstoffbrücken (H-Brücken) untereinander aus. Diese Komplementarität sorgt für die Ausbildung von teils komplexen Sekundärstrukturen. So können sich zwei komplementäre Einzelstränge oder auch nur komplementäre Bereiche eines Einzelstrangs zu einem Doppelstrang zusammenfügen. Diese bilden dann eine doppelhelikale Struktur, die auch als Stamm (*stem*) bezeichnet werden kann.⁸⁷

Die Ausbildung von H-Brücken zwischen zwei komplementären Basen wird Watson-Crick-Basenpaarung genannt (Abbildung 2.2). Dabei bilden immer eine Purin- und eine Pyrimidinbase ein komplementäres Paar. So ist Adenin die komplementäre Base zu Thymin bzw. Uracil. Hier werden zwei H-Brücken ausgebildet. Dagegen können sich Cytosin und Guanin über drei H-Brücken verbinden.⁸⁷

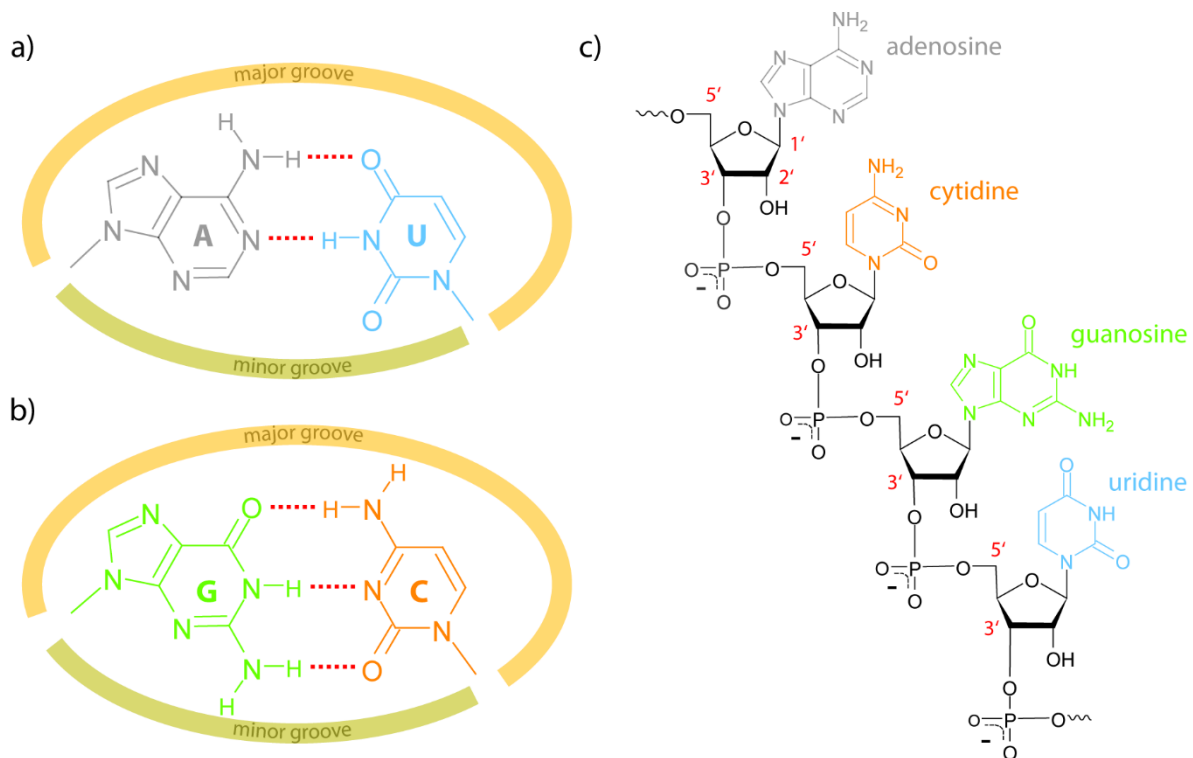


Abbildung 2.2. a,b) Struktur und komplementäre Basenpaarung der Nucleobasen Adenin (grau), Uracil (hellblau), Guanin (grün) und Cytosin (orange). Die roten gestrichelten Linien verdeutlichen jeweils die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Der orange bzw. grüne Bogen kennzeichnet den Bereich der großen bzw. der kleinen Furche. c) Struktur der vier RNA-Nucleoside (Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin) innerhalb eines kurzen RNA-Oligomers (die entsprechenden Nucleobasen sind farblich markiert).⁸⁷

2.2.2.1 DNA-Struktur

DNA liegt üblicherweise als Duplex aus zwei komplementären Einzelsträngen in Gestalt einer rechtsgängigen B-Form-Doppelhelix vor. Innerhalb der Doppelhelix sind die Basenpaare übereinandergestapelt. Grund dafür ist unter anderem der hydrophobe Effekt. Die Basen sind hydrophob und lagern sich im Inneren der Helix zusammen, was zur Stabilität dieser Sekundärstruktur beiträgt. Die so gestapelten Basen ziehen sich gegenseitig über van-der-Waals-Wechselwirkungen an. Durch die Watson-Crick-Basenpaarung entstehen außerdem zwei unterschiedlich breite Vertiefungen in der Helixform (Abbildung 2.2). Man spricht dabei von der großen (*major groove*) und der kleinen Furche (*minor groove*). Die Furchen sind typische Stellen für Wechselwirkungen mit Proteinen.⁸⁷

2.2.2.2 RNA-Struktur

RNA liegt nur selten als perfekt basengepaarter Duplex aus zwei Einzelsträngen vor. Vielmehr wechseln sich basengepaarte und nichtbasengepaarte Bereiche ab. Dies führt z.B. zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen (*hairpin loop*, *terminal loop*, *stem-loop*), Ausbeulungen (*bulge*) oder internen Schleifen (*internal loop*). Durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen kann es wiederum zu einer teils komplexen Faltung der Stränge kommen, die Tertiärstruktur genannt wird. Aber auch die simplen doppelsträngigen Bereiche der RNA gleichen nicht genau der DNA. So liegt RNA vorwiegend in einer rechtsgängigen A-Form-Doppelhelix vor, die im Vergleich zur B-Form etwas länglicher und schmaler ist.

Die Struktur der Nucleinsäuren und allgemein die Fähigkeit der komplementären Basenpaarung ist maßgeblich für die jeweilige Funktion des Makromoleküls.⁸⁷ Die doppelhelikale DNA-Struktur ermöglicht dementsprechend

die Replikation von genetischen Informationen, wobei die DNA als Matrize benutzt wird. Die komplexeren Strukturen und die relative Kurzlebigkeit der RNA andererseits ermöglichen die Übernahme von Steuerungs- und Übermittlungsaufgaben.

2.2.3 RNA-Typen und -Funktionen

Aufgrund der strukturellen Vielfältigkeit der RNA gibt es viele verschiedene RNA-Typen mit unterschiedlichen Funktionen und Aufgaben. Dementsprechend kann hier nur eine beispielhafte Auswahl genannt werden, um die Vielfalt der Prozesse aufzuzeigen, an denen RNA beteiligt ist:

Die Boten-RNA (*messenger-RNA*, mRNA) ist der Informationsüberträger von der DNA zur Proteinbiosynthese, sie dient also bei der Translation als Matrize. Dementsprechend spricht man im Fall von mRNA von kodierender RNA. Stamm-Schleife-Strukturen können, zumindest im Fall von Eukaryoten, die Effizienz der Translation sowie die Lebensdauer der mRNA beeinflussen.

Auch Transfer-RNAs (tRNA) sind direkt an der Proteinbiosynthese beteiligt, sind selbst aber nicht kodierend. Sie transportieren Aminosäuren spezifisch zum Ribosom, mit dessen Hilfe wiederum die Proteinbiosynthese stattfindet. Dabei werden die Aminosäuren nach der mRNA-Matrize zusammengebaut. Entsprechend gibt es für jede der 20 kanonischen Aminosäuren mindestens eine tRNA aus ca. 75 Nukleotiden.

Die Ribosomen selbst sind wiederum aus mehreren kleinen Untereinheiten aufgebaut, die aus Proteinen, aber auch aus verschiedenen sogenannten ribosomalen RNAs (rRNA) bestehen. Diese ebenfalls nicht kodierenden Untereinheiten werden mittels ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit unterschieden. Zum Beispiel bei Prokaryoten sind dies die rRNAs 23S, 16S und 5S. Die rRNAs wirken bei der Proteinbiosynthese katalytisch (enzymatisch), weshalb man sie auch als Ribozyme bezeichnen kann.

Ein weiteres Beispiel für Ribozyme sind kleine RNAs im Zellkern (*small nuclear RNA*, snRNA). Diese sind beim Spleißen von RNA-Exons beteiligt. Als Spleißen wird vereinfacht das Herausschneiden von nichtkodierenden Abschnitten (Introns) aus der durch Transkription gebildeten prä-RNA (auch heterogene Kern-RNA, hnRNA) bezeichnet. Dabei wird eine aus kodierenden Abschnitten zusammengesetzte RNA erzeugt. Man spricht hier von reifer RNA.

Weitere Beispiele für nichtkodierende RNAs sind Mikro-RNAs (miRNA) und *small interfering RNAs* (siRNA). Beide RNA-Typen haben keine katalytische, sondern eine regulatorische Funktion. So handelt es sich bei miRNAs um verschiedene kleine RNAs, die komplementär an mRNA binden und dadurch die Translation verhindern können. Bei siRNAs handelt es sich ebenfalls um kleine RNAs, die an die mRNA binden können. Allerdings bewirkt die Bindung von siRNAs den Abbau von mRNA. Bei der Biosynthese von siRNA werden kleine Haarnadel-RNA-Strukturen (*small hairpin RNA*, shRNA) durch das Enzym Dicer (RNase, Typ III, Endoribonuklease) abgebaut.⁸⁹

2.2.4 Riboschalter

Bei Riboschaltern oder Riboswitches handelt es sich um regulatorisch wirksame einzelsträngige RNA. Wie schon in der Einleitung kurz ausgeführt, sind diese RNA-Strukturen in der 5'-untranslatierten Region bakterieller mRNAs zu finden.¹⁰ Sie kommen aber auch in Eukaryoten wie Hefe vor.⁸⁹ Man kann sich Riboswitches als molekulare Schalter oder Maschinen vorstellen, die die Genexpression kontrollieren. Dazu besteht ein Riboswitch aus zwei Untereinheiten, dem Aptamer und der Expressionsplattform. Allerdings überlappen diese beiden Bereiche - zumindest teilweise - und sind dadurch üblicherweise nicht klar voneinander zu trennen. Der Überlappbereich wird Schaltsequenz (*switching sequence*) genannt.^{10,15,89-92}

Das Aptamer kann man sich dabei als Steuereinheit des Riboschalters vorstellen. Denn es bindet üblicherweise sehr spezifisch und effizient einen Liganden. Dabei kann es sich z.B. um kleine organische Moleküle wie Nukleotide, Aminosäuren oder Vitamine, aber auch um Ionen handeln. Die Ligandenbindung löst daraufhin Änderungen in der Sekundärstruktur des Riboswitches aus. Dadurch wird auch die zweite Untereinheit, die Expressionsplattform, bzw. der Bereich der Schaltsequenz (*switching sequence*) beeinflusst.^{10,15,89-92}

Wie diese Beeinflussung aussieht und wirkt, ist von Riboswitch zu Riboswitch unterschiedlich. So kann eine Umfaltung der Expressionsplattform die Genexpression entweder erst ermöglichen oder auch verhindern. Beispielsweise könnte die Expressionsplattform in einem Bereich liegen, der im stabil gefalteten Zustand als

Duplex vorliegt. Liegt die Ribosomenbindestelle, die Shine-Dalgarno-Sequenz, in diesem Bereich, würde die Faltung verhindern, dass ein Ribosom an den Bereich binden kann (*off-switch*). Dadurch würde das Ablesen der genetischen Informationen unterbunden und die Translation zum Protein verhindert werden. Im umgekehrten Fall (*on-switch*) würde eine stabile Faltung des Riboswitches, ausgelöst durch Ligandenwechselwirkung, dem Ribosom erst ermöglichen, an die RNA zu binden. Entsprechend repräsentiert also der gebundene oder ungebundene, beziehungsweise der gefaltete oder ungefaltete^a Zustand den An- oder Auszustand (*on/off-state*) des Riboschalters.^{10,15,89-92}

In Prokaryoten regulieren Riboschalter die Translationsinitiation über die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle. Außerdem können sie Einfluss auf die transkriptionelle Termination haben und die mRNA-Degradation über ein regulierbares Ribozym steuern.⁹³ In Eukaryoten kann über Ligandenbindung z.B. alternatives Spleißen von prä-mRNAs induziert werden. Auch das Wandern des Ribosoms (*ribosomal scanning*) entlang der mRNA oder die Biosynthese von siRNA kann durch Riboschalter beeinflusst werden.⁸⁹

Die ersten natürlichen Riboswitches wurden 2002 in Bakterien entdeckt.^{11,16-18} Typische Beispiele für natürliche Riboswitches sind der adenin-, guanin-, thiamin-, Coenzym-B12- oder auch der magnesiumbindende Riboswitch.^{10,92} Allerdings war es schon in den 1990er Jahren gelungen, artifizielle Aptamere für eine Vielzahl von Liganden zu erzeugen. Dies geschah mittels *in-vitro*-Selektion und Evolution von RNA-Sequenzen, des sogenannten SELEX-Prozesses (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).¹⁹⁻²¹

Der SELEX-Prozess startet mit einer großen Anzahl ungepaarter RNA-Oligonukleotide ($\approx 10^{15}$ Sequenzen), die zufällige Sequenzen aufweisen. Zu dieser Oligonukleotid-Bibliothek (auch Oligonukleotid-Pool genannt) wird dann der Ligand gegeben, für den ein Aptamer bzw. ein Riboswitch gesucht wird. Die verschiedenen Oligonukleotide gehen nun unterschiedlich gute Bindungen mit dem Liganden ein (Selektion). Der Ligand, inklusive eventuell gebundener RNA, wird im Anschluss wieder isoliert (Separation). Um diesen Schritt zu vereinfachen, werden die Liganden häufig auf (eventuell magnetischen) Kügelchen oder durch Bindung an Biotin immobilisiert. Nichtbindende oder nur unspezifisch bindende RNA-Sequenzen werden also bei dem Separationsschritt aus der Oligonukleotid-Bibliothek entfernt. Die gebundenen RNA-Sequenzen, also die Sequenzen der reduzierten Bibliothek, werden im Anschluss mittels reverser Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) vervielfältigt (Amplifikation). Durch Duplikationsfehler bei der PCR entstehen dabei kleinere Mutationen der bindenden Oligonukleotide. Diese Fehler sind aber häufig erwünscht, weil es dadurch quasi zu einer Nachoptimierung der selektierten Oligonukleotide kommen kann. Der dreistufige Prozess (Selektion, Separation, Amplifikation) wird vielfach wiederholt. Dadurch wird die Vielfalt des Oligonukleotid-Pools immer weiter reduziert. Gleichzeitig wird die Bindung der verbleibenden Oligonukleotide an den Liganden immer besser und spezifischer wodurch letztendlich ein entsprechendes Aptamer isoliert werden kann.^{89,92-94}

Die so gefundenen bzw. erzeugten artifiziellen bzw. synthetischen Aptamere können vielfältig eingesetzt werden. Beispielsweise werden sie als Biosensoren, Marker zur Visualisierung von RNA- und Proteinverteilungen in lebenden Zellen, als Arzneimittel oder zur Genregulation verwendet.⁸⁹ Allerdings kann nur ein Bruchteil der so gefundenen Aptamere auch direkt als Riboswitch eingesetzt werden. Die meisten über SELEX, also *in-vitro*, gefundenen Aptamere sind also *in-vivo* nicht regulatorisch wirksam.¹⁵ Nichtsdestotrotz ermöglichen sie mechanistische Rückschlüsse auf die Funktion von Aptameren und eventuell auch von Riboswitches.

^a Hierbei kann es sich auch um verschiedene Faltungen bzw. Faltungszustände handeln.

2.2.4.1 Neomycinbindendes Aptamer

Einer der kleinsten synthetischen, regulatorisch wirksamen Riboswitches ist das neomycinbindende Aptamer (N1, Abbildung 2.3).¹⁵ Es setzt sich aus nur 27 Nukleotiden zusammen und bindet mit sehr hoher Affinität ($K_d=10 \pm 2,0$ nM) das Aminoglycosid und Breitbandantibiotikum Neomycin B (Neo).⁹⁵

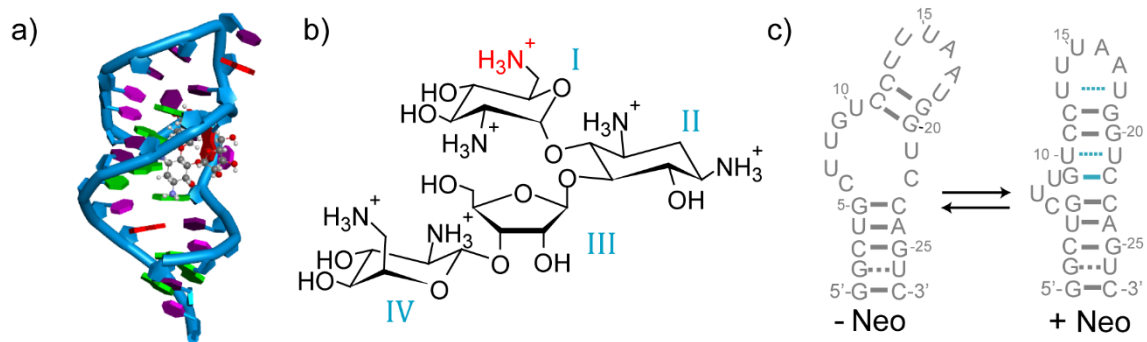


Abbildung 2.3. a) NMR-Struktur (NDB/PDB-ID: 2KXM) des N1-Aptamers mit gebundenem Liganden (hier Ribostamycin).⁹⁶ b) Strukturformel von Neomycin B. Die rot markierte NH₃⁺-Gruppe nimmt an den Wasserstoffbrückenbindungen zum N1-Aptamer teil.^{95,96} c) Sekundärstruktur des N1-Aptamers ohne (-Neo) und mit (+Neo) gebundenem Liganden.^{95,96}

Das Aptamer wurde durch eine Kombination aus *in-vitro*-Selektion (SELEX) und *in-vivo*-Screening gefunden.¹⁵ Dazu wurde, in über sechs Runden einer *in-vitro*-Selektion, ein Pool aus Neomycin-B-Aptameren geschaffen.⁹⁷ Diese wurden vor einen GFP-Reporter (*green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein) in einen Hefe-Vektor eingebaut und über *Escherichia coli* (*E. coli*) vervielfältigt. Anschließend wurde die so entstandene Bibliothek ($\approx 5 \cdot 10^4$ Sequenzen) in Hefe-Zellen übertragen. Dabei zeigte sich, dass es nur bei einem Bruchteil (≈ 2500 Sequenzen) der Kandidaten überhaupt möglich war, GFP zu exprimieren. Dieser Bruchteil wurde wiederum auf regulatorische Fähigkeiten getestet, wodurch die Bibliothek auf 30 Kandidaten eingeschränkt werden konnte. Über Sequenzanalyse konnten letztlich zehn zum Teil sehr ähnliche Sequenzen identifiziert werden. Diese Sequenzen konnten anschließend weiter verkürzt werden (Kürzungsanalyse, *truncation analysis*), wodurch letztlich das N1-Aptamer gefunden wurde.¹⁵

Die genaue Struktur des Aptamers wurde mittels NMR-Methoden aufgeklärt und eingängig untersucht (Abbildung 2.3a). Allerdings wurde dabei als Ligand nicht Neomycin (Abbildung 2.3b), sondern das strukturell sehr ähnliche Ribostamycin (Rio) verwendet. Bei Ribostamycin befindet sich am C3 der Ribose kein Ring-IV, sondern eine OH-Gruppe. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Ring-IV nicht an der Ligandenerkennung des Aptamers beteiligt ist.¹⁵

Strukturell besteht das N1-Aptamer (vgl. Abbildung 2.3a,c) aus einem Stamm (*closing stem*), einer internen Schleife (*internal loop*) sowie einer Haarnadelstruktur (*terminal loop*, terminale Schleife).^{95,96,98} Die interne Schleife und die Haarnadelstruktur sind wiederum über eine kurze helikale Stammstruktur verbunden. Laut den NMR-Studien wird die eigentliche Ligandenbindetasche des Aptamers durch die interne Schleife und die Haarnadelschleife gebildet. Wenn Neomycin gebunden ist, bilden die beiden Schleifen quasi eine durchgängige A-Form-Helix. Dies wird begünstigt durch Stacking-Effekte zwischen den Basen G5:C23 und G9:C22.^{95,96} Allerdings ist die A-Form-Helix nicht perfekt, sondern wird durch einen Teil der internen Schleife unterbrochen, der sich nach außen wölbt (*bulge*). Dieser Bulge und die Helix formen schließlich die eigentliche Bindetasche, die man sich wie eine Art Klammer vorstellen kann. Die Haarnadelschleife, genauer gesagt die Base A17, bildet dabei eine Art Klappe, die über die Bindetasche reicht.⁹⁵ Der untere Teil der internen Schleife ist für die Ausbildung des Bulges verantwortlich. Diese strukturelle Änderung im ligandengebundenen Zustand ist für die regulatorischen Eigenschaften des Aptamers essenziell.⁹⁹

Der Ligand selbst besteht aus mehreren Ringen (Abbildung 2.3b). Im gebundenen Zustand werden Ring I und Ring II zwischen den Basenpaaren G5:C23 und U13:U18 sozusagen eingeklemmt.⁹⁵ Außerdem ist eine NH₃⁺-Gruppe des Liganden (rot markiert in Abbildung 2.3) über Wasserstoffbrücken zu den Basen G9 und U10 am Aptamer gebunden. Darüber hinaus gibt es noch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und den Basen G9 und A17 des Aptamers.⁹⁵

Entsprechend unterscheidet sich die Sekundärstruktur des Aptamers mit und ohne gebundenen Liganden deutlich (Abbildung 2.3c). Allerdings muss man aufgrund von NMR- und EPR-Studien davon ausgehen, dass die beiden Konformationen in einer Art dynamischem Gleichgewicht stehen. Das heißt unabhängig von der Anwesenheit des

Liganden sind in Lösung wahrscheinlich beide Faltungen zu finden. Allerdings bindet der Ligand über Konformationsauswahl (*conformational selection*) spezifisch an die vorgeformte Bindetasche.^{95,96,100}

Die Struktur des neomycinbindenden Aptamers ist also sehr gut untersucht, was auch weitreichende Schlüsse auf den Mechanismus der Ligandenbindung zulässt. Allerdings fehlen Informationen zur Bindungsdynamik, die es erlauben würden, den Bindungsmechanismus weiter und genauer zu charakterisieren. Dementsprechend ist dies eine im Rahmen dieser Arbeit, mithilfe von fluoreszenzmarkierten Aptamerproben, bearbeitete Fragestellung.

2.2.4.2 Purinebindende Riboschalter

Im Unterschied zum neomycinbindenden Aptamer handelt es sich bei dem adenin- (*adenine sensing riboswitch*, ASW) sowie bei dem guaninbindenden Riboswitch (*guanine sensing riboswitch*, GSW) um natürliche Riboswitches, die in der mRNA von *Bacillus subtilis* gefunden wurden (Abbildung 2.4).¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Die beiden Riboswitches sind typische Beispiele für die Genregulation durch nichtkodierende RNA. So haben ASW und GSW Einfluss auf Purin-Transport- und Biosyntheseprozesse in den bakteriellen Zellen.^{101,106}

Im Detail kontrolliert GSW das *xpt*-Gen. Dieses Gen ist für eine Xanthin-Phosphoribosyltransferase sowie eine Xanthin-spezifische Permease verantwortlich. Ab einer bestimmten Guanin-, Hypoxanthin- oder Xanthin-Konzentration ($K_D < 50$ nM) wird die Expression des Gens durch GSW unterbunden (*off-switch*). Allerdings kann auch Adenin, wenn auch wesentlich schwächer, von GSW gebunden werden ($K_D > 300$ nM).¹⁰¹

Das ASW kontrolliert wiederum die Expression des *pbuE*-Gens, welches eine Purin-Effluxpumpe^b codiert. Hier startet allerdings eine entsprechende Adeninkonzentration ($K_D \approx 0.3$ μ M) die Genexpression (*on-switch*). Die Bindung von Guanin ($K_D > 10$ μ M) bzw. von Hypoxanthin ($K_D > 100$ μ M) ist wiederum wesentlich schwächer.¹⁰¹

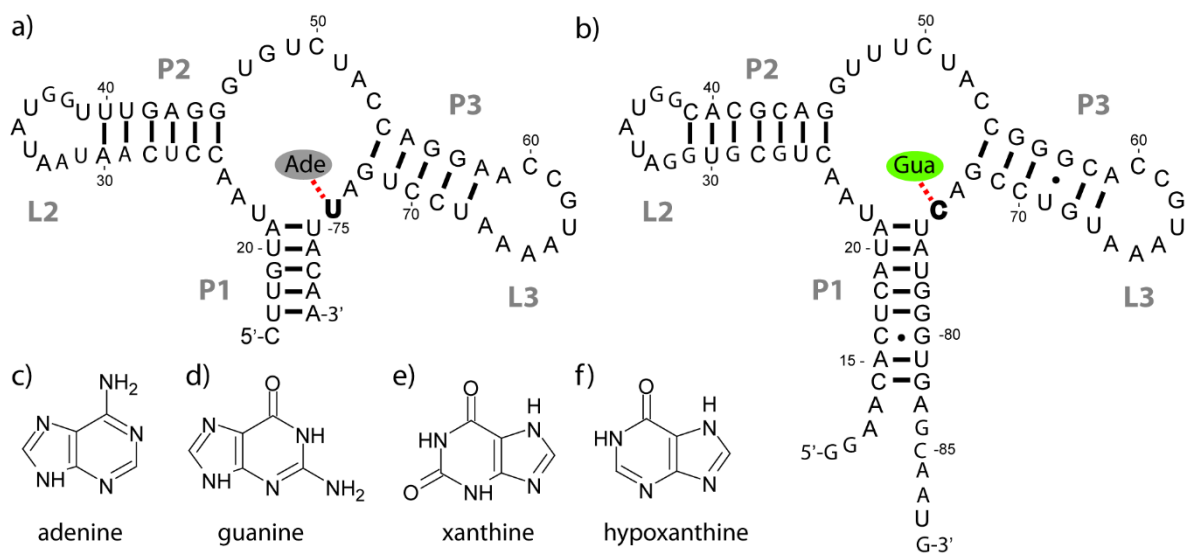


Abbildung 2.4. Sekundärstrukturen des adeninbindenden (a) und des guaninbindenden (b) Aptamers.¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Strukturformeln der Liganden Adenin (c), Guanin (d), Xanthin (e) und Hypoxanthin (f).

Wie in Abbildung 2.4 zu erkennen ist, sind sich ASW und GSW sequenziell und folglich auch strukturell sehr ähnlich. Dieses RNA-Motiv wird auch G-Box genannt. Strukturell entspricht die G-Box einer Kreuzung aus drei RNA-Stammregionen (P1, P2, P3; *three-stem-junction*). Dabei sind die Stämme P2 und P3 jeweils von einer Schleife (L2, L3) abgeschlossen. Die so gebildeten Haarnadelstrukturen sind untereinander sowie mit dem offenen Stamm P1 über einzelsträngige RNA-Regionen verbunden. Die Sequenzen dieser verbindenden Regionen unterscheiden sich für ASW und GSW lediglich an der eigentlichen Bindestelle. So befindet sich bei ASW an Position C74 eine Uracilbase, um mit Adenin paaren zu können. An der gleichen Stelle befindet sich beim GSW eine Cytosinbase, um mit Guanin binden zu können.¹⁰¹

Mittels Kristallstrukturanalysen von GSW und ASW konnte eine genauere Analyse der jeweiligen Bindungssituation vorgenommen werden.^{102,103,105} Dabei zeigte sich, dass die dreidimensionalen Strukturen der beiden Aptamere aufgrund der sequenziellen Ähnlichkeit im Großen und Ganzen nahezu identisch sind.¹⁰³ Dabei

^b Eine Effluxpumpe pumpt Ionen oder Moleküle (hier Purin) aus der Zelle heraus.

konnte gezeigt werden, dass die Aptamere jeweils eine Bindetasche ausformen, die wiederum den gebundenen Liganden fast vollständig umschließt: Im ligandengebundenen Zustand werden Wasserstoffbrücken zwischen den Schleifen L2 und L3 ausgebildet, wodurch die Stämme P2 und P3 parallel zueinander stehen. Durch die zusätzliche Bindung von Kationen werden dabei auftretende elektrostatische Abstoßungen verringert. Um die Ligandenbindestelle an Position 74 (U74 bei ASW; C74 bei GSW) bilden sich mehrere Basentriplets aus, die den Liganden einschließen. Die Positionen U22, U47, U51 und C74 bzw. U74 formen dadurch einen Quadrupel, der auf die P1-Helix gestackt ist und in dessen Zentrum der Ligand über Wasserstoffbrücken gebunden ist. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen zu allen funktionellen Gruppen des Liganden, was die Bindungsspezifität des Aptamers erklärt.^{102,105}

Die fast vollständige Umschließung des Liganden durch das Aptamer lässt direkte Rückschlüsse auf den Bindemechanismus zu. So muss die Ligandenbindung größere strukturelle Änderungen hervorrufen, die schließlich zu der oben beschriebenen gefalteten Struktur führen. Ein Konformationsauswahlmechanismus (*conformational selection*) kann ausgeschlossen werden, da der Ligand keinen Zugang zur Bindetasche hätte, wenn das Aptamer schon ohne Ligand (vor-)gefaltet wäre.^{102,105}

2.3 Mikrobielle Rhodopsine

Mikrobielle Rhodopsine (Typ I) sind Membranproteine, die aus sieben verbundenen Transmembranhelices (TMH), A–G benannt, bestehen (Abbildung 2.5). Der N-Terminus der Proteine befindet sich im extrazellulären Raum (EX) und der C-Terminus im Cytoplasma (CP). Nur die neu entdeckten Heliorhodopsine stellen hier eine Ausnahme da. In dieser Rhodopsin-Familie befindet sich der N-Terminus im Cytoplasma.¹⁰⁷ Die mikrobiellen Rhodopsine wirken als Photorezeptoren und ermöglichen dadurch dem entsprechenden Organismus die Wahrnehmung sowie die Reaktion auf Licht. Dazu ist im Allgemeinen ein Chromophor nötig, der die Energie von Photonen absorbieren und umwandeln kann. Im Fall der hier beschriebenen Rhodopsine handelt es sich bei dem Chromophor um Retinal, welches als Schiff'sche-Base (*retinal Schiff base*, RSB), also kovalent, an eine Lysin-Seitenkette in Helix G des Proteins gebunden ist (Abbildung 2.5a). Die eigentliche Licht-zu-Energie- oder Licht-zu-Signal-Umwandlung basiert im Fall der Typ I Rhodopsine auf der all-*trans*- zu 13-*cis*-Isomerisierung des Retinals. Diese Isomerisierung führt zu leichten strukturellen Änderungen des Proteins. Dadurch wird wiederum, je nach Rhodopsintyp, der aktive Transport (Pumpen) eines Protons oder Ions oder aber das Öffnen eines Kanals für den passiven Transport von Ionen ermöglicht. Je nachdem werden dabei Membranpotentiale zwischen dem Cytoplasma und dem extrazellulären Raum auf- oder abgebaut.¹⁰⁸

Das Protein durchläuft einen Photozyklus mit mehreren Intermediaten (Abbildung 2.5c, e). Die Photozyklen der verschiedenen Rhodopsine ähneln sich zwar grundsätzlich, unterscheiden sich allerdings im Detail signifikant von Typ zu Typ. Als Vergleichs- bzw. Referenzsystem bei der Untersuchung von Retinalproteinen wird üblicherweise Bakteriorhodopsin (BR) herangezogen. BR wurde als erstes der mikrobiellen Retinalproteine entdeckt und wurde inzwischen im Detail charakterisiert. Deshalb gilt BR gewissermaßen als Archetyp eines Rhodopsins.¹⁰⁸

Trotz identischen Chromophors sind die Absorptionsmaxima der verschiedenen Retinalproteine nicht unbedingt identisch, da die Proteinumgebung das Retinal beeinflusst (*opsin shift*). Hierbei spielen zum Beispiel der Protonierungsgrad der RSB oder elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen oder polaren Aminosäuren und dem Chromophor eine Rolle. Auch Wechselwirkungen zu Gegenionen verändern das Absorptionsmaximum des Retinals.¹⁰⁸

Ähnlich dazu lassen sich auch die einzelnen Intermediate des Photozyklus spektral und natürlich durch den Zeitpunkt ihres Auftretens unterscheiden. Dementsprechend eignen sich die mikrobiellen Rhodopsine für statische und zeitaufgelöste UV/vis- und IR-spektroskopische Studien. Diese können wesentliche Informationen zur Reaktionsgeschwindigkeit liefern. Mittels IR-Methoden können auch Strukturinformationen gewonnen werden. Informationen zur Struktur lassen sich außerdem unter anderem durch (Festkörper-)NMR-Methoden und Röntgenstrukturbestimmungen erhalten. Aus Struktur- und Dynamikinformatoren können schließlich Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen gezogen werden.¹⁰⁸

Rhodopsine kann man sich vereinfacht als molekulare Maschinen oder Schalter vorstellen, die sich mit Licht steuern lassen. Dies ist besonders für die sogenannte Optogenetik interessant. Bei der Optogenetik versucht man, genetisch modifizierte Zellen oder ganze Organismen mittels Licht zu beeinflussen oder zu steuern.¹⁰⁹ So können Rhodopsine z.B. zur Beeinflussung des Membranpotentials von Neuronen gezielt eingesetzt werden. Dies wiederum kann nicht nur zur Untersuchung von Neuronen und neuronalen Netzwerken sondern auch zur Steuerung von Organismen verwendet werden. Man nutzt dabei aus, dass Licht zeitlich und örtlich sehr genau zur Steuerung eingesetzt werden kann ohne dabei Schäden an den Zellen zu verursachen. Ein großes Ziel der Optogenetik ist es beispielsweise bestimmte Funktionen des Gehirns zu verstehen, um dadurch eventuell Therapieansätze für Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson zu entwickeln.^{109–112}

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Tieftemperaturabsorptionsmessungen an grünabsorbierendem Proteorhodopsin (GPR) sowie an Channelrhodopsin 2 (ChR2) durchgeführt (Abbildung 2.5). Dementsprechend sollen diese beiden mikrobiellen Rhodopsine in den folgenden Unterkapiteln kurz vorgestellt werden.

2.3.1 Proteorhodopsine

Typische Beispiele für protonenpumpende Rhodopsine sind, neben BR, die Proteorhodopsine (PR, Abbildung 2.5b). PR ist in marinen Bakterien zu finden und wurde zuerst im Jahr 2000 in einer Wasserprobe der Monterey Bay in Kalifornien entdeckt. Proteorhodopsine lassen sich in zwei große Gruppen einteilen, die blau- (BPR, $\lambda_{\max}=490$ nm) und die grünabsorbierenden Proteorhodopsine (GPR, $\lambda_{\max}=525$ nm). Die Aminosäure 105 bestimmt hier über das Absorptionsmaximum: Während BPR an Position 105 ein Leucin (L, Leu) aufweist, ist dort im Fall von GPR ein Glutamin (Q, Gln) zu finden. Diese Anpassung des Absorptionsmaximums korrespondiert mit dem

Lebensraum der Bakterien, also in diesem Fall der Wassertiefe. So ist GPR für geringere und BPR für größere Wassertiefen evolutionär optimiert.^{108,113,114}

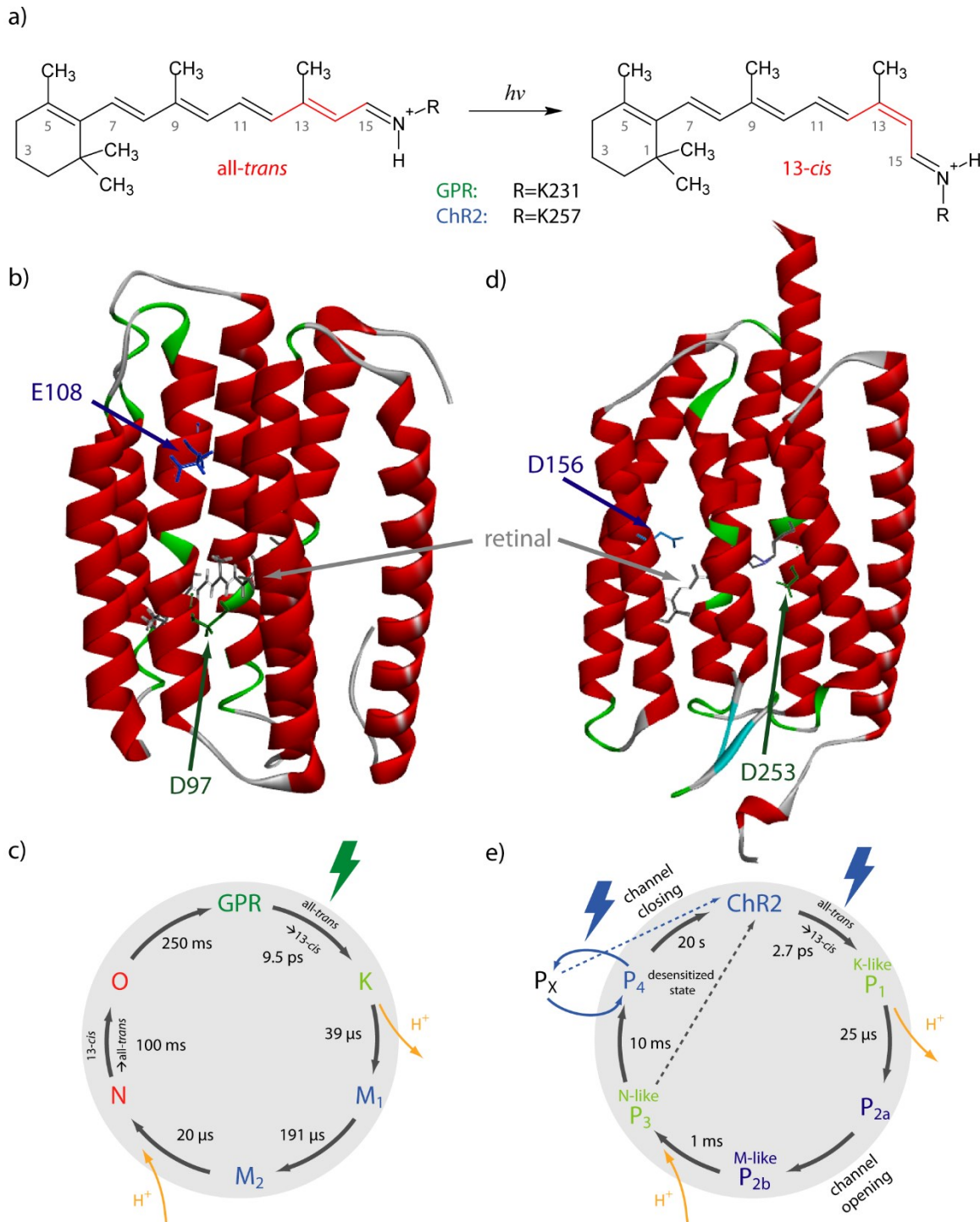


Abbildung 2.5. a) Struktur des all-trans- und des 13-cis-Retinals. b) GPR-Strukturmodell (PDB ID:216x).¹¹⁵ c) Schema des GPR-Photozyklus.^{108,113} d) Chr2-Strukturmodell (PDB ID:6eid).¹¹⁶ e) Schema des Chr2 Photozyklus.^{108,117-121}

Die RSB wird im PR mit dem Lysin 231 (K, Lys) gebildet. Im Grundzustand ist die RSB protoniert und zu 100% in der all-trans Konformation. Der erste Schritt des PR-Photozyklus ist die Photoisomerisierung des Retinals (Abbildung 2.5c). Dabei kommt es nach der Photoanregung (525 nm) zur Isomerisierung von der all-trans- zur 13-cis-Konformation um die C13=C14-Doppelbindung, wodurch das K-Intermediat entsteht. Dieser Schritt ist durch eine konische Durchschneidung (*conical intersection*, CI) zum Grundzustand sehr schnell (9,5 ps). Danach

^c GPR, solubilisiert, 0,15% DDM, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 9.

werden durch Deprotonierung der RSB sequenziell die M-Intermediate (M_1 und M_2) gebildet ($39 \mu\text{s}^\ominus$ und $191 \mu\text{s}^\ominus$) und ein Proton an die Umgebung abgegeben. Die π -Elektronendelokalisierung des Retinals wird dabei verkleinert, wodurch das M-Intermediat hypsochrom zum Grundzustand verschoben ist (410 nm). Als Protonakzeptor fungiert dabei die Asparaginsäure 97 (D, Asp). D97 bildet außerdem zusammen mit D227 und Arginin 94 (R, Arg) den Gegenionkomplex der Schiff'schen-Base. Im nächsten Schritt folgt die Bildung des N-Intermediates ($20 \mu\text{s}^\ominus$), wobei die RSB reprotoniert (Protonenaufnahme) wird. Der entsprechende Protonendonator ist die Glutaminsäure 108 (E, Glu). Anschließend isomerisiert das Retinal zurück in die all-*trans*-Konformation und E108 wird reprotoniert. Dadurch wird das bathochrom verschobene O-Intermediat gebildet (100ms^\ominus). Abschließend wird D97 deprotoniert und so der Ausgangszustand des Photozyklus wiederhergestellt (250ms^\ominus). Durch diesen Zyklus wird also letztlich ein Proton aus dem Cytoplasma in den extrazellulären Raum transportiert.^{113,122}

Wie bei BR ist es durch Bestrahlung mit blauem Licht (ca. 400 nm) möglich, den PR-Photozyklus zu unterbrechen. Dieses sogenannte Blaulichtlöschen (*blue light quenching*, BLQ) führt zu einem Rückgang des M-Intermediates und zu einer Rückbildung des Grundzustandes. Der Mechanismus dieses Effekts wurde im Fall von PR von Elias Eckert et al. untersucht.¹²³ Dabei war es nötig das M-Intermediat zu akkumulieren. Dies war mittels der Mutante $\text{GPR}_{\text{E108Q}}$ möglich. Bei dieser Mutante ist an der Stelle 108 Glutaminsäure durch ein Glutamin (Q, Gln) substituiert. Im Unterschied zu E108 kann Q108 nicht als primärer Protonendonator wirken, wodurch der Übergang des M-Intermediat zum N-Intermediat stark verlangsamt wird. Ein komplettes Unterbinden des M-N-Übergangs ist durch diese Mutation allerdings nicht möglich. Elias Eckert et al. konnten zeigen, dass der BLQ-Prozess auf einem sehr schnellen ($<1 \text{ns}$) zweistufigen Mechanismus basiert. Dabei kommt es zunächst zu einer Reisomerisierung des Retinals von 13-*cis* zu all-*trans*. Das so gebildete M' -Intermediat wird anschließend von D97 reprotoniert und so die Richtung des Protontransfers invertiert. Dem M' -Intermediat wird dabei eine positive Absorptionsänderung bei 460 nm zugeordnet.^{122,123}

2.3.2 Channelrhodopsine

Im Unterschied zu PR handelt es sich bei Channelrhodopsin^{116,124,125} nicht um lichtgesteuerte Ionenpumpen, also aktive Transporter, sondern um lichtgesteuerte Ionenkanäle (Abbildung 2.5d). Die Kanäle öffnen sich schnell nach der Absorption von Anregungslicht und werden für mono- sowie für divalente Kationen (H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) durchlässig.^d Die Durchlässigkeit gilt in beide Richtungen, also sowohl in die Zelle als auch aus der Zelle heraus. Die Transportrichtung ist dementsprechend vom Konzentrationsgradienten zwischen Cytoplasma und extrazellulärem Raum abhängig. Channelrhodopsine kommen im Augenfleck der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* vor. Hier konnten zwei verschiedene Rhodopsingene und entsprechend zwei verschiedene lichtgesteuerte Ionenkanäle identifiziert werden, die Channelrhodopsin-1 (ChR1) und Channelrhodopsin-2 (ChR2) genannt werden. ChR1 ist in der Alge häufiger zu finden als ChR2. Allerdings ist die ChR1-Häufigkeit, im Unterschied zu ChR2, stark von Umwelteinflüssen abhängig. Während das Absorptionsmaximum von ChR2 bei 460 nm liegt, variiert das Absorptionsmaximum von ChR1 pH-abhängig von 465 nm (hoher pH-Wert) bis 505 nm (niedriger pH-Wert). Die Leitfähigkeit von ChR2 nimmt bei kontinuierlicher Beleuchtung bis zu einem festen kleineren Wert ab. Man spricht von einem desensibilisierten Zustand. Außerdem ist die Natriumselektivität bei ChR2 doppelt so groß wie bei ChR1.^{108,126,127}

Eine strukturelle Besonderheit der Channelrhodopsine sind lange Erweiterungen am C-Terminus (Abbildung 2.5d). Diese Erweiterung scheint allerdings keinen Einfluss auf die Funktion als Ionenkanal zu haben. Vielmehr hilft sie dabei, die Proteine am Augenfleck der Alge zu positionieren.¹⁰⁸

Die Photoreaktion der Channelrhodopsine soll für den Fall des ChR2 erläutert werden: Der ChR2-Photozyklus ist bei Weitem nicht so detailliert untersucht wie die Photozyklen von BR oder PR und wurde in den vergangenen Jahren mehrfach kontrovers diskutiert (Abbildung 2.5e).^{118–121,128} Klar ist allerdings, dass der Zyklus mit der Absorption von blauem Licht (460 nm) startet. Diese Anregung führt, analog zu PR, zu einer Isomerisierung des Retinals von all-*trans* zu 13-*cis*. Das Retinal ist kovalent als protonierte Schiff'sche-Base an K257 gebunden. Durch die Isomerisierung wird ein K-ähnliches Intermediat P_1 gebildet, dessen Absorption bathochrom zu 500 nm verschoben ist. Die Deprotonierung der RSB nach D253 führt zu einem M-ähnlichen Zustand P_2 , dessen Absorptionsmaximum bei 390 nm zu finden ist. Anschließend kommt es zur Öffnung des Kanals, wobei unter anderem die Bewegung von Helix B sowie die Umarrangierung des Wasserstoffbrückennetzwerkes um die RSB eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.¹⁰⁸ Dies läuft vermutlich über die Intermediate P_{2a} und P_{2b} ab, obwohl dies bis jetzt noch nicht zweifelsfrei spektroskopisch geklärt werden konnte. Das Intermediat P_3 mit einem

^d Es konnte gezeigt werden, dass ChR2 auch als „undichte“ Protonenpumpe (*leaky proton pump*) wirken kann.

Absorptionsmaximum bei 520 nm wird mit dem offenen Kanal assoziiert. Hierbei kommt es zur Reprotonierung der RSB durch D156. Auf dieses Intermediat folgt das langlebige Intermediat P_4 . P_4 hat sein Absorptionsmaximum bei 480 nm und ist damit dem Grundzustand sehr ähnlich. Es wird mit dem desensibilisierten Zustand verknüpft. Entsprechend kann man dieses Intermediat als geschlossenen Kanal interpretieren. Allerdings wird vermutet, dass hier bei kontinuierlicher Beleuchtung eine Verzweigung des Photozyklus zu einem desensitiven P_x -Intermediat stattfindet. Durch finales Schließen des Kanals beendet ChR2 seinen Photozyklus und kehrt in den Grundzustand zurück. Dies ist aus P_4 , aber auch direkt aus P_3 möglich und wird außerdem für P_x vermutet.^{108,116,117}

2.4 Spektroskopische Grundlagen

Optische Spektroskopie ist eine in Industrie und Forschung weit verbreitete Analyse­methode, denn mittels elektromagnetischer Strahlung lassen sich viele Eigenschaften von gasförmigen, flüssigen oder festen Proben untersuchen. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Proben Strahlungsenergie aufnehmen (absorbieren) oder abgeben (emittieren) können, wobei sich der energetische Zustand der Proben ändert. Dementsprechend ist es möglich, mittels Messung der Emission oder der Absorption (bzw. Transmission) einer Probe Informationen über eben diese Zustandsänderungen zu erhalten. Mittels optischer Spektroskopie ist es also möglich, energetische Zustände zu identifizieren und zu quantifizieren. Hierzu werden die Intensität (I) sowie die Wellenlänge (λ) der absorbierten (bzw. transmittierten) oder emittierten Strahlung gemessen und als Spektren aufgetragen. Die Übergänge von äußeren Elektronen in Zustände höherer potenzieller Energie befinden sich dabei typischerweise im sichtbaren Spektralbereich des Lichts (*vis*). Es können aber auch Übergänge im niederenergetischen infraroten (IR) oder im höherenergetischen ultravioletten (UV) Spektralbereich stattfinden.

2.4.1 Absorption von elektromagnetischer Strahlung

Absorbiert ein Atom oder ein Molekül Strahlung im nahen IR- bis hin zum nahen UV-Bereich, wird es vom elektronischen Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand überführt. Die so aufgenommene Energie wird dann auf unterschiedlichen Wegen (z.B. Abgabe von Wärme oder Strahlung) wieder an die Umgebung abgegeben. Die Energie kann aber auch z.B. photochemische Reaktionen auslösen und somit Photoprodukte bilden.

Damit es aber überhaupt zur Absorption kommen kann, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein: So muss die Strahlung die Resonanzbedingung des Übergangs erfüllen, das heißt, die Energie der Strahlung ($h\nu$) muss der Energiedifferenz (ΔE) des beteiligten Ausgangs- und Endzustandes entsprechen.

$$\Delta E = E_n - E_m = h\nu \quad \text{Formel 2.2}$$

Außerdem darf das Übergangsdipolmoment \vec{R}_{nm} nicht null sein, was nur der Fall ist, wenn die Wellenfunktionen der beiden Zustände bestimmte Symmetriebedingungen erfüllen.

$$\vec{R}_{nm} = \int \psi_n^*(x) \hat{\mu} \psi_m(x) dx \quad \text{Formel 2.3}$$

Hierbei steht ψ für die Wellenfunktion des Anfangs- bzw. des Endzustandes und $\hat{\mu}$ für den Übergangoperator des elektrischen Dipolmoments. Nur wenn ein Molekül einen mit der Frequenz ν schwingenden Dipol aufweist, kann es mit einem Photon der Frequenz ν wechselwirken.

Sind alle Voraussetzungen erfüllt, kann es zur Absorption von Strahlung durch ein Molekül kommen. Daraus resultiert natürlich eine Abschwächung des eingestrahlten Lichtes. Die Absorptionsspektroskopie basiert nun prinzipiell auf der Messung und Quantifizierung dieser Abschwächung. Wobei üblicherweise die Transmission (T) einer Probe bestimmt wird, das heißt, bei gegebener Wellenlänge wird das Verhältnis von durchgelassener Intensität (I) zur eingestrahlten Intensität (I_0) bestimmt.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Formel 2.4}$$

Abgesehen von Effekten wie Streuung, Beugung und Reflexion, die häufig vernachlässigt oder experimentell berücksichtigt und ausgeglichen werden können, ist die Absorption eines Stoffes linear von der Schichtdicke (d), der Stoffkonzentration (c) und dem dekadischen Extinktionskoeffizienten (ϵ) abhängig. Der Extinktionskoeffizient ist eine Stoffkonstante, die allerdings abhängig von Wellenlänge, pH-Wert und Lösungsmittel sein kann. Die oben beschriebene Abhängigkeit wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben und ist die Grundgleichung für die quantitative Absorptionsspektroskopie. Hierbei steht A für die dekadische Absorbanz, welche auch Extinktion (E) genannt werden kann.

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Formel 2.5}$$

Dieser Zusammenhang gilt allerdings nur unter bestimmten Voraussetzungen. So müssen die absorbierenden Moleküle gleichmäßig in der Probe verteilt sein. Streuung oder direkte Wechselwirkungen zwischen den

Molekülen verfälschen die Messungen. Außerdem gilt der lineare Zusammenhang zwischen Probenkonzentration und Extinktion, je nach Probe, nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich.¹²⁹

2.4.2 Folgeprozesse der Absorption: nichtstrahlende und strahlende Deaktivierung

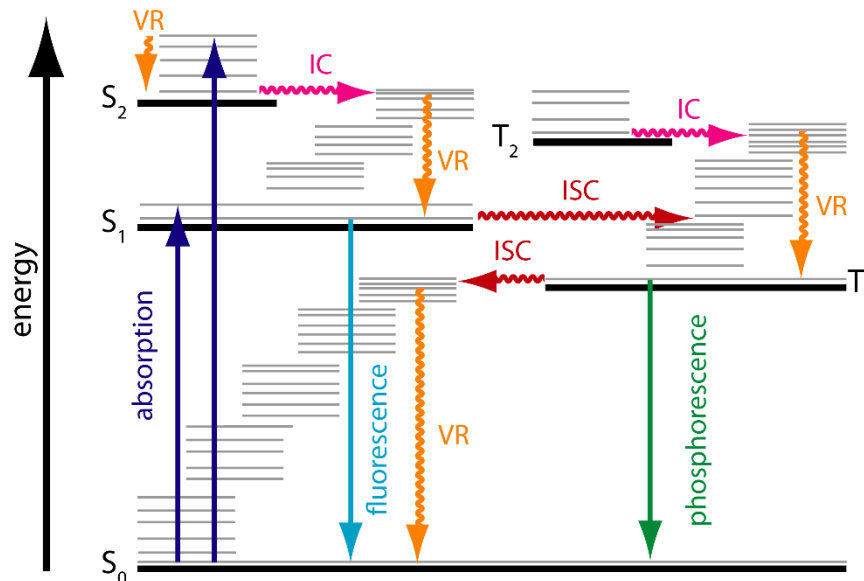


Abbildung 2.6. Beispielhaftes Jablonski-Diagramm mit molekularen Zuständen und photophysikalischen Prozessen. Die kräftigen, schwarzen Linien repräsentieren elektronische Zustände, die feinen, grauen Linien Schwingungszustände. Die geraden Pfeile stehen für strahlende Übergänge, die gewellten Linien für nichtstrahlende Übergänge. S=Singulettzustand, T=Tripletzustand, VR=Schwingungsrelaxation, IC=Interne Umwandlung, ISC=Intersystem Crossing.¹³⁰

Durch Absorption wird ein Atom oder Molekül vom Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_n) gebracht (Photoanregung, 10^{-15} s).¹³⁰ Ausgehend von diesem angeregten Zustand sind verschiedene photophysikalische bzw. photochemische Prozesse möglich, um die Zustände wieder zu entvölkern (Abbildung 2.6, Tabelle 2.1). Als photophysikalische Prozesse bezeichnet man Änderungen des elektronischen Zustands durch strahlende oder nichtstrahlende Übergänge.¹³¹ Von photochemischen Prozessen spricht man streng genommen nur bei tatsächlichen chemischen Reaktionen, die durch Absorption von Licht ausgelöst werden. Allerdings ist eine klare Trennung beider Begriffe in der Praxis nicht immer möglich.

Tabelle 2.1. Typische Zeitskalen strahlender und nichtstrahlender photophysikalischer Prozesse.¹³⁰

Prozess	Zeitskala ($\tau=1/k_{\text{Prozess}}$) /s
Absorption	10^{-15}
Schwingungsrelaxation	10^{-13} - 10^{-12}
Interne Umwandlung	10^{-12} - 10^{-6}
Intersystem Crossing (Singulett \rightarrow Triplet)	10^{-12} - 10^{-6}
Intersystem Crossing (Triplet \rightarrow Singulett)	10^{-9} - 10^1
Fluoreszenz	10^{-9} - 10^{-7}
Phosphoreszenz	10^{-6} - 10^2

2.4.2.1 Schwingungsrelaxation

Ein sehr schneller Relaxationsprozess ist die Schwingungsrelaxation (VR). Durch Schwingungen (Vibration) des Moleküls sowie durch Stöße zwischen den Molekülen und dem Lösungsmittel gibt es dabei eine Energieübertragung an die Umgebung in Form von Wärme. Hierbei wird die Spinmultiplizität nicht verändert. Im Allgemeinen ist die Energie der angeregten Zustände zu groß, um sie komplett an die Umgebung abzugeben, weshalb weitere Relaxationsprozesse nötig sind.¹³² Dabei ist zu beachten, dass die verschiedenen Relaxationsmechanismen gleichzeitig stattfinden und dadurch in Konkurrenz zueinander stehen.

2.4.2.2 Interne Umwandlung

Unter interner Umwandlung (*internal conversion*, IC) versteht man ganz allgemein strahlungslose Übergänge zwischen zwei Zuständen gleicher Multiplizität. IC findet häufig bei sich stark überlappenden elektronischen Zuständen statt und ist üblicherweise sehr schnell (10^{-12} – 10^{-6} s). Die Kombination von IC und Schwingungsrelaxation führt dazu, dass höher angeregte Zustände zunächst sehr schnell in den ersten angeregten Zustand relaxieren. Alternativ kann es aber auch z.B. zu einer chemischen Reaktion kommen, die zu einer Rückkehr in den elektronischen Grundzustand via konischer Durchschneidung (*conical intersection*, CI) führt. Alternativ ist auch sehr schnelles Intersystem Crossing (ISC) aus dem schwingungsangeregten Zustand möglich. Dieser Pfad ist z.B. in Anwesenheit von schweren Atomen (Schweratomeffekt) begünstigt.

Verschiedene Prozesse können die interne Umwandlung weiter beschleunigen, in diesen Fällen spricht man dann von verstärkter interner Umwandlung (*enhanced internal conversion*, EIC). Allerdings wird dieser Begriff in der Literatur eher schwammig verwendet und steht im Prinzip lediglich für eine sehr schnelle interne Umwandlung.

2.4.2.3 Intersystem Crossing

Ein nichtstrahlender Übergang zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Multiplizitäten wird Intersystem Crossing (ISC) genannt. Häufig findet das ISC vom S_1 in den niedrigsten Triplettzustand (T_1) statt. Allerdings liegen die Spins in Singulettzuständen gepaart und in Triplettzuständen ungepaart vor. Dementsprechend ist ein ISC mit einer Spinumkehr verbunden, die wiederum nach den Spinauswahlregeln verboten ist. Verboten bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Übergangsdipolmoment der beiden Zustände sehr klein und damit der Übergang sehr unwahrscheinlich ist. Dies führt dazu, dass das ISC, zumindest im Vergleich zu z.B. der IC, üblicherweise ein langsamer Prozess (10^{-12} – 10^1 s) ist.

Die ISC-Rate hängt darüber hinaus von der Orbitalform bzw. dem Orbitaltyp der beteiligten Zustände ab. So ist die ISC-Rate relativ hoch, wenn sich der Orbitaltyp bei dem strahlungslosen Übergang ändert. Dieser Zusammenhang wird El-Sayed-Regel genannt.¹³¹

Die Extinktionskoeffizienten von Singulett-Triplett- sowie Triplett-Singulett-Übergängen sind üblicherweise sehr klein und deshalb mittels Absorption nur schwer zu beobachten. Gleichzeitig sind die Emissionslebensdauern hoch und die entsprechenden Quantenausbeuten gering, weil strahlungslose Prozesse überwiegen. Deshalb sind die entsprechenden Zustände und damit auch ISC-Prozesse nur schwer mittels Emissionsmethoden nachzuweisen.

Außerdem sind Triplets aufgrund ihrer relativ langen Lebensdauer sehr empfindlich gegenüber verschiedenen Formen der Auslöschung (*quenching*). Typische Triplett-Quencher sind allgemein Verunreinigungen, Sauerstoff oder auch andere Triplets. Treffen zwei Triplets aufeinander, kann es dazu kommen, dass ihre Anregungsenergien kombiniert werden. Es entsteht dann ein angeregtes Singulett mit überschüssiger Schwingungsenergie. Dieser Prozess wird Triplett-Triplett-Paarzerstrahlung (Annihilation) genannt. Gibt das angeregte Singulett im Anschluss seine Energie über Fluoreszenz ab, nennt man diesen Prozess verzögerte Fluoreszenz.

Durch den Spin eines Elektrons besitzt dieses ein magnetisches Moment. Der Bahndrehimpuls bzw. die Bahnbewegung des Elektrons erzeugt ein zweites magnetisches Moment. Die Wechselwirkung dieser beiden magnetischen Momente wird Spin-Bahn-Kopplung genannt. Die ISC-Rate kann durch Vergrößerung der Spin-Bahn-Kopplung erhöht werden. Zu dieser Vergrößerung kommt es bei Anwesenheit von schweren Atomen (hohe Ordnungszahl, z.B. Br oder I) oder von paramagnetischen Molekülen.^{133,134} Man spricht hier allgemein vom Schweratomeffekt. Kommt es durch Schweratome oder paramagnetische Moleküle zu einem ISC, spricht man auch von einem induzierten ISC (IISC) oder einem verstärkten ISC (*enhanced intersystem crossing*, EISC). Ein EISC kann durchaus schneller als ein IC sein. Geht einem EISC ein Elektronenaustausch mit einem paramagnetischen Molekül, ähnlich dem Dexter-Mechanismus, voraus, spricht man von einem Elektronenaustausch-induzierten EISC (*electron exchange-induced intersystem crossing*).⁵⁶

2.4.2.4 Photolumineszenz

Relaxiert ein angeregter Zustand strahlend, also durch spontane Emission eines Photons, in den Grundzustand, so spricht man allgemein von Photolumineszenz. Hierbei gilt die Kasha-Regel, wonach die Emission meist aus dem niedrigsten angeregten Zustand einer gegebenen Multiplizität, also z.B. aus dem S_1 oder dem T_1 , erfolgt. Allerdings gibt es auch Ausnahmen zu dieser Regel, beispielsweise bei großen Energieunterschieden zwischen

den angeregten Zuständen. Prinzipiell unterscheidet man zwischen zwei Formen der Photolumineszenz. Dabei handelt es sich um die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz.

Die Fluoreszenz ist deutlich schneller als die Phosphoreszenz und ist ein strahlender Übergang vom (üblicherweise) ersten angeregten Singulettzustand in den Singulettgrundzustand. Die Spinnultiplizität wird also durch die Fluoreszenz nicht verändert. Das Fluoreszenzspektrum einer Probe ist im Vergleich zum Absorptionsspektrum bathochrom, also zu geringeren Energien hin verschoben. Eventuelle Feinstrukturen im Absorptionsspektrum treten gespiegelt auch im Fluoreszenzspektrum auf. Die Energiedifferenz zwischen den beiden spektralen Maxima wird Stokes-Verschiebung (*Stokes-Shift*) genannt. Zu dieser Verschiebung kommt es, weil der Fluorophor durch Absorption nach dem sogenannten Franck-Condon-Prinzip in einen höheren Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes gebracht wird.

Laut dem Franck-Condon-Prinzip findet der intensivste Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen vom Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes zu dem Schwingungszustand des elektronisch angeregten Niveaus statt, bei dem der Grundzustandsbindungsabstand unverändert bleibt (Franck-Condon-Punkt bzw. -Region). Grund dafür ist, dass die Atomkerne des Moleküls viel schwerer als die Elektronen sind. Analog zur Born-Oppenheimer-Näherung kann also davon ausgegangen werden, dass die Kerne zu langsam sind, um sich schnellen Prozessen wie elektronischen Übergängen anzupassen. Deshalb ändert sich der Bindungsabstand durch elektronische Anregung zunächst nicht.

Vom Franck-Condon-Punkt relaxiert der Fluorophor zunächst über Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes. Von dort erfolgt schließlich der strahlende Franck-Condon-Übergang in den elektronischen Grundzustand, also die Fluoreszenz. Durch die Schwingungsrelaxation hat die emittierte Strahlung also weniger Energie als die ursprünglich absorbierte Strahlung.

Wie oben erwähnt, ist die Phosphoreszenz (10^{-6} – 10^2 s) ein wesentlich langsamerer Relaxationsprozess als die Fluoreszenz. Ein weiterer Unterschied zur Fluoreszenz ist, dass die Phosphoreszenz aus dem ersten angeregten Triplettzustand T_1 heraus in den Singulettgrundzustand stattfindet. Dementsprechend ist der Phosphoreszenz zunächst ein ISC vorgeschaltet. Die daraus resultierende geringe Übergangswahrscheinlichkeit beeinflusst die Lebensdauer und auch die Wellenlänge der Emission. Da es im Triplett aufgrund der parallel ausgerichteten Spins zu geringeren Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Elektronen kommt, liegt das Energieniveau des T_1 unterhalb des S_1 (Hund'sche Regel).¹³⁵ Deshalb ist das Phosphoreszenzspektrum im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum bathochrom verschoben.

2.4.2.5 Photoinduzierter Elektronentransfer

Beim photoinduzierten Elektronentransfer (PET) kommt es durch eine photoinduzierte Reaktion zwischen einem Elektronendonator (D) und einem Elektronenakzeptor (A) zur Bildung eines Elektronentransferzustandes (D^+A^- ; *charge-transfer state*, CT). Der CT kann anschließend strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren, wobei ein Elektron von A^- zurück zum D^+ übertragen wird. Die Begriffe Donor und Akzeptor beziehen sich hier lediglich auf das übertragene Elektron, das heißt, der Donor muss nicht zwingend die elektronisch angeregte Spezies sein.¹³⁶

Intermolekulare Elektronentransferprozesse werden mittels der Marcus-Theorie beschrieben. Die Transferrate wird dabei mithilfe der Eyring-Gleichung beschrieben:^{131,135}

$$k_T(r) = \left(\frac{\kappa_{ET} kT}{h} \right) \exp(-\Delta G^\ddagger / RT) \quad \text{Formel 2.6}$$

Hierbei steht k für die Boltzmannkonstante, h für das Planck'sche Wirkungsquantum, R für die ideale Gaskonstante und T für die Temperatur. κ_{ET} ist der elektronische Übertragungsfaktor (*electronic transmission factor*). Der Faktor ist vom Medium abhängig. Für einen adiabatischen Elektronentransfer ist $\kappa_{ET} \approx 1$ und für einen diabatischen Elektronentransfer ist $\kappa_{ET} \ll 1$. ΔG^\ddagger beschreibt die Gibbs-Aktivierungsenergie, gibt also sozusagen die Barrierenhöhe für den Elektronenübergang an.^{131,135}

$$\Delta G^\ddagger = (\lambda + \Delta_{ET} G^\circ)^2 / 4\lambda \quad \text{Formel 2.7}$$

Danach ist letztendlich die Effizienz des Transfers abhängig vom Donor-Akzeptor-Abstand, der Standard-Gibbs-Energie $\Delta_{ET}G^\circ$ und der Reorganisationsenergie λ .^{131,135}

2.4.2.6 Förster-Resonanzenergietransfer

Die Energie des ersten angeregten Zustandes S_1 eines Moleküls (Donor) kann auch nichtstrahlend auf ein anderes Molekül (Akzeptor) übertragen werden. Der entsprechende Prozess wird Förster-Resonanzenergietransfer oder auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer^e (FRET) genannt und basiert auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor (Abbildung 2.8).¹³⁵⁻¹³⁹ Dabei kann der Akzeptor ein Fluorophor oder ein Quencher sein. Im Fall eines fluoreszierenden Akzeptors würde man nach Anregung des Donors die Fluoreszenz des Akzeptors detektieren können. Ist der Akzeptor dagegen ein Quencher, führt FRET zum Ausbleiben der Donor-Fluoreszenz. In beiden Fällen lässt sich ein FRET also relativ leicht über Fluoreszenzmethoden nachweisen. Deswegen beobachtet man FRET-Prozesse, um z.B. Abstands- und Winkelmessungen sowie Bindungsstudien zwischen verschiedenen Molekülen oder verschiedenen Gruppen in Makromolekülen durchzuführen. Dazu werden die entsprechenden Moleküle mit Fluorophoren (also Donor und Akzeptor) markiert.

Im Zuge dieser Untersuchungen nutzt man aus, dass die Effizienz der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von verschiedenen Parametern abhängt. So muss, damit ein FRET überhaupt möglich ist, die Energie des Donors S_1 hoch genug sein, um den Akzeptor anzuregen. Normalerweise wird dieser Zusammenhang spektral erklärt. Das heißt, je größer der spektrale Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors ist, umso größer ist die FRET-Effizienz. Beschrieben wird dies über das spektrale Überlappintegral $J(\lambda)$, mit der korrigierten Fluoreszenzintensität I_D des Donors sowie dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_A des Akzeptors:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{Formel 2.8}$$

Außerdem ist die FRET-Effizienz E vom Abstand r sowie von der Orientierung κ^2 der beiden Moleküle zueinander abhängig. Der genaue Zusammenhang wird von den folgenden Gleichungen (Formel 2.9 bis Formel 2.12) beschrieben.¹³⁶

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Formel 2.9}$$

Hierbei steht k_T für die Energietransferrate vom Donor zum Akzeptor. τ_D ist die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und R_0 der sogenannte Förster-Radius.

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Formel 2.10}$$

Speziell an Formel 2.10 ist zu erkennen, dass die Energietransferrate stark vom Donor-Akzeptor-Abstand abhängig ist, da sie proportional zu r^{-6} ist.

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 (\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad \text{Formel 2.11}$$

Formel 2.11 beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Förster-Radius, der relativen Orientierung κ^2 , dem spektralen Überlappintegral $J(\lambda)$, der Quantenausbeute des Donors Q_D sowie dem Brechungsindex n des Mediums.

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2 = (\sin\theta_D \sin\theta_A \cos\phi - 2\cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad \text{Formel 2.12}$$

^e Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer ist begrifflich allerdings irreführend, da der Prozess nichtstrahlend, also ohne Fluoreszenz, abläuft.

Sind darüber hinaus die Dipolmomentvektoren von Donor und Akzeptor bekannt, können die Winkel Θ_D , Θ_A , Θ_T sowie ϕ (vgl. Abbildung 2.7) bestimmt werden und die relative Orientierung κ^2 berechnet werden. Außerdem zeigt sich, dass FRET nicht möglich ist, wenn die Dipole senkrecht zueinander stehen ($\kappa^2=0$, $R_0=0$, $E=0$).

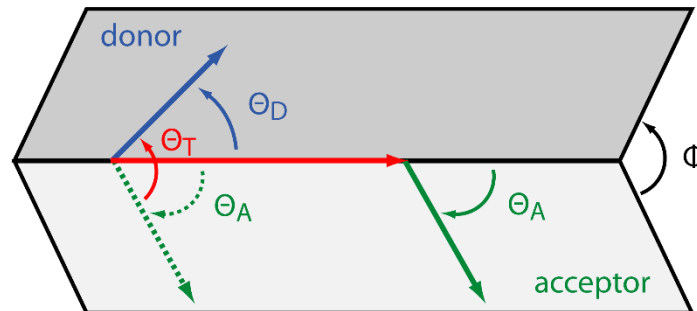


Abbildung 2.7. Schematische Darstellung zur Zuordnung der verschiedenen Winkel zwischen Donor und Akzeptor beim Förster-Resonanzenergietransfer.¹³⁶

Umgekehrt kann natürlich die FRET-Effizienz leicht gemessen werden, indem die Fluoreszenzintensität (I) oder die Fluoreszenzlebensdauer (τ) des Donors in An- und Abwesenheit (I_{DA}/I_D) des Akzeptors gemessen wird.¹³⁶ Aus der gemessenen FRET-Effizienz lassen sich dann Rückschlüsse auf den Abstand sowie eventuell auch auf die relative Orientierung von Donor und Akzeptor ziehen.

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad \text{Formel 2.13}$$

Allerdings ist der Bereich, in dem sinnvolle Abstandsmessungen via FRET möglich sind, sehr begrenzt. Als Daumenregel sind Abstandsmessungen im Bereich von $r=0,5R_0$ bis $r=2R_0$ möglich, was einem Abstand von ca. 1–10 nm entspricht.^{136,138,139}

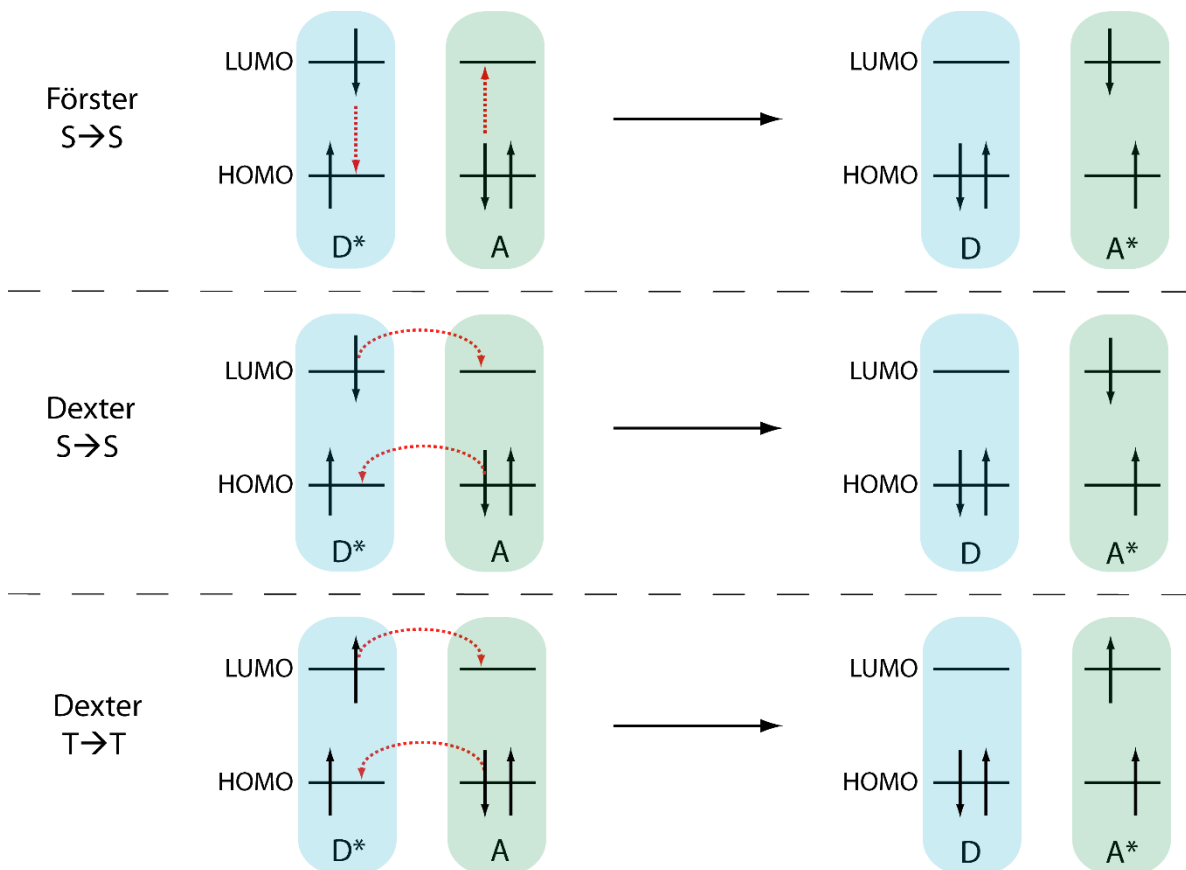


Abbildung 2.8. Schematische Darstellung des Energietransfers von einem angeregten Donor D^* zu einem Akzeptor im Grundzustand nach dem Förster- (oben) und dem Dexter-Mechanismus (Mitte und unten).¹⁴⁰

2.4.2.7 Dexter-Energietransfer

Als Dexter-Mechanismus bezeichnet man einen weiteren nichtstrahlenden, meistens intermolekularen Quenchingprozess (Abbildung 2.8). Dabei findet ein konzertierter Elektronenaustausch zwischen zwei Molekülen oder zwei funktionellen Gruppen statt. Hierbei handelt es sich um einen Donor, mit einem angeregten Elektron, und einen Akzeptor im Grundzustand, der dieses Elektron aufnehmen kann. Damit es zu einem Elektronenaustausch kommen kann, müssen sich die Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor überlappen. Ist dies der Fall, kann es zu den folgenden zwei Elektronen-Transferprozessen kommen: Im Donor-LUMO (niedrigstes besetztes Molekülorbital, *lowest unoccupied molecular orbital*) befindet sich ein angeregtes Elektron, welches in das Akzeptor-LUMO übertragen wird. Zeitgleich wird ein Elektron des Akzeptor-HOMOs (höchst besetztes Molekülorbital, *highest occupied molecular orbital*) in das Donor-HOMO übertragen. Letztendlich führt dies zu einem Donor im Grundzustand und einem angeregten Akzeptor. Deshalb spricht man im Zusammenhang mit dem Dexter-Mechanismus auch von einem (Anregungs-) Energietransfer.^{131,136}

Zu einem Überlapp der Wellenfunktionen kommt es allerdings nur bei sehr geringem Abstand (typischerweise ≤ 1 nm) zwischen Donor und Akzeptor. Dies bedeutet, dass es im Fall eines intermolekularen Dexter-Prozesses zu einem Kontakt zwischen Donor und Akzeptor mittels eines Stoßes kommen muss. Dementsprechend müssen die Donor- und Akzeptor-Konzentrationen bzw. die Temperatur sehr hoch sein, um Stöße zu begünstigen. Auch bei intramolekularen Reaktionen müssen die Donor- und Akzeptorgruppe direkt benachbart sein. Die Abstandsabhängigkeit lässt sich gut an der Formel für die Dexter-Transferrate erkennen:^{131,136}

$$k_T(r) = \left(\frac{1}{\hbar}\right) K J \exp(-2r/L) \quad \text{Formel 2.14}$$

Hierbei steht \hbar für das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum^f, r für den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, L für den mittleren Van-der-Waals-Radius, K für eine experimentelle Konstante (in Energieeinheiten) sowie J für das spektrale Überlappintegral $J(\lambda)$.¹³¹

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) d\lambda \quad \text{Formel 2.15}$$

Hierbei steht I_D für die normierte Fluoreszenzintensität des Donors und ε_A für den normierten molaren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors.

Der Dexter-Mechanismus ist sowohl für angeregte Singulett als auch für Triplett möglich (Abbildung 2.8). Dementsprechend wird der Dexter-Mechanismus auch zur Beschreibung des Triplett-Triplett-Energietransfers verwendet.^{130,131,140} So kann die Triplett-Triplett-Paarzerstrahlung als ein Spezialfall des Dexter-Mechanismus zwischen zwei Triplett gesehen werden.

2.4.3 Fluoreszenzeigenschaften

Die grundlegendsten Eigenschaften eines Fluorophors sind die Fluoreszenzquantenausbeute sowie die Fluoreszenzlebensdauer. Vor allem im Zusammenhang mit biologischen Makromolekülen ist außerdem die Fluoreszenzanisotropie eine wichtige Kenngröße. Deshalb sollen diese drei Fluoreszenzcharakteristika in den folgenden Unterkapiteln kurz erläutert werden. Für Details sei auch hier auf etablierte Lehrbücher verwiesen.¹³⁶

2.4.3.1 Fluoreszenzquantenausbeute

Als Fluoreszenzquantenausbeute (FQY) wird das Verhältnis der emittierten (n_{em}) und absorbierten (n_{abs}) Photonen einer Probe bezeichnet. Darüber hinaus kann die FQY auch über die strahlende (k_r) und die nichtstrahlende (k_{nr}) Abgungsraten des angeregten Zustandes definiert werden.¹³⁶

$$FQY = \frac{n_{em}}{n_{abs}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Formel 2.16}$$

^f $\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,054571800 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$

Falls die nichtstrahlende Rate im Vergleich zur strahlenden Rate sehr klein ist, reicht die Quantenausbeute nahe an eins (bzw. 100%) heran. Aufgrund schneller Relaxation in den Schwingungsgrundzustand (Stokes-Verluste) nach der Anregung eines Fluorophors kann es allerdings keine Energieausbeute von eins geben.¹³⁶ Zur Bestimmung der Quantenausbeute gibt es prinzipiell zwei Methoden:^{141,142}

Bei der relativen Methode misst man unter gleichen Bedingungen ein Fluoreszenzspektrum der zu bestimmenden Probe und ein Fluoreszenzspektrum eines anderen Fluorophors, dessen Quantenausbeute schon bekannt ist.¹⁴³ Der Fluorophor mit bekannter Quantenausbeute wird dabei als Quantenausbeutestandard bzw. Referenz verwendet und sollte eine ähnliche Quantenausbeute wie die Probe haben. Durch Integration der Spektren kann nun die unbekannte Quantenausbeute relativ zum Standard bestimmt werden. Dabei muss allerdings auch der Brechungsindex von Probe und Referenz bestimmt und bei der Berechnung mit einbezogen werden. Zur Erhöhung der Genauigkeit der Methode fertigt man üblicherweise eine Verdünnungsreihe (mindestens fünf Konzentrationen) von Probe und Referenz an. Die Konzentrationen von Probe und Referenz werden jeweils über Absorptionmessungen bestimmt. Die integrierten Flächen der Emissionsspektren von Probe und Referenz werden gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Im Optimalfall entsteht dabei jeweils eine Gerade, die linear angepasst werden kann. Die relative Quantenausbeute lässt sich dann über das Verhältnis der Steigungen der Anpassungsfunktionen berechnen.¹⁴⁴

Diese Methode ist instrumentell sehr einfach und experimentelle Fehler zeigen sich relativ schnell und deutlich. Allerdings ist die Methode, vor allem zeitlich gesehen, recht aufwendig. Die vielen experimentellen Schritte sind darüber hinaus natürlich fehleranfällig.[§] Darüber hinaus wird die Methode durch die Wahl des Fluoreszenzstandards und des entsprechenden Literaturwertes extrem beeinflusst. Grund dafür ist, dass es für die üblichen Standards eine Vielzahl von leicht unterschiedlichen Literaturwerten gibt.

Instrumentell aufwendiger, aber wesentlich schneller durchzuführen ist die absolute Methode zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute. Hierbei kommt eine sogenannte Ulbricht-Kugel^h zum Einsatz. Dabei handelt es sich im Prinzip um eine Hohlkugel, deren Innenseite mit einem diffus streuenden Material (z.B. TiO₂ oder BaSO₄) bedeckt ist. Im Zentrum der Kugel befindet sich die Probe. Über eine kleine Öffnung in der Hohlkugel kann die Probe angeregt werden. Das komplette Streulicht aus der Anregung sowie das komplette Emissionslicht der Probe werden an der Innenseite der Kugel mehrfach reflektiert und so schließlich über eine zweite kleine Öffnung der Kugel zu einem Detektor geleitet. Zur Bestimmung von absoluten Quantenausbeuten werden unter exakt gleichen Bedingungen ein Lösungsmittel- sowie ein Probenspektrum aufgezeichnet. Durch Integration der entsprechenden Banden kann dann direkt auf die Anzahl der absorbierten und emittierten Photonen zurückgeschlossen werden und so die Quantenausbeute berechnet werden. Details zur Messung und Auswertung sowie zu möglichen Fehlerquellen sind im Material- und Methodenteil (Kapitel 3.2.3) beschrieben.

Beide Methoden haben eine Reihe von Vor- und Nachteilen bei vergleichbarer Genauigkeit.¹⁴² Alle im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten wurden mittels der absoluten Methode bestimmt.

2.4.3.2 Fluoreszenzlebensdauer

Die mittlere Zeit, die ein Molekül in einem angeregten Zustand verbringt, bevor es in den Grundzustand relaxiert, wird Lebensdauer des jeweiligen Zustandes genannt. Die Fluoreszenzlebensdauer entspricht also der Lebensdauer des emittierenden Zustandes, wobei es sich häufig um den S₁-Zustand handelt. Dementsprechend ist die Lebensdauer von der strahlenden (k_r) und der nichtstrahlenden (k_{nr}) Abregungsrate abhängig.^{136,145}

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Formel 2.17}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer kann also berechnet werden, wenn die beiden Raten bekannt sind. Häufiger wird sie allerdings mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (*time-correlated single photon counting*, TCSPC) ermittelt. Die entsprechende Mess- und Auswertemethode ist im Material- und Methodenteil (Kapitel 3.3.2) im Detail beschrieben.

[§] Dies ist natürlich unabhängig davon, ob die Fehler leicht feststellbar sind oder nicht.

^h Nach dem deutschen Ingenieur Richard Ulbricht (1849–1923).

2.4.3.3 Fluoreszenzanisotropie

Werden Fluorophore mit polarisiertem Licht angeregt, führt dies dazu, dass auch die resultierende Emission polarisiert ist. Die Fluoreszenzanisotropie ist ein Maß für diese Polarisation des Fluoreszenzlichtes.¹³⁶

In Lösung sind Fluorophore üblicherweise zufällig orientiert. Trifft nun polarisiertes Anregungslicht auf die Moleküle, kann es zur Absorption der Strahlung kommen. Allerdings muss dazu das Übergangsdipolmoment des Fluorophors annähernd parallel zur Polarisation des Anregungslichts stehen. Die durch Absorption angeregten Moleküle haben also alle eine ausgewählte, räumliche Orientierung. Man spricht in diesem Zusammenhang von Photoauswahl (*photoselection*) der Moleküle. Die Emission findet ebenfalls entlang eines Übergangsmoments statt und ist dementsprechend polarisiert. Allerdings kann es im Zeitraum zwischen Absorption und Emission zur Depolarisierung der Strahlung kommen. Grund dafür ist unter anderem die Rotationsdiffusion. Die entsprechende Rotationskorrelationskonstante (θ) ist abhängig von der Viskosität des Lösungsmittels (η), der Temperatur (T) sowie dem Volumen (V ; genauer Größe und Form) des Fluorophors.¹³⁶

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \quad \text{Formel 2.18}$$

Natürlich kann aber auch interne Flexibilität des Fluorophors zur Depolarisation der Emission führen. Entsprechend verändert sich die Anisotropie (r) einer Probe über die Zeit (t):¹³⁶

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} \quad \text{Formel 2.19}$$

Hier beschreibt r_0 die Ausgangsanisotropie. In Lösung kann r_0 maximal einen Wert von 0,4 annehmen. Dieser Wert ergibt sich aus der Anregungswahrscheinlichkeit eines Fluorophors in Lösung durch polarisiertes Licht. Höhere Werte (bis max. 1) lassen sich nur in Festkörpern bzw. in Kristallen erreichen.¹³⁶

Die Fluoreszenzanisotropie ist außerdem auch abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer (τ). Dieser Zusammenhang wird durch die Perrin-Gleichung beschrieben:¹³⁶

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \quad \text{Formel 2.20}$$

Vor allem die Volumenabhängigkeit der Anisotropie ist für viele biologische und biochemische Fragestellungen interessant. So werden statische und zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzanisotropie häufig zur Beobachtung von Denaturierungsprozessen, Assoziationsreaktionen oder (Liganden-)Bindungsdynamiken eingesetzt. Hierbei wird über die Änderung der Anisotropie bzw. der Rotationskorrelationszeit auf Änderungen des Volumens des Makromoleküls zurückgeschlossen.¹⁴⁶ Natürlich ist es auch möglich, das Volumen des Fluorophors über die Rotationskorrelationszeit zu berechnen.¹⁴⁷ Außerdem werden durch diese Methode FRET-Messungen zwischen gleichen Fluorophoren (Homo-FRET) möglich.¹³⁶

Details zu statischen und zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen sind im Material- und Methodenteil zu finden (Kapitel 3.2.4 und 3.3.3).^{136,148,149}

2.5 Infrarot-Spektroskopie

Die elektromagnetische Strahlung im Bereich zwischen 780 nm und 1 mm wird als Infrarotstrahlung bezeichnet. Dieser Bereich wird grob in drei weitere Regionen aufgeteilt: nahes Infrarot (NIR; 780 nm–2,5 μm), mittleres Infrarot (MIR; 2,5 μm –50 μm) und fernes Infrarot (FIR; 50 μm –1 mm). Zur spektroskopischen Untersuchung von organischen Molekülen ist die MIR-Region besonders aussagekräftig.¹⁵⁰

Im Unterschied zum UV/vis-Bereich wird die elektromagnetische Strahlung im IR-Bereich üblicherweise nicht in Wellenlängeneinheiten, sondern in Wellenzahlen ($\tilde{\nu}$) angegeben. Die Wellenzahlen sind Energieeinheiten und direkt proportional zur Frequenz (ν) des Lichts.^{150–152}

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Formel 2.21}$$

In den obigen Abschnitten wurde die Absorption von naher Infrarot- über sichtbare bis hin zu Ultraviolettstrahlung beschrieben. Dabei werden die elektronischen Energieniveaus der Atome und Moleküle beeinflusst. Die Energie von (mittlerer) Infrarotstrahlung ist allerdings zu gering, um Proben elektronisch anzuregen. Infrarotstrahlung führt aber zu Schwingungsanregungen und Rotationen der Probe. Ein Molekül kann allerdings nur schwingungsangeregt werden, wenn die Energie der Strahlung die Resonanzbedingung der Schwingung erfüllt. Des Weiteren muss die Schwingung eine periodische Änderung des Dipolmoments des Moleküls induzieren. Je größer die Änderung des Dipolmoments ist, umso intensiver ist die entsprechende Absorptionsbande. Symmetrische zweiatomige Moleküle wie Stickstoff absorbieren deshalb keine IR-Strahlung.^{150–152}

2.5.1 Grundlagen der Infrarot-Spektroskopie

Als simples Modell für Molekülschwingungen kann der harmonische Oszillator herangezogen werden. Als Näherung stellt man sich dabei die Atome als Massen (m_n) vor, die wiederum über masselose Bindungen miteinander wechselwirken. Dabei verhalten sich die Bindungen quasi wie Spiralfedern. Die Elektronen werden bei dieser Näherung vernachlässigt. Die Atome können sich relativ zueinander bewegen, indem die Bindungslänge variiert wird (Streckschwingung) oder sich ein Atom aus der ursprünglichen Fläche hinaus bewegt (Biegeschwingung). Ausgehend von der Federnäherung können die Schwingungen über das Hooke'sche Gesetz beschrieben werden, wobei die Feder durch die Federkonstante (k) und die Auslenkung (Δr) beschrieben wird.^{150–152}

$$F = -k \cdot \Delta r \quad \text{Formel 2.22}$$

Daraus ergibt sich für die potenzielle Energie des eindimensionalen harmonischen Oszillators folgender Zusammenhang:^{150–152}

$$E_{pot} = \frac{1}{2} \cdot k \cdot x^2 \quad \text{Formel 2.23}$$

Für eine vollständige Beschreibung der molekularen Bewegungen reicht allerdings diese klassische Näherung nicht aus. Denn laut Quantenmechanik (Planck'sche Quantentheorie) erfolgt die Energieabsorption der IR-Strahlung gequantelt. Die entsprechenden Energiezustände entsprechen den Energieeigenwerten des eindimensionalen harmonischen Oszillators:^{150–152}

$$E_n = h \cdot \nu \cdot \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad \text{Formel 2.24}$$

Hierbei steht h für das Planck'sche Wirkungsquantum und n für die Schwingungsquantenzahl. Jedes dieser äquidistanten Energieniveaus entspricht einer harmonischen Schwingung. Die Energie bei $n=0$ wird Nullpunktenergie genannt. Der Übergang von $n=0$ zu $n=1$ beim harmonischen Oszillator wird als Normalschwingung bezeichnet. Andere Übergänge sind in dieser Näherung nicht erlaubt.^{150–152}

Wiederum aus der klassischen Mechanik kommt der folgende Ausdruck für die Frequenz einer harmonischen Schwingung:^{150–152}

$$\nu = \left(\frac{1}{2\pi} \right) \sqrt{k/\mu} \quad \text{Formel 2.25}$$

Als zusätzliche Näherung wird hierbei die reduzierte Masse (μ) eingeführt.

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{Formel 2.26}$$

Daraus zeigt sich, dass die Schwingungsfrequenz mit der Stärke der Bindung steigt und mit Zunahme der reduzierten Masse sinkt.

Allerdings können mit der harmonischen Näherung nicht alle Phänomene der IR-Spektroskopie erklärt werden. Benutzt man deshalb als Näherung den realistischeren anharmonischen Oszillator, zeigt sich, dass die Abstände der Energieniveaus nicht mehr äquidistant sind. Die Abstände werden vielmehr bei höheren Energien immer geringer, bis die Atome schließlich an der Dissoziationsgrenze (D) dissoziieren. Die Energie von IR-Strahlung reicht allerdings nicht aus, um diese Grenze zu erreichen.¹⁵⁰⁻¹⁵²

Im Unterschied zum harmonischen Oszillator sind bei dieser Näherung Übergänge über $n=1$ hinaus erlaubt. Diese Übergänge werden Oberschwingungen genannt und sind im IR-Spektrum im Vergleich zu den Normalschwingungen geringer ausgeprägt.

Die maximal mögliche Schwingungszahl eines Moleküls kann theoretisch abgeschätzt werden. Dazu betrachtet man die Freiheitsgrade des Moleküls. Allgemein weisen vielatomige Moleküle mit N Atomen $3N$ Freiheitsgrade auf. Betrachtet man nun zunächst beispielsweise ein simples zweiatomiges Molekül, bedeutet das also sechs Freiheitsgrade. Diese Zahl ergibt sich aus drei Translations- und zwei Rotationsfreiheitsgraden sowie einer Streckschwingung zwischen den beiden Atomen. Ein dreiatomiges gewinkeltes Molekül hat dementsprechend neun Freiheitsgrade. Diese teilen sich wiederum auf drei Translations- und drei Rotationsfreiheitsgrade auf. Die verbleibenden drei Freiheitsgrade sind Schwingungsfreiheitsgrade. Im Einzelnen sind dies eine Deformationsschwingung (Beugeschwingung) sowie jeweils eine symmetrische und eine antisymmetrische Valenzschwingung (Streckschwingung). Entsprechend dieser Vorgehensweise kann also die maximale Anzahl an Schwingungsfreiheitsgraden bzw. Schwingungen ermittelt werden. Allerdings verursachen nicht alle Schwingungen eine periodische Änderung des Dipolmoments, weswegen nicht alle theoretisch möglichen Schwingungen im IR-Spektrum zu sehen sind. Man spricht in diesem Zusammenhang von IR-aktiven und IR-inaktiven Schwingungen. Außerdem kann es auch vorkommen, dass verschiedene Schwingungen die gleiche Frequenz aufweisen. Dementsprechend ist im IR-Spektrum nur eine Bande für beide Schwingungen zu sehen. Dieses Phänomen wird als Entartung bezeichnet.¹⁵⁰⁻¹⁵²

Allerdings kann es durch das Auftreten von Oberschwingungen oder Kombinationsschwingungen auch zu einer größeren Anzahl an IR-Banden kommen als durch die Schwingungsfreiheitsgrade vorhergesagt. Zu Kombinationsschwingungen kommt es durch Kombination der Frequenzen von zwei oder mehreren Normalschwingungen. Außerdem kann es durch Fermi-Abstoßung (Fermi-Resonanz) zur Aufspaltung von eigentlich entarteten Banden kommen. Dieser Effekt tritt auf, wenn eine Grundschiwingung und eine Oberschwingung eine ähnliche Frequenz (bzw. Energie) aufweisen.¹⁵⁰⁻¹⁵²

2.5.2 Infrarot-Strahlungsquelle und Detektoren

Als Strahlungsquellen in IR-Spektrometern werden üblicherweise sogenannte schwarze oder Planck'sche Strahler verwendet. Im MIR-Bereich handelt es sich dabei normalerweise um einen Siliziumkarbidstab (SiC). Dieser sogenannte Globar wird elektrisch geheizt, wodurch er breitbandig Strahlung im IR-Bereich emittiert. Die emittierte Strahlungsintensität ist allerdings relativ gering, was häufig eine Limitation der IR-Spektrometer darstellt.^{150,151,153}

In der IR-Spektroskopie werden verschiedenste IR-Detektortypen eingesetzt. Die Detektoren unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit, ihrem Wellenlängenbereich, ihrer Ansprechgeschwindigkeit (Anstiegszeit) und ihrem Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Über das Detektionsprinzip ist es möglich, zwei Klassen zu unterscheiden: thermische Detektoren (z.B. DTGS) und Quantendetektoren (z.B. MCT).^{150,151,153}

2.5.2.1 Thermidetektoren

Thermidetektoren bestehen aus Materialien, die Wärmeenergie in elektrische Energie umwandeln können. An der Kontaktstelle zweier verschiedener Metalle entsteht dabei eine sogenannte Thermospannung. Die Empfindlichkeit

der Detektoren ist spektral unabhängig. Nachteilig ist allerdings, dass die Ansprechgeschwindigkeit dieser Detektoren üblicherweise recht gering ist (ms-Bereich).^{150,151,153}

Eine Untergruppe der Thermodetektoren mit allgemein schnelleren Ansprechgeschwindigkeiten sind die pyroelektrischen Empfänger. Dabei handelt es sich um strahlungsempfindliche Kondensatoren mit einem ferroelektrischen Material als Dielektrikum. Die Ferroelektrizität des Materials tritt allerdings nur unterhalb der sogenannten Curie-Temperatur auf. Kommt es unterhalb der Curie-Temperatur zu einer schnellen Temperaturänderung aufgrund von IR-Strahlung, so führt dies zu einer spontanen elektrischen Polarisation des Dielektrikums. Die Polarisationsänderung ist als Spannungsstoß messbar. Ein typisches Material für pyroelektrische Thermodetektoren ist deuteriertes Triglycerinsulfat (DTGS).^{150,151,153} In modernen Spektrometern verwendet man allerdings vor allem L-Alanin-dotiertes DTGS (kurz DLaTGS oder DLTGS) als Detektormaterial.¹⁵³ Die L-Alanin-Dotierung sorgt unter anderem für eine höhere Detektionsempfindlichkeit des Materials.¹⁵⁴

2.5.2.2 Quantendetektoren

Quantendetektoren sind normalerweise wesentlich empfindlicher als Thermodetektoren und bestehen aus Halbleitermaterialien. Strahlung sorgt hier beispielsweise dafür, dass Elektronen im Halbleiter vom Valenz- in das Leitungsband angehoben werden. Da die Energie der Photonen direkt proportional zur Wellenzahl ist, ist im Fall von Quantendetektoren auch die Detektorempfindlichkeit wellenzahlabhängig. Allerdings können Elektronen auch thermisch vom Valenz- in das Leitungsband angehoben werden, was zu starkem Rauschen des Signals bei Raumtemperatur führt. Dementsprechend werden Quantendetektoren üblicherweise gekühlt, um dieses Rauschen zu minimieren.^{150,151,153}

Im MIR-Bereich werden meistens sogenannte MCT-Detektoren eingesetzt, die mit flüssigem Stickstoff auf rund 77 K heruntergekühlt werden. MCT steht dabei für das Halbleiterdetektormaterial Quecksilber-Cadmium-Tellurid (*mercury cadmium telluride*). MCT-Detektoren sind typischerweise 10-50 Mal sensitiver als DTGS-Detektoren. Allerdings ist der lineare Bereich der MCT-Detektoren deutlich kleiner, weshalb sie bei hohen Signalstärken zum Übersättigen neigen.^{150,151,153}

MCT-Detektoren können im Photoleitfähigkeits- (*photoconductive*, PC) oder im Photospannungsmodus (*photovoltaic*, PV) betrieben werden. Bei der Photoleitfähigkeitsmessung wird ausgenutzt, dass durch die einfallende Strahlung ein Elektron-Loch-Paar entsteht. Dadurch verändert sich die Stromstärke entlang des Detektormaterials. Bei der Photospannungsmessung wird ebenfalls die strahlungsinduzierte Bildung eines Ladungsträgerpaares ausgenutzt. Im Unterschied zu PC-Detektoren ist dieses Paar allerdings über eine n-p-Grenzschicht voneinander getrennt, wodurch eine elektrische Spannung entsteht. Photovoltaik-MCT-Detektoren werden vor allem bei zeitaufgelösten Messungen eingesetzt, da hier Anstiegszeiten von rund 10 ns erreicht werden können. Allerdings sind die PV-Detektoren weniger sensitiv (ca. Faktor 2) und der detektierbare spektrale Bereich ist kleiner.^{150,151,153}

2.5.3 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Während die Probe in der UV/vis-Spektroskopie monochromatisch angeregt wird, versucht man in der IR-Spektroskopie, einen möglichst großen Frequenzbereich anzuregen, um eventuell auftretende Resonanzen zu sehen. Entsprechend wurde in der Anfangszeit der IR-Spektroskopie das breitbandige (polychromatische) IR-Anregungslicht über ein dispergierendes Element geschickt und die Probe so nach und nach mit einzelnen Frequenzen angeregt. Dieses Verfahren hatte allerdings diverse Nachteile. So war die Methode zum Beispiel sehr zeitaufwendig, was bei hohem Probenaufkommen wie z.B. in industriellen Analytiklaboren üblich ein nicht zu unterschätzender Faktor ist. Dementsprechend setzte sich die IR-Spektroskopie erst nach der Entwicklung des Fourier-Transformations-Infrarotspektrometers (FTIR) vollständig als Standardanalyseverfahren durch.

Ein solches Spektrometer besteht im Wesentlichen aus einer IR-Quelle, einem Michelson-Interferometer, einem Probenhalter sowie einem IR-Detektor inklusive Auswertelektronik (Abbildung 2.9a). Das Herzstück des Spektrometers ist das Michelson-Interferometer, welches aus einem Strahlteiler sowie einem stationären und einem beweglichen Spiegel besteht. Der bewegliche Spiegel wird kontinuierlich und gleichmäßig vor- und zurückbewegt, wodurch der Abstand zwischen Strahlteiler und Spiegel periodisch verändert wird. Die breitbandige IR-Strahlung der Anregungsquelle wird durch den Strahlteiler in zwei Arme aufgeteilt. Im ersten Arm läuft die Strahlung bis zu dem stationären Spiegel und wird wieder zurück zum Strahlteiler geschickt. Im zweiten Arm trifft

die Strahlung dagegen auf den beweglichen Spiegel und wird ebenfalls zum Strahlteiler zurückgeschickt. Am Strahlteiler kommt es, unabhängig von der Wellenlänge des Lichts, zur Interferenz der reflektierten Strahlung aus beiden Interferometerarmen. Je nach Position des beweglichen Spiegels handelt es sich dabei um konstruktive oder destruktive Interferenz (Abbildung 2.9b). Durch das Abfahren aller möglichen Spiegelpositionen (x) entsteht dadurch ein Interferogramm ($I(x)$), welches mittels eines Detektors aufgezeichnet werden kann. Im Interferogramm ist die Strahlungsintensität gegen die relative Spiegelposition aufgetragen. Durch Fourier-Transformation des Interferogramms lässt sich wiederum ein IR-Spektrum ($S(\tilde{\nu})$) errechnen.^{153,155}

$$S(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) e^{-i2\pi\tilde{\nu}x} dx \quad \text{Formel 2.27}$$

Umgekehrt kann auch aus dem wellenzahlabhängigen Spektrum, über Rücktransformation, wieder das Interferogramm berechnet werden.^{153,155}

$$I(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} S(\tilde{\nu}) e^{i2\pi\tilde{\nu}x} d\tilde{\nu} \quad \text{Formel 2.28}$$

Im transformierten Spektrum ($S(\tilde{\nu})$), dem sogenannten Einkanalpektrum, ist die Intensität gegen die Wellenzahl aufgetragen. Üblicherweise handelt es sich dabei um ein Transmissionsspektrum (T), welches aber leicht in ein Absorptionsspektrum (A) überführt werden kann.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Formel 2.29}$$

$$A = \lg\left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{Formel 2.30}$$

Ohne Probe im Probenhalter entspricht dieses Spektrum prinzipiell dem Spektrum der IR-Quelle. Bringt man nun allerdings eine Probe in den IR-Strahl zwischen Interferometer und Detektor ein, wird die Intensitätsverteilung innerhalb des Interferogramms entsprechend der Absorption der Probe abgeschwächt. Durch Fourier-Transformation erhält man wiederum ein Absorptions- bzw. Transmissionsspektrum. Durch anschließende Quotientenbildung erhält man schließlich das eigentliche Absorptions- bzw. Transmissionsspektrum der Probe.^{150,151,153}

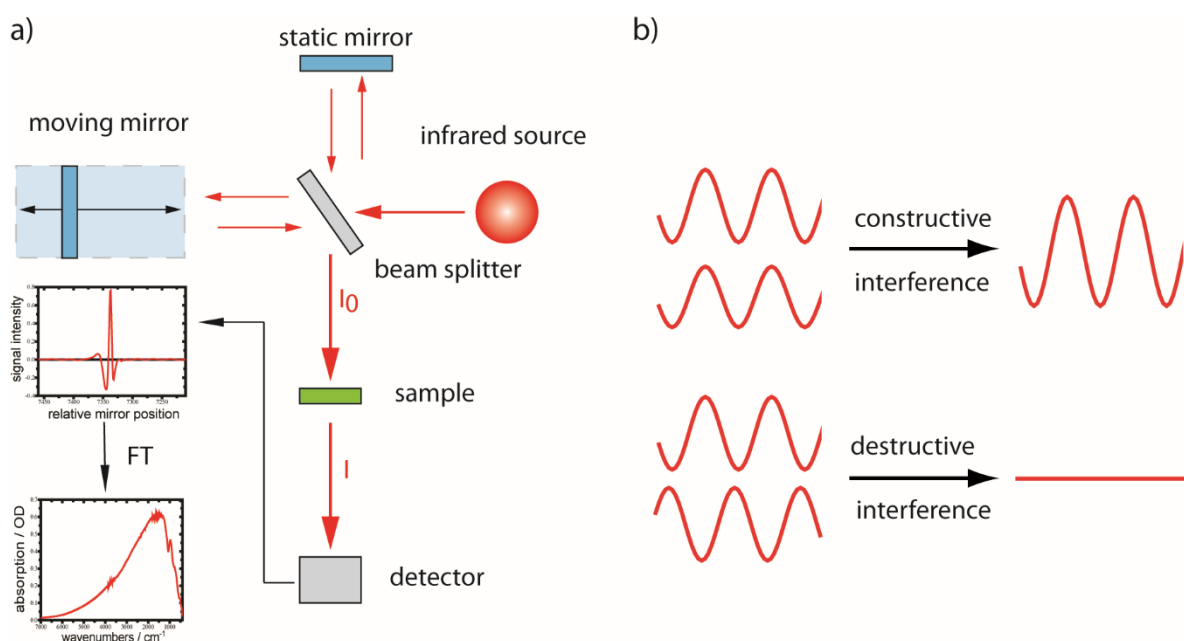


Abbildung 2.9. a) Schemazeichnungen eines Michelson-Interferometers inkl. beispielhafter Fourier-Transformation.¹⁵¹
b) Beispiel für konstruktive und destruktive Interferenz zweier Wellen.

2.5.3.1 Vorteile der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Wie schon weiter oben erwähnt, haben FTIR-Spektrometer diverse Vorteile gegenüber dispersiven IR-Spektrometern:^{150,151,153}

- Multiplex- oder Fellgett-Vorteil: Dadurch, dass alle abgetasteten Frequenzen gleichzeitig auf den Detektor fallen, verteilt sich das Rauschen des Detektors auf alle Spektralinkremente. Dies verbessert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Außerdem hängt die Aufnahmezeit eines Spektrums nur an der Bewegungsgeschwindigkeit des beweglichen Spiegels. Da der Spiegel aber sehr schnell und kontinuierlich bewegt werden kann, ermöglicht dies das schnelle Mitteln von einzelnen Spektren. Außerdem werden zeitaufgelöste Messungen möglich.
- Jacquinet- oder Throughput-Vorteil: Da keine dispersiven Elemente verwendet werden müssen, ist es nicht nötig, die Strahlungsintensität über einen rechteckigen Schlitz zu regeln. In FTIR-Spektrometern können kreisrunde Aperturen verwendet werden, die einen deutlich höheren Strahlungsdurchsatz ermöglichen (mind. Faktor 6). Dies verbessert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.
- Connes-Vorteil: Die Wellenzahlgenauigkeit eines FTIR-Spektrometers ist sehr hoch. Grund dafür ist, dass dieser Wert direkt mit der Positionsbestimmung des beweglichen Spiegels zusammenhängt. Diese wird interferometrisch mittels eines ins Interferometer eingekoppelten He-Ne-Lasers bestimmt. Die Methode ermöglicht, die Position mit einer Genauigkeit von 0,005 μm zu bestimmen, was in einer Wellenlängengenauigkeit von besser als 0,01 cm^{-1} resultiert. Dieser Vorteil ist entscheidend für die Differenzspektroskopie sowie für die Übertragbarkeit von Daten zwischen verschiedenen Spektrometern.

Mittels FTIR-Spektroskopie lassen sich also auch Proben untersuchen, die nur sehr kleine Signale oder Signaländerungen aufweisen. Im Vergleich zu dispersiven Spektrometern ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert. Außerdem können einzelne Spektren deutlich schneller und präziser aufgenommen werden, was letztlich Differenzspektroskopie sowie zeitaufgelöste Messungen ermöglicht.

2.5.3.2 Ausgewählte Parameter der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Im Vergleich zu UV/vis-Spektrometern weisen FTIR-Spektrometer eine wesentlich größere Anzahl an Messparametern auf, von denen eine Auswahl kurz beschrieben werden soll:^{151,153,156}

- Die Geschwindigkeit (V) des beweglichen Spiegels hat Einfluss auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie auf die Messzeit eines Spektrums. Sie wird üblicherweise als Fourier-Frequenz $f(\tilde{\nu})$ der He-Ne-Laser-Emission ($\tilde{\nu}$) in kHz angegeben.¹

$$f(\tilde{\nu}) = 2V\tilde{\nu} \quad \text{Formel 2.31}$$

- Die Auslenkung des beweglichen Spiegels kann nicht unendlich groß sein, weshalb auch das Interferogramm nicht unendlich ist. Die entsprechende diskrete Fourier-Transformation führt hierbei dazu, dass die Auflösung des IR-Spektrums durch die maximale Auslenkung des beweglichen Spiegels begrenzt wird. Je größer die Auslenkung, umso besser ist die spektrale Auflösung.
- Außerdem verursacht die diskrete Fourier-Transformation des abgeschnittenen Interferogramms zahlreiche Nebenmaxima und Nebenminima, die als Füße bezeichnet werden. Um die Amplitude dieser Füße zu verringern, faltet man das Interferogramm vor der Fourier-Transformation mit einer Gewichtungsfunktion. Diese Funktionen werden Apodisationsfunktionen genannt. Eine Standardapodisationsfunktion ist der Blackman-Harris-3-Term. Die Apodisation führt allerdings zu einer Verschlechterung der spektralen Auflösung.
- Theoretisch sollte ein Interferogramm vollständig symmetrisch sein. Aus verschiedenen Gründen ist dies in der Praxis allerdings nicht zutreffend. Um das Interferogramm symmetrisch zu machen, muss eine sogenannte Phasenkorrektur durchgeführt werden. Die Standardphasenkorrektur wird mit dem Mertz-Verfahren durchgeführt.
- Ebenfalls durch die diskrete Fourier-Transformation im Zusammenspiel mit der Digitalisierung des Interferogramms kann es zu einem sogenannten Picket-Fence-Effekt (Zaunlatteneffekt) kommen. Dabei werden einzelne Frequenzen abgeschnitten. Um dies zu verhindern, fügt man künstlich Nullen an den Rändern des Interferogramms an, was einer Interpolation der Messwerte entspricht. Dieses Zerofilling

¹ $\tilde{\nu}(\text{HeNe})=15803 \text{ cm}^{-1}$

genannte Verfahren verdoppelt bis verachtfacht (Zerofilling-Faktor, ZFF) die Größe des Interferogramms.

2.5.4 Abgeschwächte Totalreflexion

Als abgeschwächte Totalreflexion (*attenuated total reflection*, ATR) werden ein physikalischer Effekt sowie eine Spektroskopiemethode bezeichnet. Bei ATR-Messungen werden IR-Absorptionsspektren nicht in Transmission, sondern in Reflexion gemessen. Dies hat den Vorteil, dass auch sehr dicke oder stark absorbierende Proben ohne größere Probenvorbereitung mittels IR-Spektroskopie untersucht werden können. Dies gilt sowohl für Flüssigkeiten als auch für Feststoffe. Die Methode hat aufgrund dieser Vorteile inzwischen eine weite Verbreitung in Wissenschaft und Industrie. So wurde die herkömmliche Methode zur Untersuchung von Feststoffproben, bei der KBr-Presslinge hergestellt und in Transmission gemessen wurden, vielerorts von der ART-Technik verdrängt.^{150,151,153}

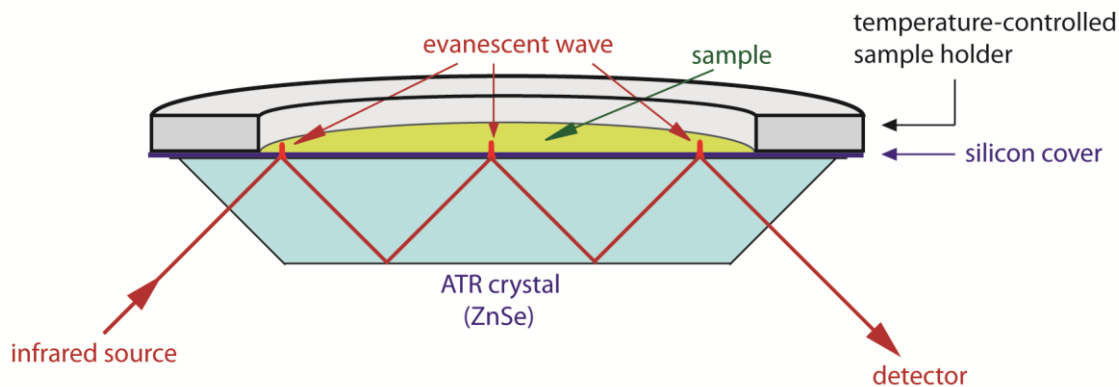


Abbildung 2.10. Schemazeichnung einer ATR-Zelle.

Bei der ATR-Spektroskopie wird die IR-Strahlung in einen Kristall mit hohem Brechungsindex (z.B. ZnSe, Ge oder Diamant) eingekoppelt, sodass es entlang des Kristalls zu mehrfacher Totalreflexion der Strahlung kommt (Abbildung 2.10). Die zu untersuchende Probe befindet sich dabei direkt auf dem Kristall und muss einen geringeren Brechungsindex als der Kristall aufweisen.

Ein Photon weist ein elektromagnetisches Feld (E) auf, welches sich im rechten Winkel zur Ausbreitungsrichtung des Photons befindet. An der Stelle der totalen Reflexion breitet sich dieses elektromagnetische Feld vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium aus. Das Feld wird evaneszente Welle genannt. Die Stärke der evaneszenten Welle, also des elektromagnetischen Feldes, nimmt exponentiell mit dem Abstand (z) von der Grenzfläche zwischen Kristall (n_1 , hoher Brechungsindex) und Probe (n_2 , niedriger Brechungsindex) ab.¹⁵³

$$E = E_0 e^{-yz} \quad \text{Formel 2.32}$$

Hierbei ist E_0 die Feldstärke an der Grenzfläche und y eine Konstante. Die evaneszente Welle kann mit der Probe in Wechselwirkung treten. Abhängig von der Absorption der Probe wird die Totalreflexion dadurch abgeschwächt. Die Absorption ist allerdings abhängig von der Eindringtiefe (typischerweise wenige μm) der evaneszenten Welle, wobei die effiziente Eindringtiefe (d_p) wiederum abhängig von der Wellenlänge (λ) sowie dem Einfallswinkel (θ) der Strahlung ist:¹⁵³

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2}} \quad \text{Formel 2.33}$$

Deshalb sind IR-Spektren, die in Transmission aufgenommen wurden, nicht identisch mit ATR-Spektren. Durch Multiplikation des ATR-Spektrums mit der Wellenzahl ist es allerdings in erster Näherung möglich, ein ATR-Spektrum in ein herkömmliches IR-Absorptionsspektrum umzurechnen. Diese ATR-Korrektur ist allerdings aufgrund von Effekten wie anormaler Dispersion im Bereich von stark absorbierenden IR-Banden nicht perfekt. Dies kann z.B. zu scheinbar sehr hohen oder unsymmetrischen isolierten Absorptionsbanden führen.¹⁵³

2.6 Grundlagen der zeitaufgelösten Spektroskopie

Für photophysikalische Studien oder die Aufklärung von Reaktionsmechanismen sind zeitaufgelöste spektroskopische Experimente sehr wichtig. Generell wird dabei versucht, die Zeitauflösung dieser Experimente weiter zu verbessern, um dadurch immer kürzere Prozesse untersuchen zu können. Entsprechend stellen die Entwicklung des Blitzlichtphotolyse-Experiments sowie die Entwicklung des Lasers und der Laserspektroskopie Meilensteine der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie dar. In den folgenden Unterkapiteln sollen kurz einige Grundlagen zur zeitaufgelösten optischen Spektroskopie im Allgemeinen und der Laserspektroskopie im Besonderen angesprochen werden. Das Material- und Methodenkapitel baut dann auf diesen Grundlagen und Konzepten auf.

2.6.1 Anregungs-Abtast-Experimente

Das Konzept des Anregungs-Abtast-Experiments (*pump-probe*) ist im Bereich der Laserspektroskopie weit verbreitet. Dabei wird die Probe mittels eines kurzen, intensiven Laserpulses zunächst angeregt. Die dadurch induzierten Änderungen werden durch einen zweiten Laserpuls (oder auch durch kontinuierliche Strahlung) abgefragt. Durch systematische zeitliche Verschiebung des Anregungs- und des Abtastereignisses relativ zueinander lassen sich sozusagen Momentaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Anregung der Probe aufzeichnen. So lassen sich letztlich Transienten aufzeichnen, die die durch Anregung induzierte Dynamik der Probe beschreiben.

Wie oben erwähnt, werden bei der Anregungs-Abtast-Spektroskopie üblicherweise Signaländerungen und keine Absolutwerte detektiert. Entsprechend unterscheidet man prinzipiell zwischen positiven, negativen oder nicht vorhandenen Signaländerungen. Im Fall von zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie wird eine negative Signaländerung durch Grundzustandsbleichen (*ground-state bleach*, GSB) oder durch stimulierte Emission (*stimulated emission*, SE) hervorgerufen. Positive Signaländerungen sind dagegen auf Absorption angeregter Zustände (*excited-state absorption*, ESA) oder die Absorption von Photoprodukten zurückzuführen.¹⁵⁷

Durch den Anregungspuls werden Moleküle vom Grundzustand in angeregte Zustände angehoben. Die angeregten Zustände weisen allerdings ein Absorptionsverhalten auf, welches sich spektral von dem des Grundzustandes unterscheidet. Dadurch nimmt die Absorptionsbande des Grundzustands ab, was wiederum in einem negativen Signal resultiert. Man spricht in diesem Zusammenhang vom Grundzustandsbleichen. Gleichzeitig absorbieren nun die angeregten Zustände das Licht des Abfragepulses, was eine positive Signaländerung verursacht (ESA). Alternativ kann durch Absorption eines Anregungsphotons auch eine photochemische Reaktion ausgelöst werden, die ein Photoprodukt mit einer charakteristischen Absorption entstehen lässt. Dies führt zu vergrößerter Absorption des Abfragelichts und entsprechend zu einer positiven Signaländerung. Trifft ein Photon des Abfragepulses auf ein angeregtes Molekül, kann dies aber auch die Emission eines anderen Photons induzieren, ohne dass das erstgenannte Photon dabei absorbiert wird. Dadurch trifft im Vergleich zur unangeregten Probe mehr Licht auf den Detektor. Dies resultiert in einer negativen Signaländerung. Der Prozess wird stimulierte Emission genannt und wird im Kapitel 2.6.3 näher beschrieben.¹⁵⁷

Die verschiedenen Signaltypen können sich allerdings über weite Strecken überlagern, wodurch es zu Kompensationen bis hin zur Auslöschung von Signaturen kommen kann.

2.6.2 Nichtlineare Optik

Strahlung entsteht durch die Oszillation eines elektrischen Dipols. Die Frequenz der Strahlung entspricht dabei der Oszillationsfrequenz des Dipols. Ein oszillierendes elektrisches Feld E kann dementsprechend auch einen elektrischen Dipol in einer Substanz erzeugen. Im Fall von geringen elektrischen Feldstärken E gibt es dabei einen linearen Zusammenhang zwischen diesen und dem Betrag des Dipols μ sowie der Polarisierbarkeit (elektrische Suszeptibilität) α des Materials.

$$\mu = \alpha E \quad \text{Formel 2.34}$$

Tatsächlich handelt es sich dabei allerdings um eine Vereinfachung, sodass bei höheren elektrischen Feldstärken diese Beschreibung durch folgende Reihe erweitert werden muss, wobei β für die erste und γ für die zweite Hyperpolarisation steht:

$$\mu = \mu^{(1)} + \mu^{(2)} + \mu^{(3)} + \dots \quad \text{Formel 2.35}$$

$$= \alpha E + \frac{1}{2}\beta E^2 + \frac{1}{6}\gamma E^3 + \dots \quad \text{Formel 2.36}$$

Ab dem zweiten Term besteht diese Reihe aus nichtlinearen Termen. Alle Effekte oder Prozesse, die auf diese Terme zurückzuführen sind, werden deshalb als nichtlinear bezeichnet. Im Fall von geringen elektrischen Feldstärken sind die Beiträge der nichtlinearen Terme sehr gering und es treten dementsprechend keine nichtlinearen Prozesse auf. Treten allerdings hohe Strahlungsintensitäten (hohe elektrische Feldstärken) auf, so ist der Beitrag der nichtlinearen Terme größer und es lassen sich nichtlineare Effekte beobachten. Hohe Spitzenintensitäten bei relativ niedrigen mittleren Intensitäten sind typisch für gepulste Laser, weswegen nichtlineare Effekte im Feld der Laserspektroskopie eine wichtige Rolle spielen. In der Folge werden deshalb weitere Voraussetzungen für nichtlineare Effekte angesprochen. Außerdem finden nichtlineare Effekte Erwähnung, die z.B. für die Funktion einiger im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Experimente bzw. Messaufbauten essenziell sind.

2.6.2.1 Phasenanpassung

Hohe Strahlungsintensitäten allein reichen nicht aus, um nichtlineare Prozesse in einem Medium zu erzeugen. Denn damit zwei Wellen miteinander wechselwirken können, müssen sie über eine möglichst lange Strecke im Medium miteinander konstruktiv interferieren. Dabei gilt Energie- und Impulserhaltung. Um die Impulserhaltung zu erfüllen, muss wiederum die Phasenanpassungsbedingung erfüllt werden. Diese ist abhängig von der Wellenlänge sowie von den Brechungsindices n des Mediums. Typischerweise wird dies für den Fall der 3-Wellenmischung mit $\vec{k}_1 \leq \vec{k}_2 \leq \vec{k}_3$ beschrieben. Im Fall der Phasenanpassung gilt für dieses Beispiel folgende Gleichung:

$$n_1 \vec{k}_1 + n_2 \vec{k}_2 = n_3 \vec{k}_3 \quad \text{Formel 2.37}$$

Dabei sind \vec{k}_1 und \vec{k}_2 die Wellenvektoren der einfallenden und \vec{k}_3 der Wellenvektor der resultierenden Welle. Entsprechend würde man eine Phasenfehlanpassung mit $\Delta \vec{k}$ beschreiben.

$$\Delta \vec{k} = n_1 \vec{k}_1 + n_2 \vec{k}_2 - n_3 \vec{k}_3 \quad \text{Formel 2.38}$$

Das heißt, nur wenn $\Delta \vec{k}$ sehr klein ist, kann man von einer guten Phasenanpassung sprechen, und nur in diesem Fall kann es zu effizienten Wechselwirkungen zwischen Wellen in einem Medium kommen.

Allerdings ist eine gute Phasenanpassung in der Praxis nicht in jedem Medium möglich. Grund dafür sind die Frequenzabhängigkeit des Brechungsindex $n(\omega)$, die sogenannte Dispersion, und die daraus resultierenden unterschiedlichen Phasengeschwindigkeiten v_{ph} .

$$v_{ph} = \frac{c_{vak}}{n(\omega)} \quad \text{Formel 2.39}$$

Die verschiedenen Wellen laufen also unterschiedlich schnell durch das Medium, weshalb es zu destruktiven Interferenzen kommt. Deshalb werden nichtlineare Prozesse vornehmlich in doppelbrechenden Medien vorgenommen. Der Brechungsindex dieser Medien ist abhängig von der Polarisationsrichtung der Strahlung, dementsprechend spricht man auch von anisotropen Medien. Durch entsprechende Positionierung des anisotropen Mediums zu der polarisierten Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge ist es nun möglich, sowohl die Wellenvektoren als auch die Brechungsindices aneinander anzugleichen, wodurch die Phasenanpassung erreicht werden kann.

2.6.2.2 Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Wie schon oben erwähnt, ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Strahlung in einem Medium und damit auch der Brechungsindex des Mediums frequenzabhängig. Dieser Zusammenhang wird als Dispersion bezeichnet. Im Fall eines kurzen Wellenpakets oder Pulses führt dies zur sogenannten Gruppengeschwindigkeitsdispersion (*group*

velocity dispersion, GVD). Der Grund für diese Effekte liegt in der frequenzabhängigen Phasenverschiebung, die quasi ein Zerlaufen des Wellenpakets mit der Zeit bewirkt. Dies lässt sich durch eine Taylorreihenentwicklung der Phase $\Phi(\omega)$ nach ω beschreiben:

$$\Phi(\omega) = \Phi(\omega_0) + \frac{d\Phi}{d\omega}(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \frac{d^2\Phi}{d\omega^2}(\omega - \omega_0)^2 + \dots \quad \text{Formel 2.40}$$

Der lineare Term beschreibt die lineare Dispersion, welche immer beim Durchtritt von Strahlung durch ein Medium auftritt. Der quadratische Term gewinnt erst bei Pulslängen unterhalb von 100 fs an Bedeutung und beschreibt die GVD. Die Terme höherer Ordnungen werden wiederum erst bei Pulslängen unterhalb von 10 fs relevant, weshalb sie hier nicht beschrieben werden.

Generell gibt es Medien mit normaler und anormaler Dispersion. Dispersion führt bei Laserpulsen zu einer zeitlichen Veränderung des Signals, die Chirp^j genannt wird. Durch normale Dispersion kommt es zu einem positiven Chirp. Die niederenergetischen roten Spektralanteile eilen in diesem Fall den höherenergetischen blauen Spektralanteilen voraus. Anormale Dispersion führt dementsprechend zu einem negativen Chirp, bei dem die blauen Spektralanteile den roten vorausziehen.

2.6.2.3 Frequenzmischung

Die verschiedenen Arten der Frequenzmischung lassen sich über den Einfluss nichtlinear optischer Effekte auf die Polarisation eines Mediums erklären. Die Polarisation P ist abhängig von der Dielektrizitätskonstante ϵ_0 , der Suszeptibilität χ sowie von der elektrischen Feldstärke E .

$$P = \epsilon_0 \chi E \quad \text{Formel 2.41}$$

Die elektrische Feldstärke kann mit einer komplex konjugierten (c.c.)-Gleichung beschrieben werden, wobei ω für die Kreisfrequenz und t für die Zeit steht:

$$E = E_0 e^{-i\omega t} + c. c. \quad \text{Formel 2.42}$$

Nun kann die Polarisation ebenfalls als Taylorreihenentwicklung geschrieben werden, wodurch nichtlineare Terme entstehen. Wie schon im Fall des elektrischen Dipols erklärt, fallen diese nichtlinearen Terme allerdings erst bei hohen elektrischen Feldstärken ins Gewicht.

$$P = P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots \quad \text{Formel 2.43}$$

$$= \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots) \quad \text{Formel 2.44}$$

Wenn nun zwei Strahlungen ω_1 und ω_2 , mit hohen Feldstärken in einem nichtlinearen Medium aufeinandertreffen, tritt genau dieser Fall ein und es kommt zur Frequenzmischung. Der erste nichtlineare Term der Formel 2.44 entspricht dann folgendem Ausdruck:

$$P^{(2)} = 2\epsilon_0 \chi^{(2)} (E_1 + E_2)^2 \quad \text{Formel 2.45}$$

$$= 2\epsilon_0 \chi^{(2)} (2(E_1^2 + E_2^2) + E_1^2 e^{i(2\omega_1 t)} + E_2^2 e^{i(2\omega_2 t)} + E_1 E_2 e^{i((\omega_1 + \omega_2)t)} + E_1 E_2 e^{i((\omega_1 - \omega_2)t)} + c. c.) \quad \text{Formel 2.46}$$

In Formel 2.46 sind die Ausdrücke für die jeweilige Frequenzverdopplung, die Summenfrequenz ($\omega_1 + \omega_2$) sowie die Differenzfrequenz ($\omega_1 - \omega_2$) und die optische Gleichrichtung zu finden. Das heißt, im Prinzip können fünf Mischprozesse stattfinden. Allerdings hängt die Effizienz der Prozesse stark davon ab, ob die jeweilige Phasenanpassungsbedingung erfüllt wird.

^j von englisch *chirp* = Zwitschern. Dies ist das akustische Äquivalent dieser Signaländerung.

Die Frequenzmischung allgemein ist also ein nichtlinear optischer Effekt zweiter Ordnung. Frequenzmischung ist allerdings nur in Kristallen ohne Inversionssymmetrie möglich, da es aus Symmetriegründen im Fall eines zentrosymmetrischen Kristalls zur gegenseitigen Auslöschung der Schwingungen kommt.

Die Frequenzverdopplung, also die Halbierung der Wellenlänge, wird auch Second Harmonic Generation (SHG) genannt. Bei der SHG handelt es sich sozusagen um einen Spezialfall der Frequenzmischung, da hier zwei identische Frequenzen gemischt werden.

2.6.2.4 Kerr-Effekt

Der optische Kerr-Effekt bewirkt, dass bei hohen Strahlungsintensitäten (hohen elektrischen Feldstärken) der Brechungsindex n abhängig von der Intensität ist.

$$n = n_0 + 2n_2|E(\omega)|^2 \quad \text{Formel 2.47}$$

Hierbei stehen n_0 und n_2 für Brechungsindices, wobei n_2 erst bei hohen elektrischen Feldstärken E an Bedeutung gewinnt.

Auf dem Kerr-Effekt beruhen einige weitere nichtlineare optische Effekte, wie z.B. die Selbstfokussierung. Das Auftreffen eines intensiven Laserstrahls auf ein Medium sorgt durch den Kerr-Effekt für eine unterschiedlich starke Änderung des Brechungsindex. Bei einem positiven n_2 wäre der Brechungsindex im Zentrum des Strahls besonders groß und würde zu den Rändern hin abnehmen. Diese Verteilung der Brechungsindices bildet quasi eine Sammellinse innerhalb des Mediums und sorgt dafür, dass sich der Laserstrahl selbstfokussiert.

Ein weiterer Effekt ist die Selbstphasenmodulation. Diese beruht darauf, dass sich die Intensität eines Laserpulses über die Zeit ändert. Die Strahlungsintensität an einer Stelle steigt von null bis zum Intensitätsmaximum an und fällt dann wieder auf null zurück. Entsprechend ändern sich auch der Brechungsindex und damit auch die Phase des Pulses. Da wiederum die Frequenz die zeitliche Änderung der Phase ist, ändert sich auch die Frequenz über die Zeit. Die ansteigende Flanke des Pulses wird dementsprechend zu niedrigeren Frequenzen verschoben, während die abfallende Flanke zu höheren Frequenzen verschoben wird. Dies führt dazu, dass das Frequenzspektrum eines Pulses im Fall eines positiven n_2 insgesamt verbreitert wird. Beeinflusst die zeitliche Änderung eines Pulses die Phase bzw. Frequenz eines weiteren Pulses, spricht man von Kreuzphasenmodulation (*cross-phase modulation*, XPM).¹⁵⁸

2.6.3 Laser

Bei dem Begriff Laser handelt es sich um ein Akronym für *light amplification by stimulated emission of radiation*. Dementsprechend ist ein Laser ein Gerät zur Licht-Verstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung. Seit dem Bau des ersten Lasers im Jahr 1960 sind diese inzwischen in unserem Alltag so weit verbreitet, dass man sich nie besonders weit von einem dieser Geräte entfernt aufhält. Dieses Phänomen ähnelt stark der Entwicklung des Automobils oder des Telefons. So hat auch der rasante Fortschritt der Lasertechnologie unseren Alltag maßgeblich und nachhaltig verändert. Besonders seien hier die Bereiche Telekommunikation, Materialbearbeitung, Medizin, Datenspeicherung, Vermessung und natürlich Wissenschaft und Forschung zu nennen.

Prinzipiell besteht ein Laser lediglich aus einem Resonator, einem Lasermedium und einer Energiequelle, der sogenannten Pumpquelle. Der Resonator wiederum besteht im einfachsten Fall aus zwei, einander zugewandten Spiegeln. Wobei allerdings einer der beiden Spiegel teildurchlässig ist. Dies ermöglicht es einem Teil der Strahlung, den Resonator zu verlassen. Im Resonator, also zwischen den beiden Spiegeln, befindet sich das Lasermedium. Dabei kann es sich um ein Gas, einen Feststoff oder eine Lösung handeln. Die Pumpquelle versorgt das Lasermedium mit Energie. Findet diese Energieübertragung mittels Lichteinstrahlung statt, spricht man von optischem Pumpen des Lasermediums.

Neben der spontanen Emission (vgl. Fluoreszenz) gibt es auch den photophysikalischen Prozess der induzierten oder stimulierten Emission (SE). Dieser Prozess findet im Lasermedium statt und sorgt für eine Verstärkung der Strahlung. Wie bei der spontanen Emission kommt es hier zu einem elektronischen Übergang von einem angeregten Zustand in einen niedrigeren Zustand. Hierbei wird ein Photon freigesetzt, dessen Energiedifferenz der Differenz der beiden Zustände entspricht. Im Unterschied zur spontanen Emission erfolgt dieser Übergang allerdings nicht freiwillig, sondern wird durch die Einstrahlung eines Photons ausgelöst. Die Energie dieses

induzierenden Photons muss wiederum der Energiedifferenz zwischen den beiden beschriebenen Zuständen entsprechen. Durch stimulierte Emission entsteht also quasi eine Kopie des eingestrahlt Photons. Das heißt, die emittierte Strahlung hat die gleiche Phase, Richtung und Energie wie das induzierende Photon. Dementsprechend kann SE zur Verstärkung von Strahlung verwendet werden. Allerdings kann das initiale Photon auch einfach vom Lasermedium absorbiert werden. Um also eine tatsächliche Strahlungsverstärkung erreichen zu können, müssen im Mittel mehr Photonen über SE erzeugt werden als Photonen absorbiert werden, was nur möglich ist, wenn sich die Mehrzahl der Moleküle in einem angeregten Zustand befindet. Eine solche sogenannte Besetzungsinversion ist allerdings in einem Zweiniveausystem nicht möglich. Deshalb wird für einen funktionierenden Laser mindestens ein Dreiniveausystem benötigt.

Durch (optisches) Pumpen werden bei einem Dreiniveaulaser die Moleküle des Lasermediums also zunächst in einen angeregten Zustand gebracht. Nach der Anregung relaxiert das System zunächst strahlungslos in einen metastabilen angeregten Zustand. Mit diesem sog. oberen Laserzustand lässt sich Besetzungsinversion verwirklichen. Als Laserübergang wird dann der strahlende Übergang, also die SE, vom oberen Laserzustand in den Grundzustand bezeichnet.

Allerdings ist Besetzungsinversion in dem oben beschriebenen Dreiniveausystem (Dreiniveaulaser) nur schwer zu realisieren, da hier viele Teilchen aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand gepumpt werden müssen. Einfacher ist eine Besetzungsinversion im Fall eines Vierniveausystems (Vierniveaulaser) zu erreichen. Hier findet der Laserübergang zwischen dem oberen Laserzustand und einem vierten, zusätzlichen Zustand statt, der unterer Laserzustand genannt wird. Dieser Zustand liegt energetisch oberhalb des Grundzustandes, aber unterhalb des oberen Laserzustands und ist zum Zeitpunkt der ersten Anregung nicht besetzt. Sobald nun nach der ersten Anregung ein Teilchen in den oberen Laserzustand relaxiert, herrscht zwischen diesem und dem unteren Laserzustand Besetzungsinversion.

Da sich das Lasermedium im Resonator befindet, durchlaufen die durch stimulierte Emission erzeugten Photonen mehrmals das Lasermedium. Dadurch werden lawinenartig immer mehr Photonen und somit eine hohe Strahlungsdichte erzeugt. Durch den nur teilreflektierenden Spiegel verlässt allerdings ein Teil der Laserstrahlung den Resonator und kann z.B. für spektroskopische Zwecke eingesetzt werden.

Durch die zugrunde liegende SE weist die Laserstrahlung charakteristische Eigenschaften wie hohe Energiedichte, Monochromatizität, starke Bündelung und Kohärenz, auf. Der oben beschriebene Prozess erzeugt kontinuierliche (*continuous wave*, CW) Strahlung. Gleichzeitig gibt es aber auch mehrere Verfahren und Methoden, um gepulste Laserstrahlung zu verwirklichen, wobei zum Teil sehr kurze Pulszeiten erreicht werden.

2.6.3.1 Ultrakurze Laserpulse

Eine Methode zur Erzeugung von Laserpulsen ist die Gütemodulation (*Q-switch*). Diese Methode basiert auf der gezielten Veränderung der Resonanzeigenschaften des Resonators. Durch schnelle Variation der Resonanzgüte werden die Resonanzeigenschaften zyklisch ein- und ausgeschaltet und somit kurze Laserpulse ausgekoppelt. Technisch kann dies z.B. mittels einer Pockels-Zelle realisiert werden. Dieses elektro-optische Bauteil kann spannungsinduziert die Polarisationssebene der Strahlung im Resonator um 90° drehen. Da die Erfüllung der Resonanzbedingung im Resonator abhängig von der Polarisation ist, können so Pulse von minimal 5 ns erzeugt werden.

Diese Pulslänge ist allerdings noch wesentlich zu lang, um mittels Laserspektroskopie Prozesse beobachten zu können, die in Zeitbereichen unterhalb von Nanosekunden ablaufen. Um also die Dynamik von Prozessen im ps-Zeitbereich untersuchen zu können, ist es nötig, Pulse im fs-Bereich zu erzeugen. Diese sogenannten ultrakurzen Pulse lassen sich durch Modenkopplung (auch Phasenkopplung genannt) erzeugen. Dabei wird ausgenutzt, dass sich im Resonator mehrere stehende Wellen unterschiedlicher Frequenz befinden. Diese werden resonante Moden genannt. Durch kohärente Überlagerung werden diese Wellen in eine feste Phasenbeziehung gebracht. Dadurch entsteht aus den einzelnen Moden ein Wellenpaket, das als ultrakurzer Puls ausgekoppelt werden kann. Die Pulsbreite sinkt dabei mit der steigenden Anzahl an gekoppelten Moden. Technisch gibt es verschiedene Verfahren zur Modenkopplung, allerdings kann generell zwischen aktiver und passiver Modenkopplung unterschieden werden.

2.6.3.1.1 Aktive Modenkopplung

Bei der aktiven Modenkopplung werden die oszillierenden Lasermoden im Resonator mittels einer akustischen oder elektrischen Frequenz f moduliert. Es handelt sich dabei im Prinzip um eine Frequenzmodulation einer Trägerfrequenz ν_0 , wie sie auch bei der analogen Funktechnik eingesetzt wird. Durch die Frequenzmodulation entstehen zusätzlich zur Trägerfrequenz sogenannte Seitenbänder $\nu_0 \pm f$. Dies führt zu Summen- und Differenzfrequenzen zwischen der Modulationsfrequenz und den Resonatormoden. Wenn nun die Modulationsfrequenz f gleich dem Modenabstand ist, nehmen die Seitenbänder an der Laseroszillation teil. Gleichzeitig können durch Modulation der Seitenbänder wiederum weitere höhere Bänder entstehen, wodurch letztlich alle Moden im Resonator über die Modulationsfrequenz gekoppelt sind. Die Modulationsfrequenz ist technisch auf einen Bereich von wenigen Gigahertz begrenzt. Dementsprechend sind über diese Methode Laserpulse im Bereich von Nanosekunden bis hin zu 100 ps möglich.

2.6.3.1.2 Passive Modenkopplung

Um passive Modenkopplung zu erreichen, gibt es verschiedene Methoden. So kann z.B. ein sättigbarer Absorber verwendet werden. Dabei handelt es sich um ein Material (Farbstoff, Halbleiter usw.) mit nichtlinearem Sättigungsverhalten und kurzer Relaxationszeit. Die Transparenz eines sättigbaren Absorbers nimmt mit zunehmender Pulsintensität zu. Dementsprechend werden schwache Pulse absorbiert, während starke Pulse passieren und im Resonator weiter verstärkt werden können. Nach einer kurzen Einschwingphase kann so eine regelmäßige Folge intensiver Pulse von wenigen Pikosekunden Länge erzeugt werden.

Mittels nichtlinearer Polarisationsdrehung können noch kürzere Pulse erzeugt werden. Dazu werden Laserpulse innerhalb des Resonators in eine optische Faser eingekoppelt. Durch den Kerr-Effekt kommt es dabei zu einer intensitätsabhängigen Änderung der Polarisation. Dementsprechend ist es möglich, mittels eines Polarisators nur die intensiveren Pulse passieren zu lassen und diese weiter im Resonator zu verstärken.

Eine dritte Möglichkeit ist die Modenkopplung durch Kerr-Linsen. Durch den Kerr-Effekt bzw. die Selbstfokussierung werden die intensiveren Bereiche eines Pulses stärker fokussiert als die schwächeren. Durch z.B. eine kreisförmige Blende in der Fokalebene können dadurch die intensiven Pulsbereiche, bzw. die intensiven Pulse, selektiert und weiter verstärkt oder ausgekoppelt werden. Durch diese Methode sind Pulse in der Größenordnung von 10 fs bis 100 fs möglich.

2.6.3.2 Chirped Pulse Amplification

Zur Verstärkung von ultrakurzen Laserpulsen kann Chirped Pulse Amplification (CPA; Nobelpreis 2018, Strickland, Mourou) eingesetzt werden (Abbildung 2.11).^{159,160} Die Verstärkung von Laserpulsen findet in einem optisch gepumpten Verstärkermedium (*amplifier*) statt. Allerdings kann das Verstärkermedium durch hohe Spitzenintensitäten zerstört werden und muss dementsprechend vor diesen geschützt werden. Deshalb durchlaufen die zu verstärkenden Pulse zunächst einen Strecker (*stretcher*), wodurch diese positiv gechirpet werden. Das heißt, die Intensitäten der Pulse werden reduziert und die Pulsbreiten werden vergrößert. Die breiten Pulse werden anschließend in den Verstärker eingekoppelt und dort verstärkt. Die breiten verstärkten Pulse werden im Anschluss in einen Kompressor (*compressor*) eingekoppelt. Dort werden sie negativ gechirpt und so wieder verkürzt.

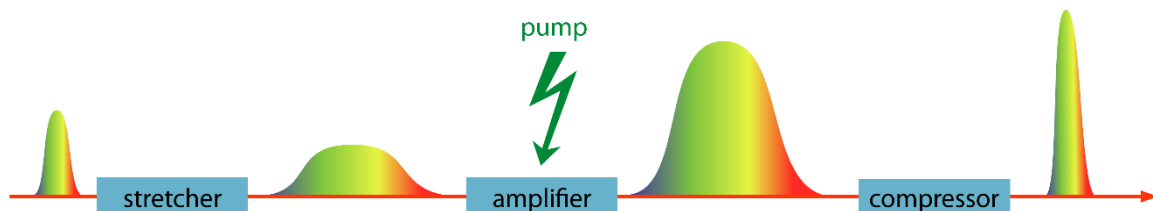


Abbildung 2.11. Schema einer Chirped Pulse Amplification.

Strecker und Kompressor sind jeweils aus zwei dispersierenden Elementen (Prismen oder Beugungsgitter) sowie mindestens einem Spiegel aufgebaut. Die Anordnung der Bauteile entscheidet über deren Funktion als Strecker oder Kompressor bzw. darüber, ob sie die Pulse negativ oder positiv chirpen.

2.6.3.3 Akustooptische-Modulation

Wenn sich Ultraschallwellen in einem Medium ausbreiten, können sie als periodische Dichteschwankungen interpretiert werden. Mit den Dichteschwankungen ist auch eine entsprechende Änderung des Brechungsindex verbunden. Durch die periodischen Schwankungen entsteht so quasi ein Beugungsgitter im Medium (Debye-Sears-Effekt). Dieser Effekt wird in der Lasertechnik ausgenutzt, um sogenannte akustooptische Modulatoren (*acousto-optic modulator*, AOM) zu realisieren. Bei diesen optischen Bauteilen werden stehende oder laufende Ultraschallwellen in akustooptischen Materialien wie z.B. Quarzglas oder TeO_2 erzeugt. AOMs können als steuerbare Modulatoren oder Strahlableiter eingesetzt werden. So finden sie Anwendung bei der Modenkopplung oder werden bei der sogenannten Pulsauswahl (*pulse picking*) eingesetzt.¹⁶¹

2.7 Reaktionskinetiken

Wie schon in der Einleitung beschrieben wurde, beschäftigt sich diese Arbeit mit den Bindungsmechanismen von Aptameren. Im Besonderen wurde hierbei die Bindungskinetik des neomycinbindenden Aptamers untersucht, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Reaktionsordnung entscheidende Rollen spielen. Dementsprechend werden in den folgenden Absätzen, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, einige Kinetikgrundlagen besprochen. Für entsprechende Details sei allerdings auf die einschlägigen Lehrbücher verwiesen.^{132,135,162,163} Aus diesen Büchern wurden auch die Informationen für die folgenden Unterkapitel entnommen.

2.7.1 Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion hängt ganz allgemein von der chemischen Zusammensetzung und der Temperatur des Reaktionsgemisches ab. So nimmt die Geschwindigkeit der meisten chemischen Reaktionen mit steigender Temperatur zu. Als Faustregel wird in diesem Zusammenhang häufig die van't-Hoff'sche Regel genannt. Diese wird häufig auch Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel, kurz RGT-Regel, genannt und besagt, dass eine Temperaturerhöhung um 10 K eine Verdopplung bis Verdreifachung der Reaktionsgeschwindigkeit verursacht. Besser wird der Zusammenhang von Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben.¹³⁵

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT} \quad \text{Formel 2.48}$$

Hier ist k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante^k, A der präexponentielle Faktor, E_A die Aktivierungsenergie, R die ideale Gaskonstante und T die Temperatur in Kelvin.

2.7.2 Reaktionsordnungen

Bei konstanter Temperatur, wie es bei den meisten der hier gezeigten Experimente der Fall ist, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit allerdings von der Konzentration der Reaktionspartner ab. Allgemein kann deshalb die Reaktionsgeschwindigkeit v mit dem folgenden Geschwindigkeitsgesetz beschrieben werden:¹³⁵

$$v = k[A]^a[B]^b \dots \quad \text{Formel 2.49}$$

In den eckigen Klammern stehen die Konzentrationen der Reaktanten. Die Potenzen beschreiben die Ordnung der Reaktion in Bezug auf den entsprechenden Reaktionspartner. Die Summe all dieser Ordnungen ($a+b+\dots$) wird Gesamtordnung der Reaktion genannt. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Reaktionsordnung nicht ganzzahlig sein muss und auch den Wert null annehmen kann. In diesem Spezialfall spricht man von einer Reaktion nullter Ordnung und das Geschwindigkeitsgesetz vereinfacht sich wie folgt:¹³⁵

$$v = k \quad \text{Formel 2.50}$$

Viele katalytische, enzymatische oder photochemische Reaktionen weisen diese Reaktionsordnung auf. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist konzentrationsunabhängig und ändert sich dementsprechend auch nicht über die Zeit.¹³⁵ Einige simple Reaktionsschemata mit zugehörigen Reaktionsordnungen sind beispielhaft in Tabelle 2.2 zusammengestellt.

Tabelle 2.2. Schematische Reaktionsgleichungen für Reaktionen nullter, erster und zweiter Ordnung.

Ordnung	Reaktionsgleichung	Kommentar
0.	$A \rightarrow B$	z.B. katalytische oder photochemische Reaktionen
1.	$A \rightarrow B + C$	z.B. (radioaktive) Zerfallsreaktionen
2.	$A + A \rightarrow B$	bimolekulare Reaktion, zwei gleiche Reaktionspartner
2.	$A + B \rightarrow C$	bimolekulare Reaktion, zwei unterschiedliche Reaktionspartner

^k Die Einheit von k hängt von der Ordnung der Reaktion ab.

2.7.2.1 Reaktionen erster Ordnung

Allgemein handelt es sich aber bei den Geschwindigkeitsgesetzen für die verschiedenen Ordnungen um Differenzialgleichungen. Durch Integration ist es dementsprechend möglich, die Konzentrationen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zu beschreiben. Folgende Differenzialgleichung beschreibt eine Reaktion erster Ordnung:^{135,164}

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k[A] \quad \text{Formel 2.51}$$

Diese Gleichung kann wiederum folgendermaßen gelöst werden:¹³⁵

$$\ln \left(\frac{[A]}{[A]_0} \right) = -kt \quad \text{bzw.} \quad \text{Formel 2.52}$$

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \quad \text{Formel 2.53}$$

Hierbei ist $[A]$ die Konzentration des Stoffs A zu einem beliebigen Zeitpunkt t und $[A]_0$ die entsprechende Konzentration zum Zeitpunkt $t=0$. Die Halbwertszeit hängt hier nicht von der Konzentration des Reaktanten ab.¹³⁵ Dementsprechend sind typische Beispiele für Reaktionen erster Ordnung der radioaktive Zerfall oder auch der thermische Zerfall chemischer Verbindungen.¹⁶³

Von einer Reaktion pseudo-erster Ordnung spricht man, wenn eine Reaktion eigentlich von der Konzentration mehrerer Substanzen abhängig ist, aber alle bis auf einen Reaktanten in großem Überschuss vorliegen. Allgemein kann, wenn Reaktanten in großem Überschuss vorliegen, deren Konzentration als konstant genähert werden. Dementsprechend hängt die Reaktionsgeschwindigkeit hier nur noch von der Konzentration des nicht im Überschuss vorliegenden Reaktionspartners ab. Diese sogenannte Isoliermethode kann zur Bestimmung des Geschwindigkeitsgesetzes von Reaktionen verwendet werden.¹³⁵

2.7.2.2 Reaktionen zweiter Ordnung

Für eine Reaktion zweiter Ordnung gelten im simpelsten Fall, also bei zwei identischen Reaktionspartnern, folgende Gleichungen:^{135,163,164}

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k[A]^2 \quad \text{Formel 2.54}$$

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt \quad \text{bzw.} \quad \text{Formel 2.55}$$

$$[A] = \left(kt + \frac{1}{[A]_0} \right)^{-1} \quad \text{Formel 2.56}$$

Bei unterschiedlichen Reaktionspartnern wird die Reaktionsgeschwindigkeit dagegen folgendermaßen beschrieben:^{162,164}

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k[A][B] \quad \text{Formel 2.57}$$

Im Unterschied zu Reaktionen erster Ordnung hängt hier die Halbwertszeit von der Konzentration der Reaktanten ab. Ein Beispiel einer Reaktion zweiter Ordnung ist z.B. die Reassoziaton komplementärer Nukleinsäureeinzelstränge.¹⁶³

2.7.3 Reaktionsmechanismen

Viele chemische Reaktionen laufen nicht in einem einzelnen Schritt ab, sondern weisen einen Mechanismus bestehend aus mehreren Schritten auf, die auch Elementarreaktionen genannt werden.

Ein wichtiges Stichwort in diesem Zusammenhang ist die Molekularität der Elementarreaktionen. Diese bezeichnet die Anzahl der Teilchen, die gleichzeitig miteinander zusammenstoßen müssen damit eine Elementarreaktion abläuft. Dementsprechend wird bei einer unimolekularen Reaktion kein Reaktionspartner benötigt. Die Reaktion ist erster Ordnung. Bei einer bimolekularen Reaktion dagegen sind zwei Reaktionspartner nötig. Deshalb ist diese Elementarreaktion zweiter Ordnung.¹³⁵

Unabhängig von Molekularität und Ordnung der Elementarreaktionen muss außerdem bei vielen Reaktionsmechanismen berücksichtigt werden, dass es nicht nur Hin- sondern auch Rückreaktionen gibt. Es müssen also Gleichgewichtsreaktionen mit zwei Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} betrachtet werden. Dementsprechend kann für die Reaktionen das Massenwirkungsgesetz aufgestellt und eine Gleichgewichtskonstante K berechnet werden, womit eine Verbindung zur Thermodynamik hergestellt wäre.¹⁶³ Allgemein also auch für mehrstufige Reaktionen gilt, dass sich die Gleichgewichtskonstante einer chemischen Reaktion durch die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte ausdrücken lässt.^{135,163}

Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf Ligandenbindungsreaktionen. Bei diesen Reaktionen bindet ein biologisches Makromolekül A , wie z.B. ein Aptamer, einen Liganden L an sich, weshalb in der Folge einige bimolekulare Reaktionen näher betrachtet werden sollen. Die Hinreaktion wird in diesem Zusammenhang Assoziation und die Rückreaktion Dissoziation genannt. Prinzipiell unterscheidet man bei solchen Bindungsreaktionen zwischen zwei Modellen (Abbildung 2.12): So kann der Ligand durch Konformationsauswahl (*conformational selection*) oder durch einen induzierten Anpassungsmechanismus (*induced fit*) an das Makromolekül binden. Tatsächlich ist allerdings eine klare Unterscheidung zwischen beiden Modellen nicht immer möglich.^{87,135,165}

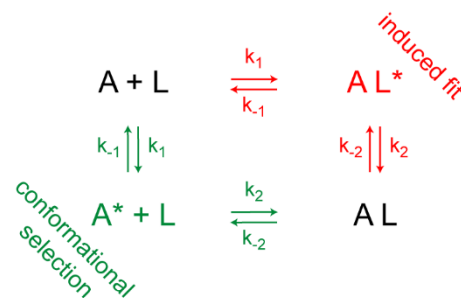


Abbildung 2.12. Vergleich der Bindungsmechanismen der Konformationsauswahl (*conformational selection*) und der induzierten Anpassung (*induced fit*). A = Aptamer, L = Ligand, A^* = Aptamer in bindungsbereiter Konformation, AL^* = Zwischenzustand, AL = Aptamer mit gebundenem Liganden.¹⁶⁵

Bei der Konformationsauswahl geht man davon aus, dass die Strukturen von Ligand und Makromolekül perfekt zusammenpassen. Dementsprechend sind zur festen spezifischen Bindung des Liganden keine größeren strukturellen Umlagerungen nötig. Allerdings kann sich der Ligand dadurch natürlich auch, ohne strukturelle Änderungen zu provozieren, wieder vom Makromolekül lösen. Deshalb kann dieser Bindungsmechanismus als einstufige reversible Bindungsreaktion beschrieben werden.¹ Im entsprechenden Reaktionsschema wird das Makromolekül mit gebundenem Liganden dabei mit AL abgekürzt:^{87,135}



Die entsprechende Differenzialgleichung lautet:

$$\frac{d[AL]}{dt} = -k_1[A][L] + k_{-1}[AL] \quad \text{Formel 2.59}$$

¹ Das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen des Makromoleküls wird in diesem Fall nicht berücksichtigt.

Beim induzierten Anpassungsmechanismus (*induced fit*) dagegen passen die Bindestelle im Makromolekül und der Ligand zunächst nicht perfekt strukturell zusammen. Allerdings löst eine mehr oder weniger unspezifische Bindung des Liganden eine konformationelle Änderung des Makromoleküls hervor. Erst dadurch wird der Ligand fest gebunden. Dementsprechend verläuft der Reaktionsmechanismus hier zweistufig über einen Zwischenzustand AL^* unter folgendem Reaktionsschema: ^{87,135,162}



Zur Beschreibung von Enzymkinetiken wird diese Gleichung häufig zum sogenannten Michaelis-Menten-Mechanismus vereinfacht: ^{87,135,162}



Hier wird die Rückreaktion des zweiten Reaktionsschrittes vernachlässigt. Dies ist bei Enzymreaktionen möglich, da hier der erste Schritt die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes AL^* darstellt, während der zweite Schritt eine irreversible Umsetzung des Substrats beschreibt.

Allerdings ist dieses klassische Bindungsmodell nicht ohne Weiteres für die Beschreibung von Aptamerbindungsprozessen geeignet, da es in diesem Fall nicht zu einer Produktbildung kommt. Andererseits könnte der irreversible zweite Schritt im Fall von Aptameren größere strukturelle Änderungen im Aptamer beschreiben.

Allgemein wird die Geschwindigkeit der Bildung des Endprodukts AL für den Michaelis-Menten-Mechanismus mit der gleichnamigen Gleichung beschrieben: ¹⁶²

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_2[AL^*] = k_2 \frac{[A]_0 \cdot [L]}{K_M + [L]} \quad \text{Formel 2.62}$$

Wobei $[A]_0$ die Anfangskonzentration des Makromoleküls und K_M die Michaelis-Konstante ist. ¹⁶²

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Formel 2.63}$$

Neben einstufigen und zweistufigen Bindungsmechanismen sind natürlich viele weiterer Mechanismen denkbar. Diese lassen sich allerdings prinzipiell auf die beschriebenen Modelle herunterbrechen oder an diese annähern, weshalb auf deren Beschreibung an dieser Stelle verzichtet wird.

3 Material und Methoden

In diesem Unterkapitel sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden kurz erklärt bzw. genannt werden. Insbesondere soll hier auf die entsprechenden Anlagen und Messbedingungen, sowie auf Auswerte- und Korrekturmethode eingegangen werden. Auch die jeweiligen Probenpräparationen werden in diesem Kapitel beschrieben.

3.1 Statische Infrarot-Spektroskopie

Zur Aufzeichnung von statischen Infrarotspektren wurde ein Bruker Vertex 80 FTIR-Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) verwendet. Da das Spektrometer im Rahmen dieser Arbeit ausgiebig getestet und die Methode in der Arbeitsgruppe etabliert wurde, sollen das Gerät und das entsprechende Zubehör in der Folge etwas näher beschrieben werden.

3.1.1 Labor-Infrastruktur

Das FTIR-Spektrometer befindet sich in einem klimatisierten Raum (20 °C) auf einem schwingungsgedämpften, optischen Tisch (OPTA GmbH, Bensheim). Der Innenraum des Spektrometers wird durchgehend mit trockener Luft gespült (Abbildung 3.1). Zur Trockenluftzeugung wird Druckluft aus der Hausleitung entnommen und mittels eines Kältemittelrockners (FX1, Atlas Copco, Stockholm, Schweden) vorgetrocknet. Neben Wasser wird hierbei auch Öl abgeschieden. Ein Teil der so vorgetrockneten Luft wird zum Betrieb der schwingungsgedämpften optischen Tische verwendet. Der Rest der Luft wird nach dem Durchlaufen von zwei weiteren Filterstufen (DX Grobfilterelement und BX Feinfilterelement, Parker Balston, Cleveland, USA) in einen Spülgasgenerator (FT-IR Purge Gas Generator 75-45, Parker Balston) eingeleitet. Hier wird sowohl die verbliebene Luftfeuchtigkeit als auch Kohlenstoffdioxid (<1,0 ppm) mittels Adsorptionssäulen abgetrennt. Die getrocknete Luft wird dann über einen Durchflussregler (200 l/h) in den Proben- und den Spektrometerraum des Vertex 80 eingeleitet. Außerdem versorgt die Trockenluftanlage das Luftlager des beweglichen Interferometerspiegels.

Alternativ zur Trockenluft können der Proben- und der Spektrometerraum mittels Stickstoff gespült werden (Abbildung 3.1). Der gasförmige Stickstoff wird durch kontrolliertes Verdampfen von flüssigem Stickstoff mittels eines 100-Liter-Kryogefäßes (Apollo 100, Cryotherm, Kirchen) erzeugt. Das Kryogefäß ist dazu mit einem Druckaufbau- und einem Druckabbauregler ausgestattet. Aus Sicherheits- und Platzgründen befindet es sich in einem anderen Raum, sodass der gasförmige Stickstoff über Kupferleitungen, die über die abgehängte Decke verlaufen, in mehrere Labore verteilt werden kann. Des Weiteren kann das Kryogefäß als lokale Lager- und Entnahmestelle für flüssigen Stickstoff verwendet werden. Da es durch Undichtigkeiten oder bei Umfüllarbeiten von flüssigem Stickstoff zu gefährlich hohen N₂-Konzentrationen bzw. dadurch zu niedrigen O₂-Konzentrationen kommen kann, wurde das Kryogefäß mit einem O₂-Warner (BW Clip O₂, BW Technologies by Honeywell, Calgary, Kanada) ausgestattet.

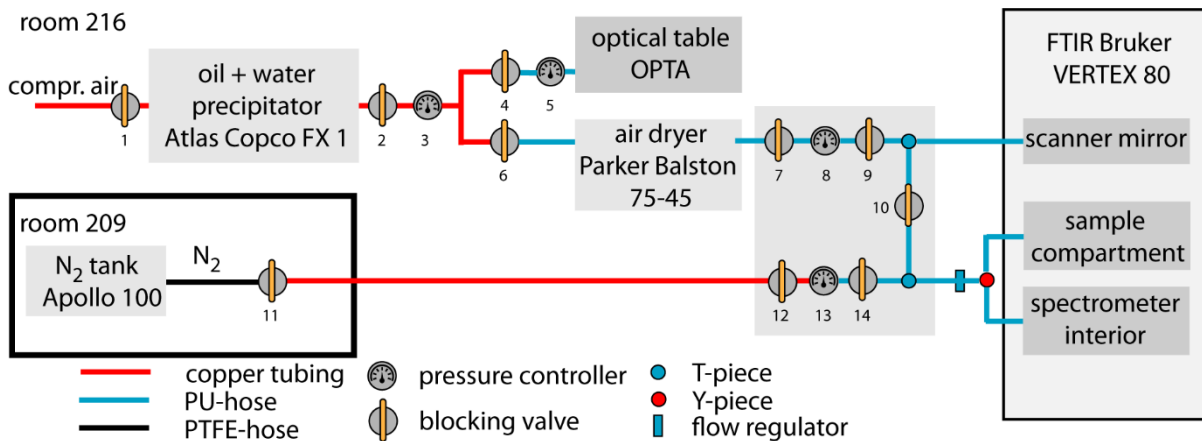


Abbildung 3.1. Plan der Stickstoff- und Trockenluftversorgung des FTIR-Spektrometers.

3.1.2 FTIR-Spektrometer

Das Vertex 80 FTIR-Spektrometer ist prinzipiell in zwei Bereiche gegliedert (Abbildung 3.2). Hierbei handelt es sich um den Spektrometerraum und den Probenraum. Der Spektrometerraum beherbergt die IR-Quelle, das Interferometer, die Detektoren sowie die gesamte Steuer- und Messelektronik. Der Probenraum ist über zwei optische Zugänge mit dem Spektrometerraum verbunden, die allerdings jederzeit durch motorisierte Klappen (*flaps*) gasdicht verschlossen werden können. Der Probenraum kann verschiedene Arten von Probenhaltern oder Zusatzequipment aufnehmen.¹⁶⁶

Der Spektrometerraum ist mit einem U-förmigen Siliziumkarbid-Globar als IR-Quelle ausgestattet, welcher durch elektrische Erwärmung breitbandig MIR-Strahlung emittiert. Die Strahlung wird über Goldoptiken gesammelt und zu einem Interferometer weitergeleitet. Dabei ist es möglich, die Strahlung über ein Apertur- sowie über ein Filterrad abzuschwächen.¹⁶⁶

Als michelsonartiges Interferometer ist im Vertex 80 ein sogenanntes UltraScan-Interferometer mit einem Kaliumbromid-(KBr)-Strahlteiler und einem sogenannten TrueAlignment-Spiegel verbaut. Diese Interferometerbauart soll, im Vergleich zu herkömmlichen Geräten, höhere zeitliche und spektrale Auflösungen (besser als $0,2 \text{ cm}^{-1}$) ermöglichen. Der TrueAlignment-Spiegel ermöglicht eine (semi-) automatische Justage des Interferometers. Als Referenz ist ein Helium-Neon-Laser (HeNe; 633 nm) in das Interferometer eingekoppelt. Das entsprechende Referenzinterferogramm wird durch eine Photodiode innerhalb des Spektrometers detektiert. Der bewegliche Interferometerspiegel wird kontinuierlich und reibungsfrei auf einem Luftlager bewegt. Dadurch können maximal 110 Spektren pro Sekunde aufgezeichnet werden.¹⁶⁶

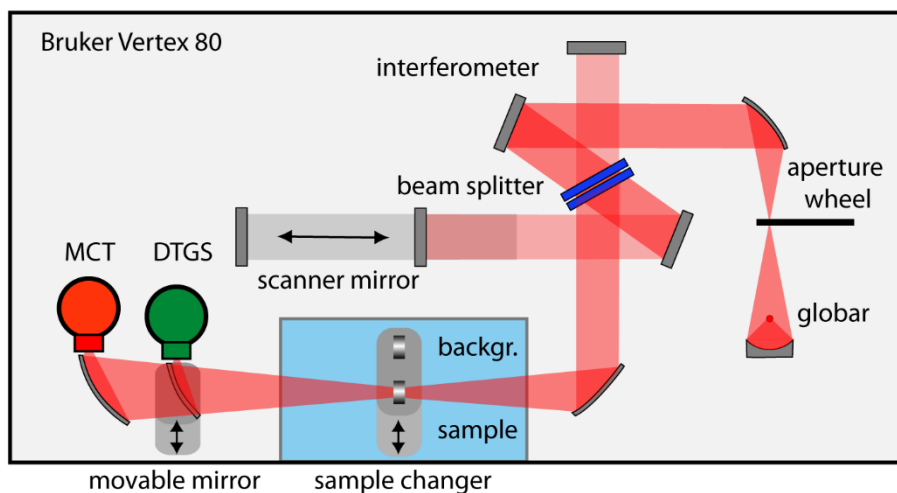


Abbildung 3.2. Schemazeichnungen des FTIR-Spektrometers Bruker Vertex 80.¹⁶⁶ Der Spektrometerraum ist in hellgrau, der Probenraum in hellblau dargestellt.

Nach dem Interferometerdurchgang wird die Strahlung in den Probenraum des Spektrometers geleitet. Standardmäßig ist hier ein simpler Probenhalter für Transmissionsmessungen von sogenannten Sandwichküvetten verbaut. Neben der Standardküvettenhalterung kann hier auch eine temperierbare Küvettenhalterung eingeschoben werden. Alternativ kann der Probenhalter auch durch einen zweifach-Probenwechsler (A508/Q, Automatischer Probenwechsler, Bruker Optics GmbH) ersetzt werden, der es ermöglicht, Referenz- und Probenmessung in direkter Folge zu messen. Außerdem kann ein modifizierter Standardprobenhalter für Belichtungsmessungen oder zeitaufgelöste Messungen eingebaut werden. Dazu ist der Halter mit Spiegeln ausgestattet, die eine Beleuchtung (gepulst oder CW) der Probe mittels verschiedener Lichtquellen (YAG-Laser, LED, usw.) ermöglichen. Dazu wurde der Deckel des Probenraums mit einem Kleinflanschsystem (KF 40, Jakob Vakuumtechnik GmbH, Kleinwallstadt) modifiziert. In das Kleinflanschsystem können beispielsweise Quarzglasfenster (Crystal GmbH), Kabel- und Faserdurchführungen oder Blindflansche eingepasst werden. Des Weiteren ist es möglich, in den Probenraum eine ATR-Zelle (BioATR-II, Bruker Optics GmbH) einzubauen. Dazu muss der Probenraum vollständig geöffnet werden. Teleskopanschlüsse sorgen dabei für eine gasdichte Verbindung zwischen ART-Zelle und Spektrometerraum. Die ATR-Zelle muss mittels eines angeschlossenen Thermostaten (Ministat Pilot One 125, Huber Kältemaschinenbau, Offenburg) temperiert werden, da ATR-Messungen sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren. Außerdem ist es mithilfe des Thermostats möglich, temperaturabhängige ATR-Messungen durchzuführen.¹⁶⁶

Die verschiedenen Probenhalter befinden sich auf sogenannten QuickLock-Platten (I18186 QuickLock-Probenraumgrundplatte, Bruker Optics GmbH) und werden dadurch automatisch richtig im Probenraum positioniert und vom FTIR-Spektrometer erkannt.

Nach dem Durchlaufen des Probenraums fällt die Strahlung wieder in den Spektrometerraum und trifft dort auf einen von zwei möglichen Detektoren. Als Detektoren stehen ein DLaTGS- (D301/B, Bruker; Detektionsbereich: $8000\text{--}350\text{ cm}^{-1}$) sowie ein MCT-Detektor (D317/BF, Kolmar Technologies, Newburyport, USA; Detektionsbereich: $12000\text{--}850\text{ cm}^{-1}$) zur Verfügung. Über einen motorisierten Spiegel kann jeweils einer der beiden Detektoren ausgewählt werden. Der DLaTGS-Detektor kann bei Raumtemperatur betrieben werden, während der MCT-Detektor mittels flüssigem Stickstoff^m auf rund 77 K heruntergekühlt werden muss.¹⁶⁶

Das Spektrometer ist über einen Ethernet-Port mit einem Computer (Dell, Round Rock, USA) verbunden. Über die Software OPUS 7.5 (Bruker Optics GmbH) werden sowohl die Steuerung des Spektrometers als auch die Datenerfassung, Darstellung, Korrektur und Auswertung abgewickelt.

3.1.3 Sandwichküvetten

Für IR-Messungen wurden in dieser Arbeit standardmäßig sogenannte Sandwichküvetten verwendet. Diese zerlegbaren Küvetten bestehen aus zwei CaF_2 -Fenstern ($\text{Ø } 25,4(\pm 0,1)\text{ mm} \times 2(\pm 0,1)\text{ mm}$, beidseitig optisch poliert, Crystal GmbH) sowie einem Abstandshalter (sog. Spacer, Späh GmbH, Scheer) aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon[®]). Die Probe wird dabei zwischen den beiden CaF_2 -Fenstern eingeschlossen. Der PTFE-Abstandshalter sorgt dabei für eine definierte Schichtdicke. Je nach Abstandshalter sind verschiedene Schichtdicken möglich. Als Standardschichtdicke wurde allerdings $50\text{ }\mu\text{m}$ verwendet. Die Abstandshalter wurden leicht mit PTFE-Paste (Carl Roth, Arlesheim, Schweiz) bestrichen. Dies dichtet das Küvetteninnere gasdicht nach außen ab und sorgt für Halt zwischen den Fenstern und dem Abstandshalter. Das nötige Probenvolumen ist durch die Schichtdicke sowie durch die Breite des Abstandshalters vorgegeben. Typischerweise werden pro Küvette $10\text{--}40\text{ }\mu\text{l}$ Probe benötigt.

3.1.4 Aufnahme und Korrektur stationärer Spektren

In diesem Unterkapitel soll kurz das Mess-, Korrektur- und Auswerteverfahren für stationäre FTIR-Spektren beschrieben werden. Alle angegebenen Werte und Methoden beschreiben eine Standardmessung. Abhängig von der Probe (Art, Konzentration, Schichtdicke, usw.) und der Fragestellung mussten diese Werte oder Verfahren zumindest teilweise verändert werden.

Vor jeder Messung musste zunächst sichergestellt werden, dass der Probenraum für mindestens 30 Minuten mit trockener Luft oder Stickstoff gespült wurde. Erst dann wurde ohne Probe ein Hintergrundspektrum (Einkanalspektrum) aufgezeichnet. Anschließend wurde die Probe in den Probenhalter eingesetzt. Mithilfe des automatischen Probenwechslers war dies möglich, ohne den Probenraum zu öffnen. Andernfalls musste nach dem Einsetzen der Probe der Probenraum erneut gespült werden. Im Anschluss wurde die eigentliche Probenmessung (Einkanalspektrum) vorgenommen. Aus beiden Einkanalspektren wurde dann automatisch ein Rohabsorptionsspektrum berechnet. Üblicherweise wurde anschließend die soeben beschriebene Prozedur mit einer Lösungsmittelküvette wiederholt. Alle Messungen wurden dabei mit den gleichen Messparametern durchgeführt. Typische Werte dieser Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

^m Zur Kühlung des MCT-Detektors sind rund $0,5\text{ l}$ flüssiger Stickstoff nötig. Nach spätestens nach sieben bis acht Stunden ist eine neue Füllung des MCT-Dewargefäßes nötig.

Tabelle 3.1. Ausgewählte Parameter des FTIR-Spektrometers mit typischen Werten bzw. Standardwerten.

Parameter	Typische Werte bzw. Standardwerte
Spektralbereich	800–4000 cm^{-1}
Wellenzahlauflösung	1 cm^{-1} (MCT); 2 cm^{-1} (DLaTGS)
Mittelungen	128 oder 256 Scans
Aufnahmemodus	double-sided, forward-backward
Spiegelgeschwindigkeit (Fourier-Frequenz)	20 kHz (MCT); 10 kHz (DLaTGS)
Apertur	2
Hochpassfilter	offen
Tiefpassfilter	10 kHz
Phasenauflösung	8
Phasenkorrektur	Mertz
Zerofillingfaktor	2–4
Apodisationsfunktion	Blackman-Harris-3-Term

Mit diesem Verfahren erhielt man je ein Rohabsorptionsspektrum der Probe und ein Absorptionsspektrum des entsprechenden Lösungsmittels. Diese Spektren wurden anschließend einer Spektrenkorrektur mittels OPUS 7.5 unterworfen. Dazu wurde für beide Spektren zunächst eine sogenannte atmosphärische Kompensation durchgeführt. Dabei wurden Wasserdampf- und CO_2 -Absorptionsbanden unterdrückt.¹⁵⁶ Im nächsten Schritt war es möglich, den betrachteten Spektralbereich einzuschränken.

Anschließend wurde eine Basislinienkorrektur mit der sogenannten Gummibandmethode durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein iteratives Verfahren, welches die Basislinie anhand eines Polygonzuges aus einer bestimmten Anzahl (n) an Grundlinienpunkten errechnet. Die Grundlinienpunkte können dabei durch gerade Linien oder durch Polynome verbunden werden. Je mehr Iterationen vorgenommen werden, umso mehr Grundlinienpunkte werden dabei gewählt. Die Anzahl der Iterationen sollte deshalb nicht zu hoch gewählt werden, da sonst spektrale Informationen verloren gehen können.¹⁵⁶

Im nächsten Schritt war es dann möglich, das basislinienkorrigierte Lösungsmittelspektrum vom basislinienkorrigierten Probenspektrum skaliert zu subtrahieren. In diesem Schritt konnte durch entsprechende skalierte Spektrensubtraktion eine weitere Wasserdampf- oder $\text{D}_2\text{O}/\text{HDO}$ -Korrektur vorgenommen werden. Nach allen Korrekturschritten wurde so abschließend ein basislinien- und lösungsmittelkorrigiertes Absorptionsspektrum der Probe erhalten. Je nach Probe und Fragestellung waren dann weitere Subtraktionsschritte bzw. Differenzspektroskopiemethoden notwendig bzw. möglich.

3.2 Statische UV/vis-Spektroskopie

Die Basis jeder UV/vis-spektroskopischen Untersuchung sind zunächst statische Absorptions- und Emissionsmessungen. Deshalb handelt es sich dabei inzwischen um spektroskopische Standardverfahren, die an kommerziell erhältlichen Geräten durchgeführt werden können. Nichtsdestotrotz erfordert die Aufnahme, Korrektur und Auswertung der statischen Spektren besondere Sorgfalt, da alle weiteren Messungen und Interpretationen auf den statischen Daten aufbauen müssen. Dementsprechend thematisieren die folgenden Unterkapitel die entsprechenden Methoden.

3.2.1 Aufnahme und Korrektur stationärer Spektren

Für die Aufzeichnung von statischen Absorptionsspektren wurden 10 mm x 4 mm Quarzküvetten (UV-durchlässig, 29-F/Q/10, Starna GmbH, Pfungstadt, Deutschland) sowie ein JASCO V-650 Absorptionsspektrometer (JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland) verwendet. Die Absorption wurde entlang der längeren Küvettenachse (10 mm) bestimmt. Die Proben konnten während der Messung temperiert werden. Falls im Rahmen dieser Arbeit nichts anderes angegeben wird, wurden die Spektren bei 20 °C aufgezeichnet. Alle gezeigten Spektren wurden nach der Messung einer Untergrundkorrektur (Offsetkorrektur) unterworfen. Je nach Verwendungszweck des Absorptionsspektrums wurde dieses anschließend eventuell auch normiert oder mit einem festen Faktor skaliert.

Statische Fluoreszenzspektren wurden mittels eines JASCO FP 8500 Fluoreszenzspektrometers aufgezeichnet, welches mit einem temperierbaren Probenhalter ausgestattet war (ETC-815, JASCO). Dazu wurden ebenfalls 10 mm x 4 mm Quarzküvetten (UV-durchlässig, 29-F/Q/10, Starna GmbH, Pfungstadt, Deutschland) verwendet. Die Probe wurde zur Messung der Fluoreszenz entlang der längeren Küvettenachse (10 mm) angeregt. Die Detektion erfolgte im 90°-Winkel zur Anregung und entlang der kürzeren Küvettenachse (4 mm). Zur Korrektur von Fluoreszenzspektren ($F_{\text{Roh}}(\lambda)$) waren mehrere aufeinander aufbauende Korrekturschritte nötig: So mussten die Spektren einer Untergrund- ($F_{\text{Un}}(\lambda)$), Absorptions- ($F_{\text{Abs}}(\lambda)$), Detektor- ($F_{\text{Det}}(\lambda)$) sowie einer Reabsorptionskorrektur ($F_{\text{Reabs}}(\lambda)$) unterworfen werden. Hierbei berücksichtigte die Absorptionskorrektur ($F_{\text{Abs}}(\lambda)$) den Verlust der Anregungsintensität vom Rand bis zum Zentrum der Küvette ($x = 5$ mm) durch die Absorption der Probe. Näherungsweise wurde in diesem Fall davon ausgegangen, dass die Emission lokal an einem Punkt im Zentrum der Küvette auftritt. Für diesen Korrekturschritt war ein untergrundkorrigiertes Absorptionsspektrum der Probe nötig.

$$F_{\text{Abs}}(\lambda) = \frac{F_{\text{Un}}(\lambda)}{10^{-OD(\lambda_{\text{Ex}}) \frac{x}{10 \text{ mm}}}} \quad \text{Formel 3.1}$$

Die Detektorkorrektur ($F_{\text{Det}}(\lambda)$) berücksichtigte die Wellenlängenabhängigkeit der Detektorintensität. Dieser wurde durch eine gerätespezifische Korrekturkurve ($\text{Det}_{\text{korrr}}(\lambda)$) Rechnung getragen, die mittels einer kalibrierten Lichtquelle aufgezeichnet werden konnte.

$$F_{\text{Det}}(\lambda) = \frac{F_{\text{Abs}}(\lambda)}{\text{Det}_{\text{korrr}}(\lambda)} \quad \text{Formel 3.2}$$

Auch die sogenannte Reabsorption des emittierten Lichts durch die Probe musste, bei spektral stark überlappenden Absorptions- und Fluoreszenzspektren, berücksichtigt und korrigiert ($F_{\text{Reabs}}(\lambda)$) werden. Hierbei wurde wieder von Fluoreszenz aus dem Zentrum der Küvette heraus ausgegangen ($d = 2$ mm). Auch für diesen Schritt war ein untergrundkorrigiertes Absorptionsspektrum der Probe nötig. Prinzipiell müsste hier nur der Überlappungsbereich zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren korrigiert werden. Bei Berücksichtigung der kompletten Spektren kommt es allerdings zu identischen Ergebnissen. Deshalb kann dieser Korrekturschritt unabhängig vom Überlappungsbereich durchgeführt werden.

$$F_{\text{Reabs}}(\lambda) = \frac{F_{\text{Det}}(\lambda)}{10^{-OD(\lambda) \frac{d}{10 \text{ mm}}}} \quad \text{Formel 3.3}$$

Nach diesen Korrekturschritten wurden die Fluoreszenzspektren üblicherweise abschließend normiert, skaliert oder konzentrationskorrigiert.

3.2.2 Auswertung von Schmelzexperimenten

RNA-Schmelzanalysen wurden sowohl mittels Absorptions- als auch mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Im Fall der Fluoreszenzspektroskopie waren die RNA-Proben mit einem Fluorophor markiert. Ansonsten entsprachen für beide Methoden Probenkonzentration, Küvettenbauform sowie Spektrometereinstellungen komplett dem oben erwähnten Standard für statische Messungen.

Zur Aufzeichnung von Absorptionsschmelzkurven wurde die Änderung der RNA-Absorptionsbande bei 260 nm im Temperaturbereich zwischen 20 °C und 90 °C beobachtet. Dazu wurde ein JASCO V-650 Absorptionsspektrometer mit einem temperierbaren Sechsfach-Probenwechsler (NCP-706, JASCO) verwendet. Die Temperatur wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min geändert und die Absorptionswerte in 0,5 °C-Schritten digitalisiert. Um Hystereseeffekte zu berücksichtigen, wurden sowohl eine Heiz- als auch eine Kühlkurve aufgezeichnet. Für weitere Auswertungen wurden beide Kurven anschließend gemittelt.

Bei den mittels Fluoreszenzmethoden beobachteten Schmelzexperimenten wurde die Änderung des Fluoreszenzspektrums (Maximum bei 460 nm) des Fluoreszenzmarkers ζ_m^f (vgl. Kapitel 2.1, Kapitel 4.2.2.2 und Kapitel 4.2.3.3) beobachtet. Dazu wurde die Probe mit 355 nm bzw. 360 nm angeregt und komplette Fluoreszenzspektren, mit einem Abstand von 5 °C, aufgezeichnet. Um Hystereseeffekte zu vermeiden, wurde bei jeder Temperatur vor der Messung zehn Minuten gewartet, um die Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen.

Die Schmelzpunktbestimmung sowie die Ermittlung der thermodynamischen Parameter wurden nach einer von Mergny und Lacroix beschriebenen Methode durchgeführt (Abbildung 3.3).¹⁶⁷ Dabei werden an die Schmelzkurve eine obere (L_{up}) und eine untere Basislinie (L_{low}) angenähert. Die beiden Basislinien werden anschließend gemittelt. Der Schnittpunkt der so berechneten Mittellinie mit der gemessenen Schmelzkurve entspricht dem Schmelzpunkt der Probe.

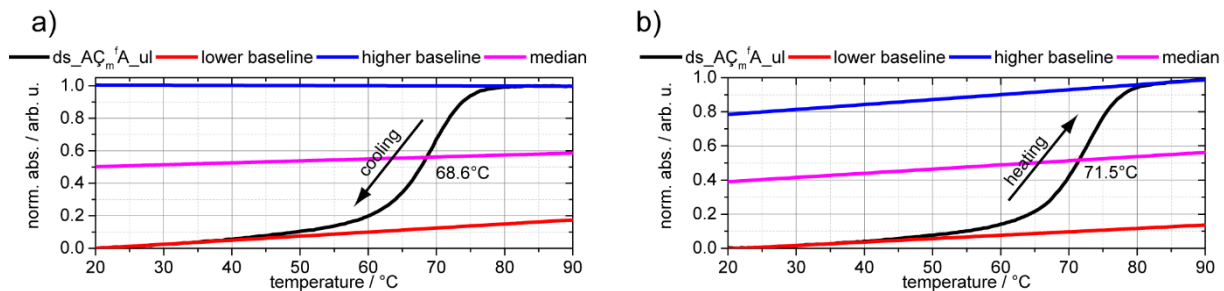


Abbildung 3.3. Beispiele für Absorptionsschmelzkurven (260 nm) von unmarkierten RNA-Doppelsträngen inklusive der unteren und oberen Basislinie sowie dem Mittelwert aus beiden Linien. a) Kühlkurve. b) Heizkurve.

Die thermodynamischen Parameter, also Enthalpie und Entropie, können, nach Mergny und Lacroix, ebenfalls aus den Schmelzkurven bestimmt werden.¹⁶⁷ Dabei geht man davon aus, dass das untersuchte Makromolekül nur in zwei Zuständen vorliegen kann. Diese Zustände stehen in einem Gleichgewicht zueinander und sind das gefaltete (doppelsträngige) und ungefaltete (einzelssträngige) Makromolekül. Diese Annahme ist allerdings nur für kurze Oligomere zulässig. Aus der Schmelzkurve (A) und den beiden Basislinien kann der gefaltete Anteil der Probe (*fraction folded*, θ) für jede gemessene Temperatur (T , in Kelvin) errechnet werden.¹⁶⁷

$$\theta(T) = \frac{(L_{up}(T) - A(T))}{(L_{up}(T) - L_{low}(T))} \quad \text{Formel 3.4}$$

Im Fall einer bimolekularen Reaktion ist es dann möglich, mittels des gefalteten Anteils und der Ausgangskonzentration (c_0) die Gleichgewichtskonstante (K_a) zu bestimmen.¹⁶⁷

$$K_a = \frac{\theta(T)}{c_0(1 - \theta(T))^2} \quad \text{Formel 3.5}$$

Im nächsten Schritt wird $\ln(K_a)$ gegen die reziproke Temperatur ($1/T$) aufgetragen und eine lineare Anpassung der Daten im Bereich um den Schmelzpunkt vorgenommen. Für eine möglichst präzise Auswertung wurde die lineare Anpassung auf den Wertebereich beschränkt, in dem gilt: $0,15 < \theta < 0,85$. Bei der Auswertung wird ausgenutzt, dass am Schmelzpunkt folgender Zusammenhang gilt:¹⁶⁷

$$\ln(K_a) = \frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T_m} - \frac{\Delta S^0}{R} \quad \text{Formel 3.6}$$

Entsprechend kann aus der Steigung der linearen Anpassung ΔH^0 und aus dem y-Achsenabschnitt ΔS^0 berechnet werden. Dazu muss jeweils eine Multiplikation mit der idealen Gaskonstante (R) vorgenommen werden. Über K_a bzw. aus ΔH^0 und ΔS^0 kann schließlich für eine beliebige Temperatur ΔG^0 berechnet werden.¹⁶⁷

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K_a) = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad \text{Formel 3.7}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde ΔG^0 für 37 °C bestimmt.

3.2.3 Fluoreszenzquantenausbeutemessung

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten (FQY) wurden als absolute Quantenausbeuten, also mithilfe einer Ulbricht-Kugel (*integrating sphere*, IS) bestimmt. Zu diesem Zweck konnte das JASCO FP 8500 Fluoreszenzspektrometer mit einer 100 mm Ulbricht-Kugel (ILF-835, JASCO) ausgerüstet werden.

Zur absoluten Quantenausbeutemessung wurden dann unter exakt gleichen Bedingungen zwei Emissionsmessungen vorgenommen: So wurde zunächst das Lösungsmittel (*blank*) vermessen, wobei darauf geachtet werden musste, dass das Streulichtsignal nicht zur Übersättigung des Detektors führt. Anschließend wurde die eigentliche Probe mit Fluorophor (*sample*) vermessen. Die optische Dichte (*optical density*, OD) der Fluorophorprobe musste dabei im Bereich zwischen 0,05 und 0,1 OD liegen, um z.B. Artefakte durch Reabsorption zu verhindern. Beide Proben, also Lösungsmittel und Fluorophor, wurden in möglichst gleichen Küvetten (10 mm x 4 mm Quarzküvetten, UV-durchlässig, 29-F/Q/10, Starna GmbH, Pfungstadt, Deutschland) gemessen. Dabei mussten penibel Verunreinigungen, Kratzer, ungelöste Feststoffe, Blasen, Schaum, aber auch Füllhöhenunterschiede (mind. Volumen 800 µl) ausgeschlossen werden. Dementsprechend sollte im Idealfall dieselbe Küvette für beide Messungen verwendet werden. Dies stellte sich allerdings als unpraktisch heraus, da bei diesem Verfahren Probe verloren geht (vollständige Probenbergung ist nicht möglich), es zu Kreuzkontaminationen der Proben kommen kann und das Verfahren (durch Probenbergung und Reinigung) zeitaufwendig ist. Letzteres war vor allem wegen leichter Veränderungen der Lampenintensität und der Spektrometerempfindlichkeit über die Zeit (sog. Drift) ein nicht zu vernachlässigender Punkt.

Vor der Auswertung der Messungen mussten zunächst beide Spektren detektorkorrigiert werden. Dagegen waren Absorptions- und Reabsorptionskorrekturen bei den eingesetzten niedrigen Konzentrationen bzw. optischen Dichten nicht nötig. Zur eigentlichen Auswertung wurden dann Blank- und Sample-Spektrum voneinander subtrahiert. Hierbei zeigte sich, ob eine zusätzliche Untergrundkorrektur der Spektren nötig war. Die erhaltenen Differenzen (Δ_{em} = Differenzintegral des Emissionssignals; Δ_{ex} = Differenzintegral des Anregungssignals) wurden wiederum integriert und das Verhältnis aus beiden berechnet:

$$FQY = \frac{\Delta_{em}}{\Delta_{ex}} \quad \text{Formel 3.8}$$

Die so berechneten Differenzen waren zum Teil sehr klein im Vergleich zum Gesamtsignal. Dementsprechend war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, S/N) der Messungen ein weiterer kritischer Punkt bei den absoluten Fluoreszenzquantenausbeutemessungen. Deshalb wurden für FQY-Bestimmungen im Rahmen dieser Arbeit mindestens fünf einzelne Messungen gemittelt, um schließlich eine verlässliche und reproduzierbare Quantenausbeutemessung gewährleisten zu können.

3.2.4 Fluoreszenzanisotropiemessung

Statische Messungen der Fluoreszenzanisotropie wurden ebenfalls mittels des JASCO FP 8500 Fluoreszenzspektrometers durchgeführt. Dazu wurde das Spektrometer mit zwei automatisiert drehbaren Polarisationsfiltern (FDP-837, JASCO) ausgestattet. Einer der beiden Polarisationsfilter befand sich dabei im Anregungsstrahl als Polarisator. Der zweite Polarisationsfilter befand sich im Emissionsstrahl und diente als Analysator. Außerdem wurde bei den Messungen ein temperierbarer Probenhalter (ETC-815, JASCO) verwendet, da die Anisotropie sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagiert.

Zur Ermittlung der Anisotropie einer Probe waren vier Fluoreszenzmessungen bei unterschiedlichen Polarisationsfilterstellungen nötig (Tabelle 3.2), wobei ansonsten Probenkonzentration, Küvettenbauform sowie Spektrometereinstellungen komplett dem oben erwähnten Standard für statische Messungen entsprachen.

Tabelle 3.2. Polarisator- und Analysatorpositionen für Fluoreszenzanisotropiemessungen

Polarisatorposition	Analysatorposition	resultierendes Spektrum
90° bzw. vertikal (V)	90° bzw. vertikal (V)	I _{VV}
90° bzw. vertikal (V)	0° bzw. horizontal (H)	I _{VH}
0° bzw. horizontal (H)	90° bzw. vertikal (V)	I _{HV}
0° bzw. horizontal (H)	0° bzw. horizontal (H)	I _{HH}
0° bzw. horizontal (H)	54,675° bzw. magischer Winkel (m.a.)	I _{ma}

Als fünfte Messung bietet sich allgemein eine Messung im sogenannten magischen Winkel (*magic angle*, m.a.) an, um ein Fluoreszenzspektrum ohne Anisotropieeffekte zu erhalten. Alle Messungen wurden in direkter Abfolge zueinander durchgeführt, um eine Beeinflussung durch eventuelle Spektrometerdrifts zu minimieren.

Alle aufgezeichneten Spektren mussten, wie oben beschrieben, komplett korrigiert werden. Hierbei war darauf zu achten, die entsprechenden Korrekturkurven für jede einzelne Polarisationsfilterposition zu verwenden. Mittels der korrigierten Spektren war es dann möglich, die statische Fluoreszenzanisotropie (*r*) der Probe zu berechnen:¹³⁶

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \text{ mit } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad \text{Formel 3.9}$$

I_{HV} und I_{HH} wurden dabei zur Berechnung des Gerätefaktors (*G*) benötigt. Dieser Faktor korrigiert Effekte, die durch eine polarisationsabhängige Detektorempfindlichkeit hervorgerufen werden. Im Idealfall ist der Gerätefaktor eins. Der Faktor sollte im Prinzip für jedes Gerät weitgehend konstant sein. Um aber Effekte durch veränderte Spektrometereinstellungen oder Detektor- und Lampendrifts ausschließen zu können, empfiehlt es sich, den Gerätefaktor für jede einzelne Messung separat zu bestimmen.

Mittels der oben genannten Formel konnte also die Anisotropie separat an jedem Punkt des Spektrums bestimmt werden. Sinnvoll war dies allerdings nur in der spektralen Region, in der auch tatsächlich Emission auftritt. Zur Bestimmung der statischen Anisotropie wurden die Anisotropiewerte (*r*) in diesem Bereich gemittelt.

3.2.5 Aufnahme stationärer UV/vis-Tiefemperaturabsorptionsspektren

Eine Anlage zur Aufzeichnung von statischen UV/vis-Tiefemperaturabsorptionsspektren wird zum Beispiel für die Methode des kryogenen Einfangens (*Cryotrapping*) von Photointermediaten benötigt. Bei dieser Methode müssen Proben im Temperaturbereich von rund 77 K (-196,15 °C) bis hin zu 310 K (36,85 °C) temperiert werden können. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Tiefemperaturabsorptionsspektrometer (sog. Kryoabsorptionsspektrometer) aufgebaut (Abbildung 3.4a).

Die Anlage besteht im Wesentlichen aus einer CW-Weißlichtlampe (DH-2000-BAL, Ocean Optics, Dunedin, USA), einem Kryostaten (Optistat DN, Oxford Instruments, Abingdon, GB; Abbildung 3.4b) und einem Faserspektrometer (USB2000+, Ocean Optics, Dunedin, USA, oder tecSpec CGS, tec5, Oberursel, Deutschland). Der Kryostat befindet sich im Zentrum der Anlage und wird als temperierbarer Probenhalter verwendet. CaF₂-Fenster in der Probenkammer des Kryostaten ermöglichen die Einkopplung einer UV/vis-Lampe mittels einer Glasfaser und einer Linse. Ein Neutraldichtfilterrad (NDC-50-2, Thorlabs, Austin, USA) ermöglicht die stufenlose Abschwächung dieses Messlichts. Wiederum im Zentrum der Probenkammer fällt das Messlicht auf die Probe. Je nach Präparation befindet sich die Probe in einer 1 mm Absorptionsküvette (verschiedene Typen, meist 100-QS, Hellma Analytics, Müllheim) oder in einer sogenannten CaF₂-Sandwichküvette (Glas: ø=15 mm, d=2 mm, CRYSTAL GmbH, Berlin, Deutschland; Schichtdicke durch PTFE-Spacer: 12 µm, 50 µm oder 100 µm). Die 1 mm Küvette kann mittels handelsüblichen Teflonbands (PTFE) am Standardprobenstab des Kryostaten befestigt werden. Die Sandwichküvette kann komplett in den Probenstab eingeschraubt werden. Nach Probendurchgang trifft das Messlicht auf eine weitere Linse und wird in die Glasfaser eines Faserspektrometers fokussiert. Die eigentliche Messung wird über die jeweilige Software des Faserspektrometers gesteuert (Ocean View, Ocean Optics oder Multispec Pro II, tec5). Über die CaF₂-Fenster des Probenraums kann die Probe zusätzlich beleuchtet werden, falls dies für das jeweilige Experiment nötig ist. Hierfür kann wahlweise eine CW-

Lampe, eine LED (z.B. M530L3, Thorlabs, Austin, USA) oder ein Laser (GLP-III-405-50 bzw. GLP-III-532-50, Roithner Lasertechnik GmbH, Wien, Österreich) verwendet werden. Um die Probe vor Raum- oder Tageslicht zu schützen, befindet sich der Aufbau in einem Kasten aus schwarzem Kunststoff (Polyvinylchlorid, PVC).

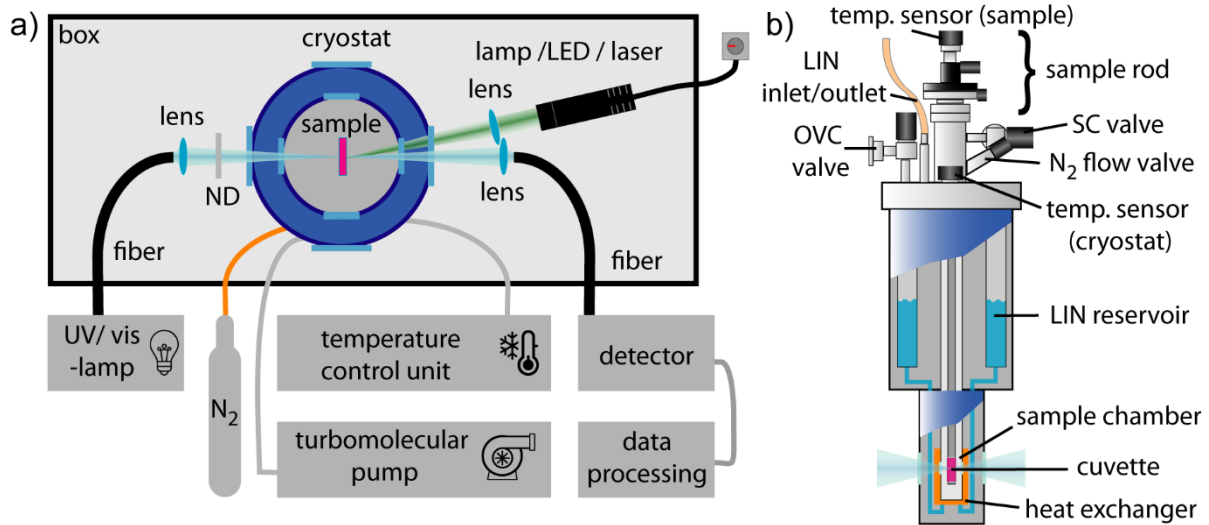


Abbildung 3.4. a) Schemazeichnungen des Tieftemperaturabsorptionsspektrometers. ND=Neutralfilterrad. b) Schnitt durch einen Kryostat.^{168,169} N₂ = gasförmiger Stickstoff, LIN = flüssiger Stickstoff, OVC = äußere Vakuumkammer, SC = Probenkammer.

3.2.5.1 Funktionsweise und Bedienung eines Kryostaten

Ein Kryostat ist ein Gerät zur Temperaturregulierung von Proben. Im Unterschied zu den weit verbreiteten wasser-, Peltier- oder luftgekühlten Kühlgeräten können mittels eines Kryostaten auch sehr tiefe Temperaturen (z.B. 77 K) erreicht werden. Als Kühlmittel werden dazu tiefkalte verflüssigte Gase, wie z.B. flüssiger Stickstoff, eingesetzt. Vereinfacht kann ein Kryostat auch als Dewargefäß mit Beobachtungsfenstern angesehen werden. Tatsächlich ist der Aufbau allerdings etwas komplizierter, was vor allem eine genauere Temperatursteuerung ermöglicht:

Ein Kryostat besteht üblicherweise aus drei getrennten Kammern. Die äußere Kammer befindet sich im Mantel des Geräts und dient zur thermischen Isolation des Kryostats. Dazu wird in der Kammer mittels einer Turbomolekularpumpe (Turbo.DriveS + DIVAC 0.8T, Leybold AG, Köln) ein möglichst konstanter Unterdruck von $\leq 10^{-4}$ mBar erzeugt, weshalb die Kammer auch äußere Vakuumkammer (*outer vacuum chamber*, OVC) genannt wird. Die Pumpe wird über das OVC-Ventil angeschlossen. In der OVC befindet sich auch ein Sorptionsmittel, das ebenfalls zur Druckstabilität der OVC beitragen kann.

Im Zentrum des Kryostaten befindet sich die Probenkammer (*sample chamber*, SC). Diese Kammer enthält die Probenküvette in einer Stickstoff- oder Helium-Atmosphäre. Das Innere der SC kann über mehrere Fenster mittels optischer Methoden beobachtet oder beleuchtet werden. Die Kammer hat entweder Raumdruck oder steht unter leichtem Überdruck. Starke Druckschwankungen innerhalb der SC, etwa durch schlagartige Kondensation oder Evaporation von Stickstoff, können leicht zu einer Beschädigung des Kryostaten im Allgemeinen sowie der Probenraumfenster im Besonderen führen. Deshalb ist das Ventil des Probenraums im laufenden Betrieb geöffnet und mit einem Druckausgleichsbehälter verbunden. Dabei kann es sich um eine dickwandige Gummiblase oder auch nur um einen handelsüblichen Luftballon handeln. In der Probenkammer darf sich keine Feuchtigkeit befinden, um ein Anlaufen oder Zufrieren der Küvetten oder Kryostatfenster zu verhindern.

Bei der dritten Kammer handelt es sich im Prinzip um ein Reservoir für flüssigen Stickstoff (LIN), welches über eine Öffnung an der Oberseite des Kryostaten befüllt werden kann. Eine zweite baugleiche Öffnung ermöglicht dabei das Entweichen der durch den Stickstoff verdrängten Gase sowie des überflüssigen Stickstoffes. Das Stickstoffreservoir ist mit einem Wärmetauscher verbunden, der die Probenkammer umgibt. Zuströmender LIN kann hier verdampfen und so den Probenraum und die Probe herunterkühlen. Alternativ kann der Wärmetauscher aber auch elektrisch geheizt werden (Widerstandsheizung), was zu einer Erwärmung der Probe und stärkerem Verdampfen des LIN führt. Dabei wird die Verdampfung allerdings durch ein Nadelventil zusätzlich kontrolliert. Zur Temperaturkontrolle wird dementsprechend ein Gleichgewicht aus elektrischer Heizung und

Verdampfungsrate eingestellt. Während die Widerstandsheizung dabei automatisch von einer Temperaturkontroll-einheit (ITC503, Oxford Instruments, Abingdon, GB) gesteuert wird, muss das Abgasventil von Hand betätigt werden. Dabei kann die Temperatur des Kryostaten oder die Temperatur des Probenhalters mittels der Temperaturkontrolleinheit abgefragt werden.

Zum schnellen Abkühlen der Probe wird dementsprechend nicht geheizt und das Nadelventil komplett geöffnet, um eine schnelle Verdampfung zu gewährleisten. Um die Temperatur der Probe zu erhöhen oder konstant zu halten, wird die Probenkammer beheizt, während das Nadelventil nur leicht geöffnet ist, um eine Druckerhöhung zu verhindern. Je nach Heiz- oder Kühlleistung muss das Stickstoffreservoir regelmäßig nachgefüllt werden, um eine konstante Temperierung gewährleisten zu können.

Der Wärmeübertrag zwischen Wärmetauscher und Probe findet ausschließlich über das Gas im Probenraum statt. Helium (Wärmeleitfähigkeit $0,1567 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$)¹⁷⁰ ermöglicht im Vergleich zu Stickstoff (Wärmeleitfähigkeit $0,0260 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$)¹⁷⁰ einen schnelleren Temperaturübertrag. Allerdings ist Helium bei häufigem Probenwechsel von Nachteil, da es den Kryostaten schnell nach oben verlassen kann und so leicht Feuchtigkeit in die Probenkammer gelangen kann. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Stickstoff als Probenraumgas verwendet.

3.3 Zeitaufgelöste UV/vis-Spektroskopie

Zeitaufgelöste UV/vis-Spektroskopie ist üblicherweise methodisch wesentlich aufwendiger und komplizierter als die statischen Entsprechungen. Dies gilt sowohl für die eigentliche Messung als auch für die Datenverarbeitung und Analyse, wobei üblicherweise der methodische Aufwand mit der Zeitauflösung der Anlage steigt. Dieser Aufwand ist allerdings nötig, um Einblicke in die Photochemie oder allgemein in dynamische Prozesse der untersuchten Proben zu erhalten. Die folgenden Unterkapitel thematisieren deshalb die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten zeitaufgelösten Methoden.

3.3.1 Ultraschnelle transiente Absorptionsspektroskopie

Die höchste Zeitauflösung konnte mittels eines sogenannten ultraschnellen transienten Absorptionsspektroskopieaufbaus (TAS) erreicht werden (Abbildung 3.5). Dabei handelt es sich um ein typisches Anreg-Abtast-Experiment (*pump-probe*). Die Hauptbestandteile der Anlage sind ein fs-Lasersystem als Anregungsquelle, eine Strecke zur Erzeugung von sogenanntem Weißlicht, eine Strecke zur Frequenzverdopplung des Anregungslichts, eine variable Verzögerungsstrecke, sowie eine Detektionseinheit bestehend aus einem Spektrographen und einem Diodenzeilendetektor.

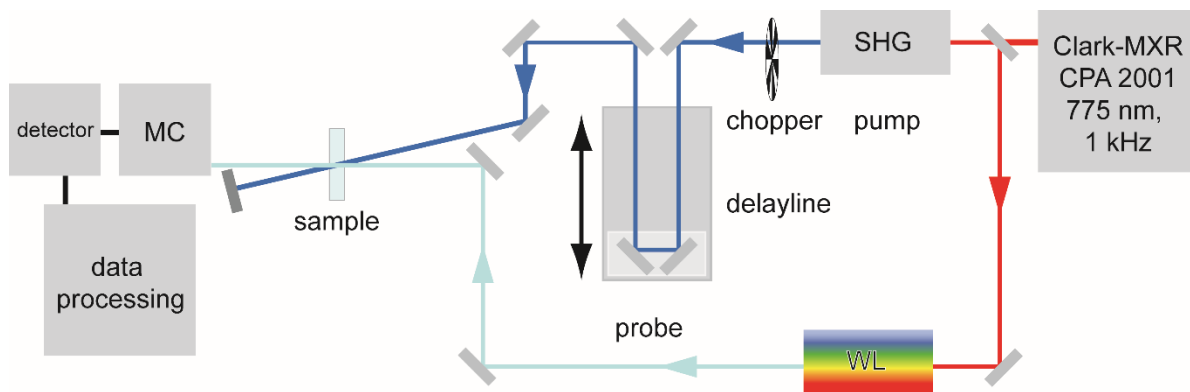


Abbildung 3.5. Schemazeichnung des ultraschnellen, transienten Absorptionsspektroskopieaufbaus (TAS).

3.3.1.1 Lasersystem

Als gepulste Lichtquelle dient hier ein sogenanntes Oszillator-Verstärker-System (CPA-2001, Clark-MXR, Michigan, USA), welches mit einer Repetitionsrate von 1 kHz Laserpulse mit einer Pulsbreite von ca. 150 fs und einer Wellenlänge von 775 nm liefert.¹⁷¹

Das Lasersystem besteht aus einem Diodenlaser, einem SErF-(Stretched-pulse Erbium-doped Fiber)-Glasfaseroszillator, einem Pulsstreckler (*stretcher*), einem regenerativen Verstärker (*regenerative amplifier*), einem ORC-1000 frequenzverdoppelten Nd:YAG-Pump-Laser sowie einem Pulskompressor. Der CW-Strahl des Diodenlasers wird in den SErF-Glasfaseroszillator eingekoppelt, wodurch Besetzungsinversion erzeugt wird. Durch passive Modenkopplung werden Laserpulse erzeugt (Länge ca. 100 fs, Zentralwellenlänge 1550 nm, Repetitionsrate 35 MHz). Danach werden die Laserpulse zunächst mittels SHG in einem nichtlinearen Kristall frequenzverdoppelt und mittels des Pulsstreckers zeitlich verlängert. Die nun positiv gechirpten Pulse (1 kHz) bei 775 nm werden in den regenerativen Verstärker eingekoppelt. Bei diesem handelt es sich um einen Resonator mit einem Ti:Saphir-Kristall als aktivem Medium. Das aktive Medium wiederum wird von einem frequenzverdoppelten hochdruckbogenlampengepumpten Nd:YAG-Nanosekundenlaser optisch gepumpt. Durch mehrere Umläufe im Ti:Saphir-Resonator werden die Pulse verstärkt und schließlich mittels einer Pockels-Zelle ausgekoppelt. Abschließend werden die Pulse mittels des Kompressors wieder auf eine Pulsdauer von 150 fs verkürzt. Es können schließlich Pulse (1 kHz) bei 775 nm mit einer Pulsenergie von rund 800 μJ ausgekoppelt werden. Mittels eines Strahlteilers wird das so erzeugte Licht in zwei Stränge, einen Anreg- (*pump*) und einen Abtaststrahl (*probe*), aufgeteilt.

3.3.1.2 *Abtaststrahl*

Im Abtaststrahl wird ein Weißlichtkontinuum, sogenanntes Weißlicht (WL), erzeugt, welches den Spektralbereich von ca. 380 nm bis ca. 680 nm abdeckt. Dazu wird das Licht der Laserfundamentale (775 nm) in ein CaF₂-Fenster fokussiert. Das Weißlicht wird zum Probenort geleitet.

3.3.1.3 *Anregstrahl*

Das Licht im Anregstrahl trifft zunächst auf einen Beta-Barium-Borat-Kristall (β -BaB₂O₄, BBO). Hier wird die Frequenz des Lichts mittels SHG verdoppelt, was einer Wellenlänge von rund 388 nm entspricht. Das Licht passiert anschließend ein Chopperrad, welches jeden zweiten Puls blockiert, wodurch das typische Anreg-Abtast-Pulsschema entsteht.

Anschließend passiert das Anregungslicht eine variable mechanische Verzögerungsstrecke sowie ein $\lambda/2$ -Plättchen und wird anschließend auf die Probe fokussiert. Diese wird mit einer Pulsenergie von ≤ 120 nJ angeregt. Das $\lambda/2$ -Plättchen dreht die Polarisation des Anregungslichts in den sogenannten magischen Winkel (54,7°), wodurch Anisotropieeffekte bei der Messung verhindert werden. Nach dem Probendurchgang wird das Anregungslicht geblockt.

3.3.1.4 *Verzögerungsstrecke*

Die rechnergesteuerte Verzögerungsstrecke (M-531.PD, Physik Instrumente (PI), Karlsruhe) dient dazu, den Anregungspuls zeitlich relativ zum Abfragepuls systematisch verschieben zu können. Dies geschieht durch Wegstreckenänderung. Der Punkt an dem Anreg- und Abtaststrecke exakt gleich sind entspricht dem zeitlichen Nullpunkt des Experiments. Dementsprechend startet eine komplette Dynamikmessung (*scan*) üblicherweise etwas vor diesem Nullpunkt. Anschließend wird die Verzögerungsstrecke schrittweise verkürzt, wodurch der Anregungspuls zeitlich immer weiter vor den Abfragepuls geschoben wird. Üblicherweise werden hierbei 56 lineare Schritte à ca. 12 μ m (bzw. ca. 40 fs) sowie 50 exponentielle Schritte gemacht. Durch dieses kombinierte Aufnahmeverfahren ist es möglich, Dynamikinformationen vom Femto- bis hin zum Nanosekundenbereich zu erhalten, ohne dabei übermäßig lange Messzeiten investieren oder mit extrem großen Datenmengen arbeiten zu müssen.

3.3.1.5 *Probenort und Detektion*

Die beiden Strahlen werden am Probenort so justiert, dass sich der Anregungs- und der Abfragepuls räumlich und zeitlich (am zeitlichen Nullpunkt) überlagern. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der angeregte Bereich der Probe größer als der abgefragte Bereich ist. Die Überlagerung der Strahlen sowie deren Durchmesser müssen darüber hinaus unabhängig von der Verzögerung der Pulse zueinander sein. Dementsprechend müssen die Strahlen am Probenort möglichst perfekt kollimiert sein. Die Probe selbst befindet sich in einer 1 mm-Quarzabsorptionsküvette (21/Q/1, Starna GmbH). Um Mehrfachanregungen und schnelle Probendegradation auszuschließen, wird die Probe in der Küvette kontinuierlich in der Ebene senkrecht zum Anregungsstrahl bewegt. Nach dem Probendurchgang wird jeder Abfragepuls in einen Spektrographen (HR320, HORIBA, Kyoto, Japan) geleitet. Die Signale werden schließlich von einer Photodiodenzeile (128 Pixel), die mit einem Signalverarbeitungschip (S8865-128, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) kombiniert ist, sowie von einer Treiberschaltung (C9118, Hamamatsu Photonics) detektiert. Die Digitalisierung erfolgt mittels einer Analog-zu-Digital-Konverter-Karte (NI-PCI-6120, National Instruments, Austin, USA).

Die Steuerung des Messaufbaus und die Datenakquise erfolgen über ein LabVIEW-Programm (National Instruments, Austin, USA). Das Messprogramm zeichnet die Intensitäten aller eingehenden Weißlichtpulse inklusive des zugehörigen Zeitpunkts auf. Durch das Chopperschema wird dabei immer abwechselnd ein Spektrum der angeregten (I_{ex}) und der unangeregten (I_{block}) Probe gemessen. Das Programm korrigiert alle aufgezeichneten Daten um den Dunkelstrom, der vor der Messung aufgezeichnet wurde, und berechnet anschließend die Absorptionsänderung (ΔA). Die Messung erfolgt letztlich also mit einer Datenerfassungsrate von 500 Hz. Dies wiederum ermöglicht eine schnelle Wiederholung des Experiments, sodass jeder gespeicherte Datenpunkt üblicherweise aus jeweils mindestens 1500 Spektren der angeregten und 1500 Spektren der unangeregten Probe errechnet wird.

$$\Delta A(t, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t, \lambda)_{ex}}{I(t, \lambda)_{block}} \right) \quad \text{Formel 3.10}$$

Die daraus resultierenden Absorptionsänderungen werden als Einzelscans gespeichert. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis weiter zu verbessern, werden üblicherweise mehrere (ca. 20–100) dieser Einzelscans aufgezeichnet, um sie im Zuge der Datenanalyse mitteln zu können.

3.3.1.6 Auswertung

Die Auswertung der transienten Absorptionsmessungen erfolgte mittels der von Dr. Chavdar Slavov entwickelten Software OPTIMUS.¹⁷² Das Programm ermöglicht es, zunächst die Messdaten zu betrachten, zu mitteln und zu kombinieren. Außerdem ermöglicht es die Analyse des kohärenten Artefaktes. Die Hauptaufgabe des Programms besteht allerdings in der globalen Lebensdaueranalyse (*global lifetime analysis*, GLA), wobei auch die Instrumentenantwort simuliert sowie das kohärente Artefakt und die Dispersion (*chirp*) korrigiert werden. Bei der GLA werden die Messdaten $S(t)$ an ein Modell angepasst, welches der Summe aus mehreren (n) exponentiellen Funktionen entspricht:¹⁷²

$$S(t, \lambda_{exc}, \lambda_i) = \sum_{j=1}^n A_j(\tau, \lambda_{exc}, \lambda_i) \exp(-t/\tau_j) \quad \text{Formel 3.11}$$

Dabei beschreiben τ_j die Lebensdauer und A_j die präexponentiellen Vorfaktoren. Während sich die Lebensdauern τ_j auf den kompletten Datensatz, also das komplette detektierte Spektrum, beziehen, sind die Amplituden A_j jeweils einer Transiente bzw. einer Detektionswellenlänge λ_j zugeordnet. Dementsprechend erhält man aus der GLA sogenannte zerfallsassoziierte Spektren (*decay-associated spectra*, DAS). In diesen Spektren sind die Amplituden für jede Lebensdauer gegen die Detektionswellenlänge λ_j aufgetragen.¹⁷²

Das Modell wird darüber hinaus mit einer idealisierten Instrumentenantwortfunktion (*instrument response function*, IRF) iterativ gefaltet, wobei hier die IRF nicht gemessen, sondern im Laufe der Fitprozedur simuliert wird. Die Breite der schließlich angepassten IRF kann benutzt werden, um die Zeitaufauflösung des Experiments abzuschätzen.¹⁷² Die Wellenlängenabhängigkeit des Zeitnullpunkts der Messung (*chirp*) wird durch Gruppengeschwindigkeitsdispersion sowie Selbstphasenmodulation des Abtastpulses hervorgerufen. Dieser Effekt wird durch ein Polynom angepasst und so korrigiert.¹⁷² Durch temporäre Änderungen im Brechungsindex der Probe, wie u.a. durch Kreuzphasenmodulation, kann es zu einem sogenannten kohärenten Artefakt am Zeitnullpunkt der Messung kommen. Dieses Artefakt kann mit einem Modell aus Gaußfunktionen und deren ersten und zweiten Ableitungen angepasst und so korrigiert werden.¹⁷² Die korrigierten, gemittelten und gefitteten Messdaten können im Anschluss an die Fitprozedur visualisiert und in verschiedenen Formaten exportiert werden.

3.3.2 Fluoreszenzlebensdauermessungen

Zur Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern wurde eine Anlage zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (*time-correlated single photon counting*, TCSPC) verwendet (Abbildung 3.6). Dabei wird im Prinzip die Zeit zwischen Anregung der Probe (*start*) und dem ersten Auftreffen eines Photons auf einem Detektor (*stop*) gemessen. Dieses Einzelexperiment wird sehr häufig wiederholt und die Zählereignisse (*counts*) gegen den entsprechenden Zeitpunkt nach der Anregung in ein Histogramm eingetragen. Dadurch entsteht eine Fluoreszenzzerfallskurve, die allerdings mit der Instrumentenantwortfunktion (*instrument response function*, IRF) gefaltet ist.

Die entsprechende Anlage besteht zu diesem Zweck im Wesentlichen aus einer Anregungslichtquelle, einem Probenhalter, einem Einzelphotonendetektor und einer sogenannten Zählkarte zur Datenverarbeitung. Allerdings können als Anregungsquelle entweder ein Lasersystem oder gepulste UV-LEDs verwendet werden.

Bei dem Lasersystem handelt es sich um einen modengekoppelten Titan-dotierten (Ti:Sa) Laser (Tsunami 3941-X3BB, Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland), welcher wiederum von einem 10 W CW-diodengepumpten Festkörperlaser (Millennia eV, Spectra-Physics, 532 nm) gepumpt wird (Abbildung 3.6a).

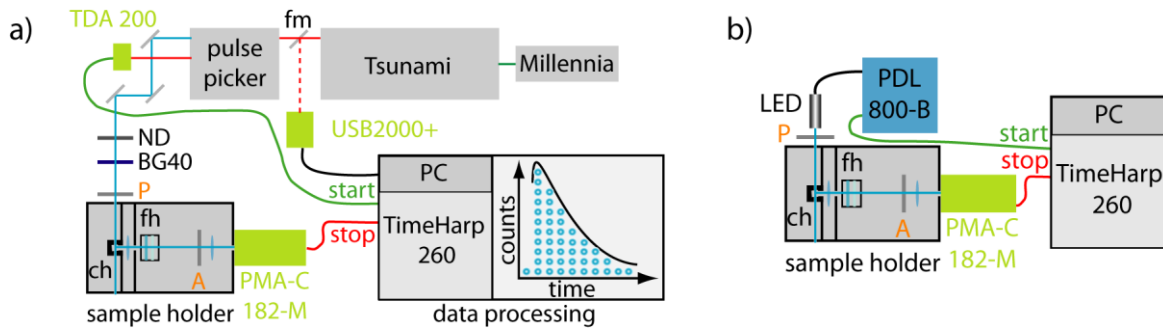


Abbildung 3.6. Schemazeichnungen des TCSPC-Aufbaus mit a) Lasersystem oder b) gepulsten LEDs als Anregungsquelle. fm=Klappspiegel, ND=Neutraldichtefilter, P=Polarisator, A=Analysator, ch=Probenhalter, fh=Filterhalter.

Der Durchstimmbereich der Emissionswellenlänge des Tsunami-Lasers ist durch das Lasermedium Ti:Sa gegeben und liegt zwischen ungefähr 700 nm und 1100 nm bei 80 MHz. Hierbei ist darauf zu achten, dass speziell am Rand des Durchstimmbereichs eventuell nur sehr geringe Intensitäten emittiert werden und es zu Problemen mit der Stabilität kommen kann. Beides kann speziell im langwelligen Spektralbereich (ab 900 nm) durch kontinuierliche Spülung des Lasers mit trockener Luft oder gasförmigem Stickstoff entscheidend optimiert werden. Zur Kontrolle der Emissionswellenlänge kann die ausgekoppelte Strahlung über einen Klappspiegel auf ein Faserspektrometer (USB2000+, Ocean Optics, Largo, USA) geleitet werden.

Ist die Emissionswellenlänge (z.B. 775 nm) korrekt eingestellt, werden die ausgekoppelten Laserpulse in einen Pulspicker und Frequenzverdoppler (*frequency doubler and pulse selector*, Model 3980, Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland) geleitet. Hier kann die Pulsfrequenz mittels eines akustooptischen Modulators (AOM) reduziert (z.B. auf 8 MHz) und anschließend die Anregungswellenlänge mittels SHG in einem BBO-Kristall frequenzverdoppelt (z.B. 388 nm) werden. Dadurch entstehen letztendlich Anregungspulse mit einer Energie im Bereich von 0,1 nJ und einer Puls-Halbwertsbreite (FWHM) von rund 200 ps. Nach Durchgang eines BG40-Filters (Schott AG, Mainz, Deutschland) wird das Anregungslicht schließlich auf die Probe fokussiert. Der Filter unterdrückt restliches Streulicht aus der Laserfundamentalen des Tsunami-Lasers. Die nicht frequenzverdoppelte Fundamentale fällt auf eine schnelle Photodiode (TDA 200, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland). Das Signal der Photodiode wird als Start-Signal für das TCSPC-Experiment benutzt.

Das Lasersystem eignet sich nicht für eine Anregung im UV-Bereich, die kurzwelliger als 350 nm ist. Um diesen Spektralbereich trotzdem abzudecken, können verschiedene gepulste UV-LEDs (PLS 310, PLS 320, PLS 340-10, PLS360; PicoQuant GmbH) als alternative Anregungsquelle verwendet werden (Abbildung 3.6b). Die UV-LEDs werden dazu von einem Diodentreiber (PDL 800-B, PicoQuant GmbH) angesteuert. Die Pulse der UV-LEDs weisen je nach Typ eine Halbwertsbreite (FWHM) von 500 ps bis 800 ps und eine Pulsenergie von $\leq 0,12$ pJ auf. Der Diodentreiber ermöglicht die Einstellung der Repetitionsrate sowie der Anregungsenergie. Das Start-Signal des Experiments wird dementsprechend direkt vom Diodentreiber zur Zählkarte geschickt. Die UV-LEDs können in einen Halter direkt vor dem Probenhalter arretiert werden. Dementsprechend fällt das gepulste LED-Licht direkt auf die Probe.

Die Probe befindet sich in einer 10 mm x 4 mm Quarzküvette (UV-durchlässig, 29-F/Q/10, Starna GmbH) in einem temperierten Probenhalter. Die Anregung erfolgt entlang der längeren Küvettenachse. Das über die kürzere Küvettenachse emittierte Licht fällt auf den Detektor. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass beim TCSPC-Aufbau absichtlich keine 90°-Geometrie zwischen Anregung und Detektion gewählt wurde. Die Küvette ist minimal zur Anregungsrichtung verdreht. Außerdem ist der Probenhalter in drei Kammern unterteilt, wobei die Trennwände ebenfalls keinen perfekten 90°-Winkel zueinander aufweisen. Außerdem ermöglicht der Probenhalter die Befestigung von Filtern (z.B. GG395, GG400, Schott AG). All dies dient der Abschirmung des Detektors vor ungewolltem Streulicht aus der Anregung.

Als Detektionssystem dient ein Photoelektronenvervielfacher (*photomultiplier tube*, PMT, PMA-C 182-M, PicoQuant GmbH), der von einer TimeHarp 260 PICO Single PCIe Zählkarte (PicoQuant GmbH) ausgelesen wird. Die Detektion des ersten Photons nach Erhalt des Start-Signals wird als Stopp-Signal an die Zählkarte weitergegeben. Die minimale elektronische Kanalbreite der Zählkarte beträgt 25 ps.

Das Einzelexperiment wird sehr häufig wiederholt, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie eine gute Zählstatistik zu bekommen. Als Daumenregel versucht man, 40000-70000 Zählereignisse im am stärksten gefüllten Kanal zu haben. Das heißt, die Anzahl der detektierten Zählereignisse bestimmt letztendlich die Dauer

eines kompletten Experiments. Generell ist dabei allerdings darauf zu achten, dass nicht zu viele Zählereignisse pro Zeit am Detektor auftreffen, da es sonst zu einem Stapel-effekt (*pile-up*) kommen kann: Aufgrund der Totzeit des Detektors nach der Detektion eines Photons werden bei hohen Zählraten „frühe“ Photonen nach der Anregung überrepräsentiert. Um diesen Effekt zu verhindern, sollte die Anzahl der Zählereignisse ungefähr nur 1% der Anregungsrate betragen.

Wie oben erwähnt wurde, sind die Fluoreszenzzerfälle mit der IRF gefaltet. Um nun die Fluoreszenzlebensdauern bestimmen zu können, muss die IRF separat bestimmt werden. Dazu muss zu jeder Fluoreszenzzerfallskurve unter exakt gleichen Einstellungen eine Streulichtprobe gemessen werden. Dabei handelt es sich üblicherweise um eine sehr stark verdünnte Titandioxid-(TiO₂)-Suspension in Ethanol. Zur Messung der Streuprobe müssen natürlich die Anregungslichtfilter im Probenhalter entfernt werden. Die dabei aufgezeichnete Anzahl der Zählereignisse im Hauptkanal der IRF-Messung sollte der Anzahl der Zählereignisse in der eigentlichen Messung in etwa entsprechen.

Mittels des Auswerteprogramms FluoFit Pro 4.6 (PicoQuant GmbH) ist es möglich, die Messdaten (multi-) exponentiell anzupassen. Dabei wird die IRF mit einer oder mehreren exponentiellen Funktionen gefaltet, man spricht hier von Rekonvolution. Dann werden die Parameter der exponentiellen Funktion so lange verändert bis die Differenz zwischen Anpassung (Fit) und Messdaten minimal ist. Als Maß hierfür wird vor allem der Chi-Quadrat-Wert eingesetzt. Je näher der Chi-Quadrat-Wert an eins heranlangt, umso besser ist üblicherweise die Anpassung. Wobei dies mit einer möglichst kleinen Anzahl an exponentiellen Funktionen erreicht werden soll (*Ockham's razor*, Sparsamkeitsprinzip).

Als Ergebnis der Anpassung erhält man die Zerfallskomponenten (τ_i , in ns) inklusive ihrer Amplituden (A_i , in Zählereignissen). Zur Erleichterung der Interpretation werden die Amplituden der positiven Zerfallskomponenten in Prozent der Gesamtzählereignisse umgerechnet. Außerdem kann aus den einzelnen Komponenten auch eine sogenannte mittlere, intensitätsgewichtete, Fluoreszenzlebensdauer (τ_{av}) berechnet werden:

$$\tau_{av} = \frac{\sum_i A_i \tau_i^2}{\sum_i A_i \tau_i} \quad \text{Formel 3.12}$$

Zur Darstellung der Fluoreszenzzerfälle werden diese üblicherweise untergrundkorrigiert und nullpunktkorrigiert sowie normiert. Zur Nullpunktkorrektur wird das Intensitätsmaximum der IRF bestimmt und der entsprechende Kanal als zeitlicher Nullpunkt gesetzt. Zur Untergrundkorrektur werden die Zählereignisse vor dem Anregungsereignis (*darkcounts*, Dunkelzählungen) gemittelt und der Mittelwert von allen anderen Kanälen abgezogen.

3.3.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie

Durch minimale Modifikationen der oben beschriebenen Anlage zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung war es möglich, zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie zu messen, wobei das Messprinzip sich grundsätzlich nicht von dem oben beschriebenen Verfahren für statische Anisotropiemessungen unterscheidet (Abbildung 3.6). Auch hier müssen prinzipiell vier Messungen bei unterschiedlichen Polarisationsfiltereinstellungen gemessen werden. Alle anderen Messbedingungen sollten dabei so konstant wie möglich gehalten werden. Da allerdings vor dem Einzelphotonendetektor kein Monochromator o.Ä. verbaut ist, ist dessen Empfindlichkeit unabhängig von der Polarisation des detektierten Lichts. Dementsprechend kann der Gerätefaktor, im Rahmen der Genauigkeit der Messung, generell als eins angenommen werden. Dies reduziert die Anzahl der notwendigen Messungen auf zwei (I_{VV} und I_{VH}).

Im Fall der Anregung mit dem Lasersystem ist zu beachten, dass das Laserlicht, welches den Pulspicker verlässt, parallel zur Oberfläche des optischen Tisches polarisiert ist. Dementsprechend muss die Polarisation des Anregungslichts mittels eines $\lambda/2$ -Plättchens um 90° gedreht werden, welches in den Anregungsstrahl zwischen Pulspicker und Probenhalter eingebaut wird. Die Polarisation kann mittels eines variablen Polarisationsfilters vor dem Probenhalter überprüft werden. Ein eigentlicher Polarisator ist vor der Probe nicht nötig, da schon das Anregungslicht polarisiert ist. Als Analysator muss allerdings noch ein Polarisationsfilter hinter der Probe in den Probenhalter eingebaut werden. Soll die Anregung über gepulste LEDs erfolgen, sind sowohl ein Polarisator als auch ein Analysator im Aufbau nötig. Der Polarisator wird dazu zwischen LED und Probenhalter befestigt. Beide Polarisationsfilter sind nicht motorisiert und müssen daher per Hand in die gewünschten Positionen gedreht

werden. Dies muss mit möglichst großer Sorgfalt geschehen, um Messfehler und Ungenauigkeiten zu minimieren.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Messung der Fluoreszenzlebensdauer wird hier nicht versucht für beide Messungen möglichst gleich viele Zählereignisse zu registrieren. Vielmehr muss im Fall der beiden Messungen für I_{VV} und I_{VH} die exakt gleiche Messzeit eingehalten werden. Außerdem ist die Energiestabilität der Anregungsquelle besonders wichtig. Bei der Nutzung des Lasersystems als Anregungsquelle sind leichte Schwankungen der Anregungsenergie weitaus häufiger als bei der Nutzung der gepulsten LEDs. Dementsprechend ist die Nutzung der LEDs dem Lasersystem im Fall von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen vorzuziehen.

Zur Auswertung werden beide Zerfälle untergrundkorrigiert. Anschließend wird für jeden Zeitpunkt bzw. Kanal die Anisotropie (r) nach Formel 3.9 berechnet. Die daraus resultierende Anisotropiezerfallskurve kann im Anschluss exponentiell angepasst werden (z.B. mittels OriginPro 2016G, OriginLab Corporation, Northampton, USA):

$$r(t) = r_{inf} + \sum_j r_0 e^{-t/\theta_j} \quad \text{Formel 3.13}$$

Hierbei beschreibt θ_j die Rotationskorrelationszeit, r_0 die Ausgangsanisotropie und r_{inf} einen möglichen Untergrund.^{148,149}

3.3.4 Phosphoreszenzlebensdauermessungen

Zur Messung von statischen Phosphoreszenzspektren sowie zur Messung von Phosphoreszenzlebensdauern wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Phosphoreszenzspektrometer gebaut (Abbildung 3.7a). Der Aufbau besteht im Wesentlichen aus einer CW-LED als Anregungsquelle, einem Zerkhackerrad (*chopper*), einem Kryostaten inklusive Probenhalter sowie einem Czerny-Turner-Monochromator mit angeschlossenem Photoelektronenvervielfacher (*photomultiplier tube*, PMT) als Detektionseinheit.

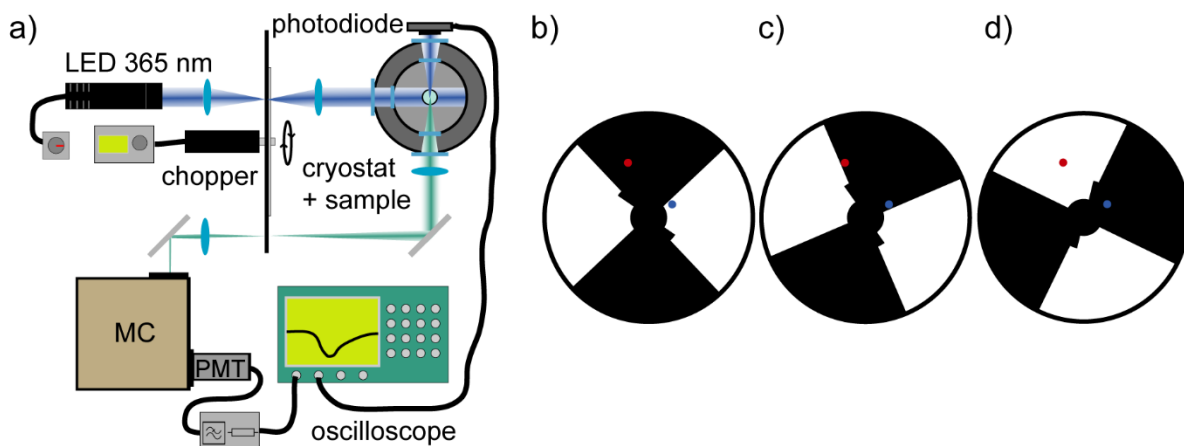


Abbildung 3.7. a) Schemazeichnung des Phosphoreszenzspektrometers. b–d) Modifiziertes Chopperrad in drei beispielhaften Stellungen in Relation zum Anregungs- (blauer Punkt) und Emissionsstrahlengang (roter Punkt).

Für die hier gezeigten Messungen wurde eine 365 nm CW-LED (M365L2, Thorlabs, Newton, USA) verwendet. Mittels eines modifizierten Choppers (MC200-EC, Thorlabs) wird aus der CW-Anregung eine gepulste Anregung mit einer einstellbaren Repetitionsrate erzeugt. Die Repetitionsrate betrug im Falle der hier gezeigten Messungen 0,5 Hz. Das gepulste Anregungslicht wird anschließend auf die gefrorene Probe (ca. 77K) im Inneren eines Kryostaten (DN1704, Oxford Instruments, Abingdon, UK) fokussiert. Als Küvette dient hierbei ein gekürztes NMR-Röhrchen aus Quarzglas (qtz300-5-7, Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland), welches am Probenhalter des Kryostaten befestigt ist. Das emittierte Licht wird in einem 90°-Winkel zur Anregung aufgesammelt und erneut durch den Chopper geschickt. Eine genaue Abstimmung des Choppers sowie die Modifikation des Chopperrades (Abbildung 3.7b) ermöglichen dabei das Blockieren des Streulichts der Anregung sowie des Fluoreszenzlichts, sodass ausschließlich das sozusagen verzögerte Licht aus der Phosphoreszenz den Detektor erreichen kann. Dies wird durch weitere Emissionsfilter (GG400, GG420, Schott AG, Mainz, Deutschland) zusätzlich abgesichert. Nach dem Chopperdurchgang wird das Emissionslicht in einen Czerny-Turner-Monochromator geleitet und auf

eine PMT (H10721-01, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) fokussiert. Der Monochromator ermöglicht dabei eine weitere spektrale Aufteilung des Emissionssignals. Das PMT-Signal kann anschließend mittels eines 1 GHz-Digitalspeicheroszilloskops (TDS 5104, Tektronix, Beaverton, USA) digitalisiert und gespeichert werden. Die Datenaufzeichnung wird dabei durch das Anregungsstreulicht gestartet (*trigger*), welches mittels einer Hochgeschwindigkeitsphotodiode (DET10A/M, Thorlabs) aufgezeichnet werden kann.

Für jede der hier gezeigten Phosphoreszenztransienten wurden mindestens 100 Anregungszyklen durch das Oszilloskop gemittelt. Die weitere Datenverarbeitung und Auswertung, wie z.B. das exponentielle Anpassen der Transienten, erfolgte dann mittels OriginPro 2016G (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Durch Kombination der einzelnen Transienten bei verschiedenen Detektionswellenlängen ist es außerdem möglich, Transientenkarten zusammenzustellen oder auch statische Phosphoreszenzspektren zu erhalten.

Je nach Justage bzw. Form des Chopperrades können mit dieser Anlage auch Tieftemperaturfluoreszenzmessungen durchgeführt werden.ⁿ Durch die Drehgeschwindigkeit des Chopperrades kann außerdem der beobachtete Zeitbereich bzw. die Wiederholfrequenz des Experiments eingestellt werden. Darüber hinaus muss der als Probenhalter dienende Kryostat nicht unbedingt bei der sogenannten Basistemperatur von ca. 77 K betrieben werden. Auch höhere Temperaturen, selbst leicht oberhalb der Raumtemperatur, können mit hinreichender Genauigkeit angesteuert und konstant gehalten werden. So kann üblicherweise mittels Temperaturerhöhung überprüft werden, ob es sich bei dem detektierten Signal tatsächlich um Phosphoreszenz handelt.

3.3.5 Fluoreszenz-Stopped-Flow

Zeitaufgelöste Mischexperimente wurden mittels einer mobilen Stopped-Flow-Anlage (SFM-20, Bio-Logic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, Frankreich) vorgenommen, die mit verschiedenen Detektionssystemen kombiniert werden kann. Hier wird allerdings nur die Kopplung mit einem JASCO FP 8500 Fluoreszenzspektrometer beschrieben (Abbildung 3.8a, b). Die Anlage besteht aus zwei motorisierten Spritzen (Hamilton 1010C, Hamilton Company, Reno, USA), die über eine Mikroprozessoreinheit (MPS-60, Bio-Logic Science Instruments) angesteuert und mittels der Software Bio-Kine 32 (Version 4.42, Bio-Logic Science Instruments) bedient werden. Mithilfe der Spritzen können sehr volumengenau und schnell zwei Probelösungen in eine Fluoreszenzküvette (FC08, Bio-Logic Science Instruments) eingespritzt werden. Um dabei eine optimale Durchmischung gewährleisten zu können, ist der Küvette ein Berger-Ball-Mischer vorgeschaltet, in welchem der eigentliche Mischprozess stattfindet (Abbildung 3.8c). Ein sogenanntes Hard-Stop-Ventil hinter der Küvette sorgt für einen zeitlich genauen Abschluss des Mischprozesses. Bei den hier gezeigten Mischexperimenten wurden je Spritze 33 µl Probe innerhalb von 9,5 ms im Berger-Ball-Mischer durchgemischt. Dies entsprach einer Flussrate von 6,95 ml/s.

ⁿ Zur Justage der Anlage eignen sich z.B. verdünnte Benzophenon-Lösungen, da Benzophenon eine sehr hohe Phosphoreszenzquantenausbeute aufweist.

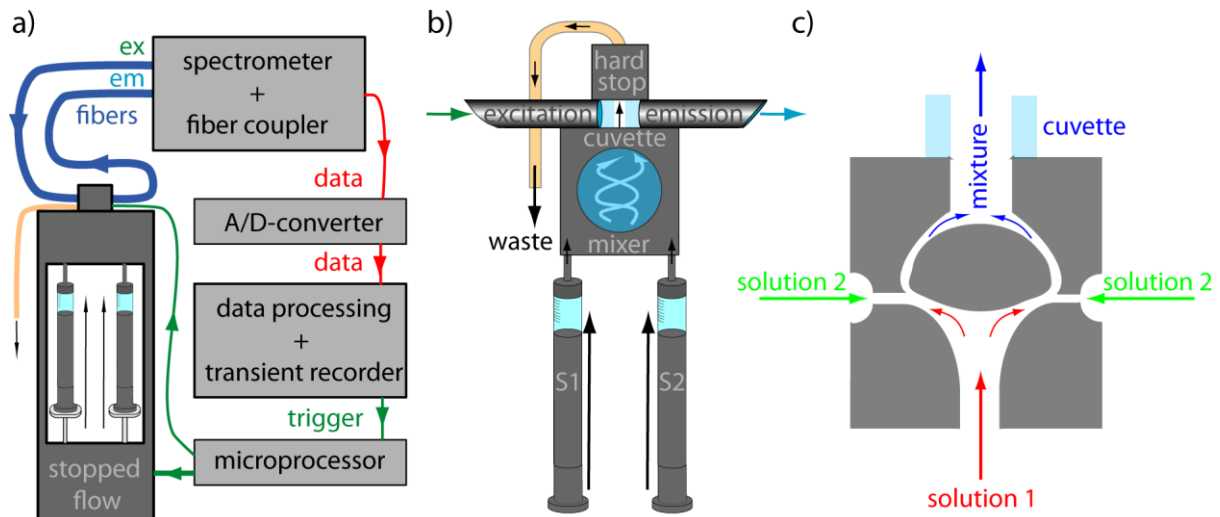


Abbildung 3.8. Schemazeichnungen a) des gesamten Stopped-Flow-Messaufbaus, b) der eigentlichen Mischapparatur und c) des Berger-Ball-Mischers.

Als Anregungsquelle und Detektor wird das JASCO FP 8500 Fluoreszenzspektrometer verwendet. Zu diesem Zweck wird es mittels eines Faserkopplers (OBF-832, JASCO) mit der Stopped-Flow-Apparatur verbunden. Bei den hier gezeigten Experimenten wurde die Probe mit Licht bei 360 nm (Schlitzbreite 10 nm) angeregt und die resultierende Fluoreszenz bei 460 nm (Schlitzbreite 20 nm) unter einem Winkel von 90° zur Anregung detektiert. Das Signal des PMT-Detektors (Spannung 580 V) des FP 8500 wurde direkt abgegriffen und mittels eines Analog-zu-Digital-Konverters (A/D-Wandler; BNC-2110, National Instruments, Austin, USA) sowie eines Transientenrekorders (PCI-6052E, National Instruments) digitalisiert. Die Datenakquisition wird dabei ebenfalls mittels Bio-Kine 32 gesteuert. Die hier gezeigten Transienten wurden mit 6000 äquidistanten Punkten mit einem Abstand von 10 μs digitalisiert. Insgesamt wurden 8000 Punkte aufgezeichnet, wobei zu den 6000 Punkten à 10 μs Abstand noch 1500 Punkte à 50 μs Abstand sowie 500 Punkte à 500 μs Abstand digitalisiert wurden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Konzentrationsabhängigkeitsstudien wurden fluoreszenzmarkierte Aptamerproben (ζ_m^{f6} 2,7 μM bzw. ζ_m^{f8} 4 μM) mit einer Ligandenlösung gemischt. Dabei wurden verschiedene Ligandenkonzentrationen (0 μM bis 40 μM) verwendet. Für jede Ligandenkonzentration wurde das Mischexperiment mindestens 20-mal wiederholt und die Einzeltransienten abschließend gemittelt. Vor der weiteren Auswertung wurden die gemittelten Transienten einer Untergrundkorrektur unterworfen. Dabei wurde die Ausgangsfluoreszenz des markierten Aptamers (also ohne Ligand) von den gemittelten Daten subtrahiert. Außerdem wurde das Schließen des Hard-Stop-Ventils als Ende der Mischung und zeitlicher Nullpunkt der Messung gesetzt.

Die so korrigierten Transienten können anschließend in das Auswerteprogramm Dynafit4 (Biokin Ltd., Watertown, USA) eingeladen werden.^{173,174} Mittels Dynafit4 ist es möglich, verschiedenste Reaktionsmodelle für eine Ligandenbindung zur Beschreibung der Daten zu testen. Aufgrund der entsprechenden Fitergebnisse ist es dann möglich, sich für ein Modell zu entscheiden und die entsprechenden Reaktionskonstanten zu bestimmen. Bei der Anpassung wird folgende Anpassungsfunktion für jeden individuellen Datensatz verwendet:^{173,174}

$$S(t) = S_0 + \sum_{i=1}^n r_i c_i(t) \quad \text{Formel 3.14}$$

Dementsprechend sind für die Anpassung, neben dem Reaktionsschema des jeweiligen Modells und den gemessenen Transienten ($S(t)$), der Signaloffset (S_0), die Anzahl der beteiligten Spezies (n) sowie die molare Reaktion (*response*, r_i) der jeweiligen Spezies ausschlaggebend. Bei der Anpassung wird die Differenz zwischen Daten und Fit über die nichtlineare Methode der kleinsten Quadrate (*non-linear least squares methode*) minimiert. Die Konzentration der Spezies (c_i) zum Zeitpunkt t wird dabei ausgehend von den Startkonzentrationen (c_0) berechnet. Dazu löst das Programm numerisch ein Anfangswertproblem, das durch ein System von gewöhnlichen Differentialgleichungen erster Ordnung (ODEs) definiert ist.^{173,174}

Die Anpassung gibt dann die jeweiligen Ratenkonstanten der Teilreaktionen sowie die Response der entstehenden Spezies aus. Ausschlaggebendes Kriterium für die Qualität der Anpassungen von verschiedenen

Reaktionsmodellen ist das Akaike-Informationskriterium (AIC). Der AIC-Wert berechnet sich nach folgender Gleichung:¹⁷³⁻¹⁷⁵

$$AIC = -\log S + 2n_p + \frac{2n_p(n_p + 1)}{n_D - n_p - 1} \quad \text{Formel 3.15}$$

Hierbei steht S für die Summe der Quadrate zwischen Anpassung (*fit*) und Daten, n_p für die Anzahl der angepassten Parameter und n_D für die Anzahl experimenteller Punkte. Dementsprechend beschreibt ein Modell die Daten umso besser, je kleiner der AIC-Wert ist. Hierbei berücksichtigt das AIC sowohl die Güte der Anpassung (S) als auch die Anzahl der verwendeten Parameter (n_p). Dadurch kann eine Überanpassung mit zu vielen Parametern verhindert werden, bzw. die Güte von verschiedenen Modellen mit einer unterschiedlichen Anzahl an Anpassungsparametern direkt verglichen werden. Statt des AIC-Werts wird üblicherweise die Differenz (ΔAIC) zwischen dem betrachteten Modell und dem kleinsten ermittelten AIC-Wert angegeben. Das beste Modell zeichnet sich dementsprechend durch $\Delta AIC=0$ aus.^{173,174}

3.4 Cryotrapping

Mithilfe eines selbstgebauten UV/vis-Tieftemperaturabsorptionsspektrometers (auch Kryoabsorptionsspektrometer, siehe Kapitel 3.2.5) wurden im Rahmen dieser Arbeit sogenannte Cryotrappingexperimente an Retinalproteinen durchgeführt. Unter Cryotrapping wird in diesem Zusammenhang die Präparation von verschiedenen Zwischenzuständen der entsprechenden Proteinphotozyklen verstanden. Bei dieser Präparation werden die Proteine unterschiedlichen Belichtungsprotokollen unterworfen. Durch Abkühlung der Proben ist es dabei möglich, einzelne Intermediate zu akkumulieren. Die Proteine werden also in den jeweiligen Zwischenzuständen eingefroren. Dadurch ist es möglich, auch sehr kurzlebige Intermediate spektroskopisch zu untersuchen.

Die Optimierung dieser Methode ist Teil des Ergebniskapitels dieser Arbeit. Deshalb sei neben den in der Folge beschriebenen Verfahren und Methoden auch auf das Ergebniskapitel (siehe Kapitel 4.3.1) verwiesen. Dort sind weitere Details zur Cryotrappingmethode beschrieben. Außerdem werden dort die Vor- und Nachteile verschiedener Präparations- und Messverfahren diskutiert.

3.4.1 Messung eines Dunkelspektrums

Für jede Kryoabsorptionmessung musste zunächst ein unbelichtetes Spektrum der Probe aufgezeichnet werden. Dieses Grundzustandsspektrum wird auch Dunkelspektrum genannt und dient als Referenzspektrum für die Differenzspektroskopie. Zur Aufzeichnung des Dunkelspektrums wurde die Probe zunächst für mindestens zehn Minuten vor Licht abgeschirmt und dann im Dunkeln mittels eines Kryostaten auf 77 K heruntergekühlt. Im Kryostaten wurde die Probe im Anschluss so gedreht, dass ein minimaler Streuuntergrund bei der Absorptionmessung entstand. Üblicherweise musste die Probe dazu in einem Winkel von 45° bis 70° zum Messlicht stehen. Bei der anschließenden Messung der Probenabsorption wurde darauf geachtet, aktinische Effekte zu minimieren. Entsprechend wurde das Messlicht für maximal 5 s auf die Probe geleitet. Es wurde bei den Absorptionmessungen also auf längere Akkumulationszeiten verzichtet.

3.4.2 Belichtungsmethoden

Abhängig von der Probe und der jeweiligen Fragestellung wurden unterschiedliche Belichtungsmethoden eingesetzt, die hier kurz erläutert werden sollen.

3.4.2.1 *Belichtung bei Raumtemperatur*

Bei der Belichtung bei Raumtemperatur wurde die Probe für fünf Minuten mittels einer LED (530 nm, M530L3, Thorlabs, Austin, USA) beleuchtet. Anschließend wurde die Probe, weiterhin unter konstanter Beleuchtung, auf 77 K heruntergekühlt.

3.4.2.2 *Belichtung bei 77 K*

Zur Belichtung bei 77 K wurde die Probe zunächst auf 77 K heruntergekühlt. Zur Belichtung wurde anschließend ein Laser (532 nm, GLP-III-532-50, Roithner Lasertechnik GmbH, Wien, Österreich) verwendet.^o Die Belichtung erfolgte zweimal für je 20 s, mit einer Pause von ebenfalls 20 s.^p

3.4.2.3 *Blue light quenching*

Für die *blue light quenching*-Experimente (BLQ) wurde die Probe zunächst, wie oben beschrieben, bei Raumtemperatur belichtet. Anschließend wurde die Probe bei 77 K mittels eines blauen Lasers (405 nm, GLP-III-405-50, Roithner Lasertechnik GmbH) für 20 s belichtet.

^o Mittels einer LED (530 nm, M530L3, Thorlabs, Austin, USA) war keine ausreichende Akkumulation von Photoprodukten zu erreichen.

^p Die Unterbrechung der Belichtung ist nötig, um den Laser vor thermischer Beschädigung zu schützen.

3.4.3 Temperaturexperimente

Nach erfolgreicher Präparation bzw. Akkumulation eines Photointermediats und der Aufzeichnung eines Dark- und eines Lightspektrums können verschiedene Temperaturexperimente durchgeführt werden.

3.4.3.1 *Sequenzieller Temperaturverlauf*

Bei den im Rahmen dieser Arbeit als sequenzielle Temperaturverlaufsmessungen bezeichneten Experimenten wird die Probe ausgehend von 77 K schrittweise aufgetaut. Üblicherweise wurde dabei in 20 K Schritten vorgegangen, sodass Messpunkte bei 100 K, 120 K, 140 K, 160 K sowie 180 K entstanden. Jede dieser Zieltemperaturen wurde zunächst für rund zehn Minuten konstant gehalten, sodass sich die Probe auf dieser Temperatur equilibrieren konnte. Dadurch konnten auch Hystereseeffekte ausgeschlossen werden. Zur Absorptionsmessung wurde die Probe nach jedem Temperaturschritt wieder auf 77 K heruntergekühlt. Dieses Verfahren sorgt unter anderem für eine höhere Vergleichbarkeit des Streuhintergrunds.

3.4.3.2 *Kontinuierlicher Temperaturverlauf*

Als kontinuierliche Temperaturverlaufsmessungen werden hier Experimente bezeichnet, bei denen die Probe, ausgehend von 77 K, kontinuierlich aufgetaut wird. Mittels der Sweep-Funktion der Temperaturkontrolleinheit (ITC 503) des Kryoabsorptionsspektrometers wurde dazu ein konstanter Temperaturgradient von 2 K pro Minute verwirklicht. Ausgehend von 77 K wurde so die Probe auf 290 K aufgeheizt. In einem Abstand von 10 K wurden dabei Probenspektren aufgezeichnet. Trotz relativ langsamer Heizrate können bei dieser Methode Hystereseeffekte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Grund dafür ist auch, dass die Messung nicht automatisch vorgenommen wurde bzw. nicht direkt von der Temperaturkontrolleinheit gesteuert werden konnte.

3.4.3.3 *Zeitverlauf bei konstanter Temperatur*

Bei diesem Experiment wurde die Temperatur der Probe konstant gehalten und in regelmäßigen Abständen Absorptionsspektren aufgezeichnet. Dabei wurde darauf geachtet, dass es nicht zu aktinischen Effekten durch das Messlicht kommt. Entsprechend wurde die eigentliche Mess- bzw. Integrationszeit pro Messpunkt möglichst kurz gewählt.

3.4.4 Datenkorrektur und Auswertung

Die Kryoabsorptionsspektren mussten einem gesonderten Korrektur- und Auswerteverfahren unterworfen werden. Der kritischste Punkt dabei ist die Offset- und Streulichtkorrektur der Spektren. Dieser Korrekturschritt war nötig, da sich der Streuhintergrund üblicherweise von Messung zu Messung leicht veränderte. Dies kann an Veränderungen der Probe, z.B. bei verschiedenen Temperaturen, oder an leichten Lampen- oder Detektordrifts liegen. Als robuste Korrekturmethode hat sich die Anpassung mittels einer exponentiellen Zerfallsfunktion erwiesen. Dabei war es allerdings nötig, manuell Stützpunkte der Funktion festzulegen. Hierbei musste, wie bei allen Korrekturmethode, mit Bedacht vorgegangen werden, um die Aussage der Daten nicht zu beeinflussen. Allerdings mussten dabei teilweise Artefakte in Kauf genommen werden. So zeigen Retinalproteinen im Spektralbereich um 310 nm üblicherweise eine Absorption. Dieser Bereich musste allerdings bei den hier gezeigten Korrekturen künstlich auf null gesetzt werden, da der individuelle Streuuntergrund in diesem Bereich nicht abgeschätzt werden konnte. Die im Ergebniskapitel (Kapitel 4.3) gezeigten Absolutspektren sind deshalb tendenziell überkorrigiert. Dies war allerdings nötig um eine einheitliche und klare Differenzbildung zu ermöglichen.

Zur Berechnung der Differenzspektren wurde üblicherweise das korrigierte Dunkelspektrum von den Spektren der belichteten Probe abgezogen. Das Dunkelspektrum diente hier als Referenz. Bei den *blue light-quenching*-Experimenten wurde dagegen ein Spektrum der mit Licht bei 530 nm belichteten Probe (M-Intermediat) als Referenz abgezogen.

3.5 Probenpräparation

Alle der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wurden von verschiedenen Kooperationspartnern synthetisiert bzw. hergestellt oder käuflich erworben. Dementsprechend werden diese Prozesse hier nicht im Detail erläutert. Vielmehr beschäftigen sich die folgenden Unterkapitel mit der Präparation der Proben in Vorbereitung der spektroskopischen Untersuchungen. Hier soll vor allem auf Größen wie beispielsweise Probenkonzentration, Lösungsmittel und pH-Wert eingegangen werden, insofern dies nicht schon weiter oben, im entsprechenden Methodenkapitel, näher spezifiziert wurde.

3.5.1 RNase-freies Arbeiten

Bei allen Arbeiten mit RNA-Proben wurde penibel darauf geachtet, dass die Proben nicht mit Ribonukleasen (RNasen) kontaminiert wurden.¹⁷⁶ Bei RNasen handelt es sich um Enzyme, die die RNA-Hydrolyse katalysieren. Um also eine Probendegradation durch Hydrolyse zu verhindern, wurde die Probenpräparation durchgehend mithilfe von Nitril-Handschuhen vorgenommen. Die Handschuhe sowie die Arbeitsflächen wurden zusätzlich mit 10%iger Formamid-Lösung behandelt, da Formamid die RNase-Aktivität unterdrückt.¹⁷⁷ Außerdem wurden nur sterile oder autoklavierte Gefäße und Geräte verwendet. Temperaturempfindliche Geräte wurden mit Formamid-Lösung behandelt. Als Lösungsmittel wurde autoklaviertes oder mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser verwendet. Alle weiteren Chemikalien wurden ausschließlich für RNA-Projekte verwendet und dementsprechend ebenfalls unter RNase-freien Bedingungen gehandhabt.¹⁷⁶ Zur längeren Lagerung (> 12 Stunden) wurden alle RNA-Proben zur Trockne eingengt und eingefroren (-20 °C).

3.5.2 FTIR-Proben

3.5.2.1 Nukleosidmonophosphate und RNA-Modellstränge

Die Nukleosidmonophosphate (NMPs) wurden von Dr. Christian Grünewald (Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Gleiches gilt für RNA-Modellstränge, die über Festphasensynthese hergestellt wurden. Teilweise wurden diese Stränge aber auch käuflich erworben (BioSpring GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). Sowohl die NMPs als auch die Modellstränge wurden in einem wässrigen Puffer (25 mM Kaliumphosphat, 50 mM Kaliumchlorid, pH 6,2) gelöst. So wurde im Fall der NMPs eine Konzentration von ca. 5 mM eingestellt. Für die Modellstränge wurde eine Konzentration von ca. 1 mM verwendet. Vor der Probenmessung wurde ein H-D-Austausch vorgenommen. Dazu wurden die Proben mittels einer Lyophylle (Christ Alpha 2-4, Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) gefriergetrocknet und anschließend in 99,8% D₂O (Euriso-Top SAS, Saint-Aubin Cedex, Frankreich) gelöst. Um einen möglichst vollständigen H-D-Austausch gewährleisten zu können, wurde diese Prozedur mehrmals wiederholt.

Im Fall der Modellstränge (siehe Tabelle 4.2) wurde zusätzlich folgendes Faltungsprotokoll angewendet: Die Probenlösung wurde mithilfe eines Blockthermostaten (Labnet International, Edison, USA) für zehn Minuten auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben außerhalb des Thermostaten langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden die Proben in Sandwichküvetten (siehe oben, 50 µm Spacer) präpariert oder direkt auf die ATR-Zelle aufgetragen.

3.5.2.2 Purinbindende Aptamere

Die Herstellung sowie die Aufreinigung der ASW- und GSW-Proben wurde komplett von Albrecht Völklein (Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) im Rahmen seiner Masterarbeit übernommen. Beide Proben wurden über *in-vitro*-Transkription mittels der T7 Polymerase (P266L Mutante) ausgehend von DNA-Templaten hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Diethylaminoethyl-(DEAE)-Anionenaustauschchromatografie sowie mittels HPLC (*reverse-phase*). Anschließend wurde folgendes Faltungsprotokoll angewendet: Die entsalzten Proben wurden in MilliQ-Wasser gelöst und für fünf Minuten auf 95 °C erwärmt. Danach wurden sie durch Zugabe von neun Äquivalenten eisgekühltem MilliQ-Wasser schnell heruntergekühlt und zunächst für 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben in Pufferlösung überführt (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 50 mM KCl, pH 6,2) und zum H-D-Austausch gefriergetrocknet. Vor der Messung wurde der so erhaltene Feststoff schließlich in 99,9% D₂O (Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland) gelöst. Dabei wurde als Endkonzentration 1,7 mM (ASW) bzw. 1,6 mM (GSW) Aptamerkonzentration eingestellt. Außerdem wurde die MgCl₂-Konzentration auf das Zehnfache der RNA-

Konzentration eingestellt. Die Konzentration der jeweiligen Liganden entsprach 0,9 Äquivalenten des jeweiligen Aptamers. Die entsprechenden Probenzusammensetzungen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Abschließend wurden die Proben in Sandwichküvetten (siehe Kapitel 3.1.3, 50 μm Spacer) präpariert.

Tabelle 3.3. Probenzusammensetzung für die FTIR-Bindungsstudien der purinbindenden Aptamere ASW und GSW. Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf eine D_2O -Pufferlösung (25 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 50 mM KCl, pH 6,2).

Probenbezeichnung	c(Aptamer) / mM	c(Ligand) / mM	c(MgCl_2) / mM
ASW	1,7	-	17
Ade / ^{13}C ^{15}N Ade	-	1,4	16
ASW + Ade / ^{13}C ^{15}N Ade	1,7	1,5	17
ASW + HX / ^{13}C ^{15}N HX	1,7	1,5	17
GSW	1,6	-	16
HX / ^{13}C ^{15}N HX	-	1,4	16
GSW + HX / ^{13}C ^{15}N HX	1,6	1,4	16
GSW + Ade / ^{13}C ^{15}N Ade	1,6	1,4	16

3.5.3 ζ_m^f - und ζ_m -Proben

3.5.3.1 Synthese von ζ_m^f und ζ_m

Alle ζ_m^f - und ζ_m -Proben wurden von Dr. Dnyaneshwar B. Gophane und Anna-Lena Johanna Segler aus Prof. Dr. Snorri Th. Sigurdssons Arbeitsgruppe (Science Institute, University of Iceland) nach einem 2012 veröffentlichten Verfahren synthetisiert, das in der Folge kurz beschrieben wird.⁸⁵

Zur Herstellung von ζ_m^f und ζ_m wurde zunächst 2'-O-Methyluridin (U_m) an Position 5 bromiert, um dadurch 5-Bromo-2'-O-methyluridin zu erhalten. Anschließend wurde die 3'- sowie die 5'-OH-Gruppe dieser Verbindung geschützt und an Position 4 chloriert. Im nächsten Schritt wurde die Verbindung mit einem Tetramethylisindolinderivat umgesetzt, wodurch es zu einer nukleophilen Substitution des Chlors kommt. Die so gebildete Verbindung wurde mit Kaliumfluorid in EtOH umgesetzt, was zu einem Ringschluss führte. Dadurch konnte das Phenoxazinderivat ζ_m^f dargestellt werden. Durch Oxidation von ζ_m^f mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Natriumwolframat entstand ζ_m .

Die Aufreinigung beider Marker erfolgte über Säulenchromatografie, wobei ζ_m zusätzlich mittels HPLC gereinigt wurde. Hierdurch konnte vor allem eine Kontamination der ζ_m -Probe mit ζ_m^f ausgeschlossen werden, da sich die Laufzeiten der beiden Marker deutlich unterscheiden.

3.5.3.2 ζ_m^f -markierte Modellstränge und ζ_m^f -markierte N1-Aptamere

Die ζ_m^f -markierten RNA-Modellsequenzen und die ζ_m^f -markierten N1-Aptamere wurden mittels RNA-Festphasensynthese hergestellt. Dazu mussten zunächst geschützte ζ_m^f -Phosphoramidite hergestellt werden. Dabei wurde zunächst die 5'-OH-Gruppe des ζ_m^f mit einer 4,4'-Dimethoxytritylethergruppe geschützt. Anschließend wurden durch Umsetzung mit 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-Tetraisopropylphosphordiamidit sowie N,N-Diisopropylammoniumtetrazolid das Phosphoramidit hergestellt.

Die Festphasensynthese wurde nach einem Standardverfahren für die RNA-Synthese mit 2'-TBDMS-geschützten Phosphoramiditen durchgeführt. Dabei wurde ein automatischer DNA-Synthesizer (ASM800, BIOSET Ltd., Novosibirsk, Russland) verwendet. Die 2'-TBDMS-geschützten RNA-Phosphoramidite (ChemGenes Corp., Wilmington, USA) wurden in 1,2-Dichlorethan gelöst. Als Kopplungsagens wurde 5-Ethylthiotetrazol verwendet. Die Oxidation wurde mit tert-Butylhydroperoxid durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*denaturing polyacrylamide gel electrophoresis*, dPAGE).

Die unmarkierten RNA-Modellsequenzen wurden dagegen über die Firma BioSpring GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Sie wurden ebenfalls über Festphasensynthese hergestellt und mittels Ionenaustausch-HPLC gereinigt. Die unmarkierten N1-Aptamerproben wurden von Dr. Marc Vogel (AK Süß, Biologie, Technische Universität Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

3.5.3.3 Präparation

Sowohl ζ_m^f als auch ζ_m sind wasserlöslich. Allerdings löst sich ζ_m^f deutlich besser in wässrigen Lösungsmitteln als ζ_m . Beide Proben wurden standardmäßig in 20 mM Natrium-Kakodylat-Puffer (NaCacodylat) bei einem pH-

Wert von 7,4 gelöst. Dieser Puffer wurde gewählt, da er keine starke Temperaturabhängigkeit zeigt. Entsprechend sollte es bei Verwendung von NaCacodylat nicht zu temperaturabhängigen pH-Änderungen bei Schmelzexperimenten kommen. Die Konzentration der ζ_m^f - und ζ_m -Proben wurde mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes über die Absorption bei 360 nm eingestellt ($\epsilon=7486\pm 122 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).⁴⁸

Für lösungsmittel- oder pH-abhängige Messungen wurden die Proben allerdings zunächst in Ethanol (EtOH; *pro analysi*, p. a.) gelöst und so aliquotiert. Anschließend wurde der Alkohol wieder mittels eines Konzentrators (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verdampft. Die Rückstände wurden dann im entsprechenden Lösungsmittel (Dimethylsulfoxide, Acetonitril, Toluol, Deuteriumoxid; jeweils p. a.) bzw. bei entsprechendem pH-Wert erneut gelöst.

Die markierten RNA-Modellsequenzen wurden ebenfalls in 20 mM NaCacodylat bei pH 7,4 gelöst. Über die RNA-Absorptionsbande bei 260 nm (Lambert-Beer'sches Gesetz) wurde die Konzentration der Proben auf 7 μM eingestellt.⁹ Dabei wurde davon ausgegangen, dass der molare Extinktionskoeffizient von ζ_m^f bei 260 nm dem molaren Extinktionskoeffizienten von Cytidin entspricht.^{178–181}

Die N1-Aptamerproben, sowohl ζ_m^f -markiert als auch unmarkiert, wurden in 20 mM NaCacodylat mit 100 mM NaCl bei pH 7,4 gelöst. Auch hier wurde, wie oben beschrieben, die Probenkonzentration mittels der 260 nm RNA-Absorption eingestellt. Für alle statischen Experimente wurde eine Aptamerkonzentration von 1 μM gewählt. Bei den Proben mit Ligand wurde Neomycin im Überschuss (4 μM Neomycin; +Neo) zugegeben. Für die entsprechenden Konzentrationen im Fall der Fluoreszenz-Stopped-Flow-Messungen sei auf das entsprechende Methodenkapitel verwiesen (Kapitel 3.3.5).

Vor jeder Messreihe wurden sowohl die RNA-Modellsequenzen als auch die verschiedenen N1-Proben gefaltet. Dazu wurden die Proben mithilfe eines Blockthermostaten (Labnet International, Edison, USA) für die Dauer von zwei Minuten auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben außerhalb des Thermostaten langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.5.4 Proteinproben

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten GPR- und Chr2-Proteinproben wurden vom Arbeitskreis Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Entsprechend wird an dieser Stelle nicht auf die eigentliche Herstellung, sondern ausschließlich auf die abschließende Präparation der Proben eingegangen. Grundsätzlich muss dabei auf verschiedene Präparationsarten hingewiesen werden. So können Proteine z.B. in Mizellen solubilisiert vorliegen. Dazu werden Detergenzien wie DDM (n-Dodecyl β -D-Maltosid) verwendet. In solubilisierter Form liegen die Proteine weitgehend gleichmäßig verteilt in Lösung vor, was recht weit von den *in-vivo*-Bedingungen entfernt ist. Alternativ dazu können die Membranproteine in Proteoliposomen eingebaut werden. Diese Liposomen bilden eine künstliche Phospholipiddoppelschicht aus, wodurch sich sozusagen eine Zellmembran simulieren lässt. Diese sogenannten rekonstituierten Proben entsprechen, zumindest im Vergleich zu den solubilisierten Proben, eher den *in-vivo*-Bedingungen. Eine wichtige Kenngröße rekonstituierter Proben ist das Lipid-zu-Protein-Verhältnis (LPR), also das Verhältnis zwischen Proteoliposomen und den darin eingebauten Membranproteinen.

Für die Tieftemperaturabsorptionsmessungen war es nötig, den Proben bzw. der Pufferlösung Glycerin hinzuzufügen. Glycerin schützt einerseits die Proben vor Frostschäden und ermöglicht andererseits beim Einfrieren einen Glasübergang. Bei einem zu geringen Glycerinanteil der Probe bildet sich kein Glas aus. Bei zu hohem Glycerinanteil kommt es dagegen häufig zum Aufschwimmen der Probe. Es zeigte sich, dass 30–60% vol Glycerin optimal für die Tieftemperaturabsorptionsmessungen sind. Je nach Glycerinanteil verschiebt sich natürlich der Gefrierpunkt der Proben bzw. die Glasübergangstemperatur.^{182,183}

3.5.4.1 GPR und GPR_{E108Q}

3.5.4.1.1 Solubilierte Proben

Im Fall der solubilisierten Proben lagen GPR und GPR_{E108Q} jeweils in folgender wässriger Pufferlösung vor: 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0,05% DDM, pH 8,5. Durch mehrfaches Zentrifugieren (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mithilfe eines Zentrifugenfilters (Vivaspin 500, Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) war es möglich, die Konzentration der Proben schrittweise zu erhöhen. Für

⁹ Bei der Berechnung werden sowohl die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen sowie die Einflüsse der direkten Nachbarbasen berücksichtigt.^{178–181}

Cryotrappingexperimente wurden die solubilisierten Proben sowohl in 1 mm-Quarzglasküvetten als auch in Sandwichküvetten präpariert:

- Zur Absorptionsmessung in einer 1 mm-Quarzglasküvette wurden 50 μl der konzentrierten Probe mit 75 μl Glycerin gemischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA). Circa 100 μl wurden anschließend in die Quarzglasküvette (Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) überführt. Abschließend wurde die Küvette mittels PTFE-Band am Probenkopf des Kryostaten befestigt.
- Zur Absorptionsmessung in einer Sandwichküvette wurde die Probe zunächst auf dem CaF_2 -Fenster der Küvette angetrocknet, um die Konzentration weiter erhöhen zu können. Dazu wurde die Probe schrittweise (3x5 μl) auf die Glasoberfläche aufgetragen und vorsichtig im Luftstrom getrocknet. Anschließend wurden 5 μl einer Glycerin-Puffer-Lösung (60% Glycerin) auf die Probe gegeben und die Küvette verschlossen. Hierbei wurde ein 50 μm -Spacer mit 14 mm Außen- und 8 mm Innendurchmesser verwendet.

3.5.4.1.2 Rekonstituierte Proben

Die rekonstituierten GPR- und $\text{GPR}_{\text{E108Q}}$ -Proben lagen jeweils in folgender wässriger Pufferlösung vor: 50 mM TRIS, 5 mM MgCl_2 , pH 8,5, LPR=2. Für Cryotrappingexperimente wurden die rekonstituierten Proben ausschließlich in Sandwichküvetten präpariert:

- Analog zum Verfahren bei solubilisierten Proben, wurde hier zur Absorptionsmessung in einer Sandwichküvette die Probe zunächst auf dem CaF_2 -Fenster der Küvette angetrocknet und so die Konzentration der Probe erhöht. Dazu wurde die Probe schrittweise auf die Glasoberfläche aufgetragen und vorsichtig im Luftstrom getrocknet. Dabei wurde darauf geachtet, die Probe nicht vollständig einzutrocknen. So wurde nach der zweiten Probenzugabe die noch feuchte Probe mittels des zweiten Küvettenfensters verschlossen. Auf die Zugabe von Glycerin konnte hier, aufgrund des geringen Wasseranteils in der angetrockneten Probe, verzichtet werden. Auch im Fall von rekonstituierten Proben wurde ein 50 μm -Spacer mit 14 mm Außen- und 8 mm Innendurchmesser verwendet.

3.5.4.2 ChR2

ChR2 wurde nur in Form von rekonstituierten Proben untersucht. Diese lagen unter folgenden Bedingungen vor: 20 mM Hepes/TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,4, LPR=3. Kryoabsorptionsmessungen dieser Proben waren nur mittels Sandwichküvetten möglich. Dazu wurde die ChR2-Probe in einer ca. 30%igen Glycerin-Puffer-Lösung auf CaF_2 -Sandwichküvette durch leichtes Antrocknen aufgetragen. Dadurch wurde auch die Konzentration der Lösung erhöht. Eine wesentlich höhere Glycerinkonzentration hat sich nicht als praktikabel herausgestellt, da es dabei zum Aufschwimmen des Proteins kommen kann. Anschließend wurde die Sandwichküvette verschlossen. Dabei wurde ein 12 μm -Spacer verwendet. Eine so geringe Schichtdicke war in diesem Fall nötig, da es trotz des Glasübergangs zu einem großen Verlust von Messlicht durch Streuung kam.

4 Ergebnisse

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der verschiedenen Projekte präsentiert und diskutiert. Am Ende jedes Unterkapitels werden die Ergebnisse der Diskussion kurz zusammengefasst.

4.1 FTIR-Spektroskopie an RNA

Infrarotspektroskopie ist eine vielseitige und aussagekräftige Methode zur Untersuchung von biologischen Makromolekülen. So gehören beispielsweise infrarotspektroskopische Untersuchungen inzwischen annähernd zum Standardverfahren bei der Charakterisierung von Retinalproteinen. Dagegen sind infrarotspektroskopische Studien an Nucleinsäuren noch relativ selten. Bei den existierenden Studien wurden verschiedenste Methoden der Probenpräparation, diverse Messparameter und unterschiedliche Auswertungsmethoden angewendet, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander erschwert wird. Um nun trotzdem infrarotspektroskopische Messungen an Nucleinsäuren im Allgemeinen und RNA im Besonderen zu etablieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Grundlagenstudie bzw. Machbarkeitsstudie durchgeführt.

Dazu wurden zunächst statische Infrarotspektren von RNA-Mononucleotiden sowie von RNA-Modellsträngen aufgezeichnet. Dadurch sollte eine kleine Signallbibliothek, als interner Standard, aufgebaut werden.¹⁸⁴ Außerdem sollten anhand dieser Proben und Messungen die Stärken und Schwächen bzw. die Grenzen der Methode ausgelotet werden. Dies geschah in enger Zusammenarbeit mit Dinh Du Tran (Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) im Rahmen seiner Masterarbeit.

Abschließend wurde die Methode mittels einer Ligandenbindungsstudie anhand des adenin- und des guaninbindenden Riboschalters getestet. Diese wurde im Rahmen einer Kooperation mit Sven Warhaut sowie der co-betreuten Masterarbeit von Albrecht Völklein (beide: Arbeitsgruppe Prof. Dr. Harald Schwalbe, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) durchgeführt.

4.1.1 Mononucleotide

Wie einleitend erwähnt, wurden zunächst statische FTIR-Spektren der vier RNA-Nucleosidmonophosphate (NMP, Abbildung 4.1) aufgezeichnet, um den Grundstock einer Signallbibliothek zu erhalten. Diese Spektren dienen des Weiteren als interner Standard. Allgemein erwartet man die Schwingungen des Phosphatrückgrats und der Ribose im Bereich von 1500–1250 cm^{-1} bzw. 1250–800 cm^{-1} während die nucleobasenspezifischen Signale im Bereich von 1800–1300 cm^{-1} zu finden sind. Die hier durchgeführte Studie beschränkt sich auf den zuletzt genannten Bereich, da hier die spezifischsten Signale bzw. Wechselwirkungen erwartet wurden.

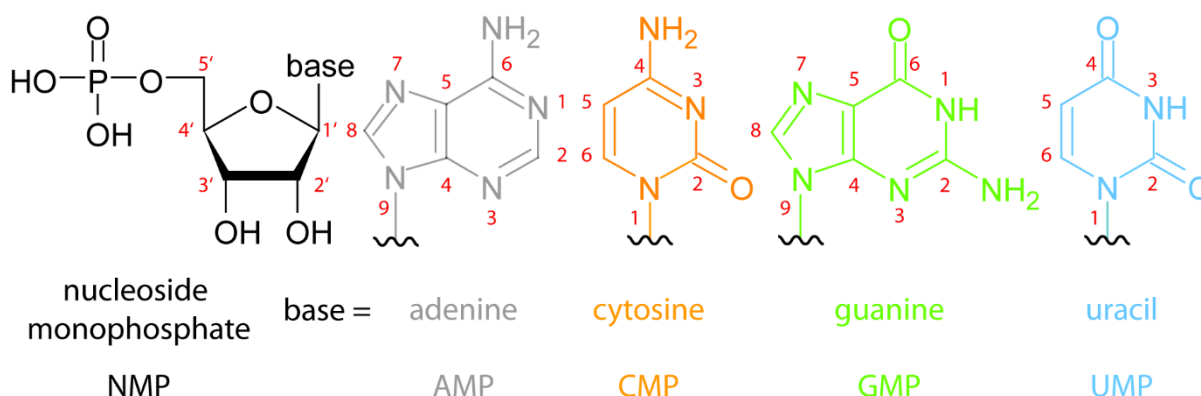


Abbildung 4.1. Strukturformeln mit Nummerierungen der Nucleosidmonophosphate (NMPs).

In Abbildung 4.2 sind die in Transmission und mittels ATR-Technik aufgezeichneten FTIR-Spektren der vier NMPs aufgetragen. Anhand dieser Auftragung ist leicht zu erkennen, dass jedes der vier NMPs mindestens eine ausgeprägte Absorptionsbande im höherenergetischen Spektralbereich ($>1600 \text{ cm}^{-1}$) aufweist. Diese Bande kann im Fall von CMP, GMP und UMP der Carbonyl-Streckschwingung zugeordnet werden. Bei AMP resultiert das größte Signal dagegen aus der C=N-Streckschwingung. Neben diesen Hauptsignalen weisen alle vier Spektren noch weitere mittelstarke bis starke Signale auf, die C=N- und C=C-Streckschwingungen zugeordnet werden können.

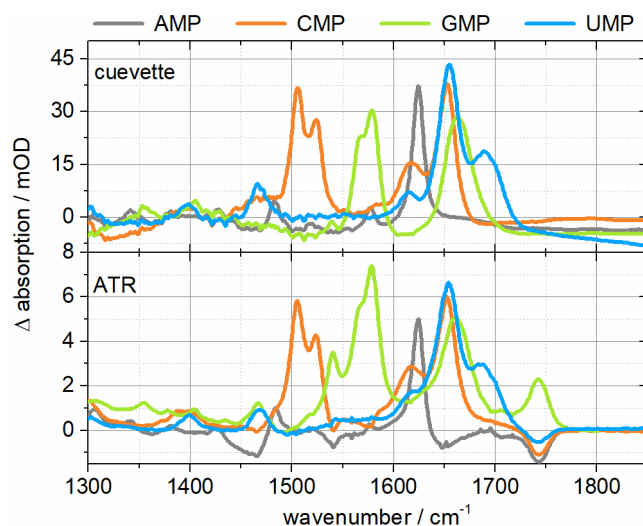


Abbildung 4.2. Vergleich der FTIR-Spektren der vier NMPs. Oben) In Transmission mittels Sandwichkuvette gemessen. Unten) Mittels ATR-Technik gemessen.

In Tabelle 4.1 sind die charakteristischen Signale der vier NMPs inklusive der Zuordnung zu den Molekülschwingungen zusammengefasst (vgl. Abbildung 4.1).¹⁸⁴

Tabelle 4.1. Spektrale Position, Signalintensität und Schwingungszuordnung einiger markanter IR-Banden der NMPs.

Probe	Position / cm ⁻¹	Intensität	Zuordnung ¹⁸⁴
AMP	1624	s	C=N-, C=C-Ringschwingung
	1577	w	Ringschwingung in der Ebene
	1483	w	Ringschwingung
CMP	1653	s	C ² =O ² -Streckschwingung
	1618	m	Ringschwingung in der Ebene
	1524	m	Schwingung in der Ebene
	1506	s	Schwingung in der Ebene
GMP	1662	s	C ⁶ =O ⁶ -Streckschwingung
	1579	s	C=N-Ringschwingung
	1567	s	C=N-Ringschwingung
UMP	1686	m	C ² =O ² -Streckschwingung
	1656	s	C ⁴ =O ⁴ -Streckschwingung
	1618	w	C=C-Ringschwingung in der Ebene
	1467	m	Uridin

s = stark (strong), m = mittelstark (medium), w = schwach (weak)

Allgemein kann anhand Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1 festgestellt werden, dass sich die FTIR-Spektren der vier NMPs relativ klar unterscheiden lassen. Dadurch sollte auch eine Signalzuordnung im Fall von Oligonukleotiden innerhalb bestimmter Grenzen möglich sein.

4.1.2 Modellstränge

Im nächsten Schritt wurden statische FTIR-Spektren verschiedener, zum Teil selbstkomplementärer RNA-Modellsequenzen aufgezeichnet und die Signalzuordnung zu den entsprechenden NMPs versucht. Die Modellsequenzen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2. Probenamen und Sequenzen der RNA-Modellstränge für die FTIR-Studie.

Probenname	Sequenz	Kommentar
ds_5A-5U	5'-AAA-AAU-UUU-U-3'	selbstkomplementär
ds_5G-5C	5'-GGG-GGC-CCC-C-3'	selbstkomplementär
ss_8U-2C	5'-UUU-UUU-UUC-C-3'	-
ss_8U-2G	5'-UUU-UUU-UUG-G-3'	-
ss_8A-2G	5'-AAA-AAA-AAG-G-3'	-
ss_8A-2C	5'-AAA-AAA-AAC-C-3'	-
ss_6A-2U-2G-8U	5'-AAA-AAA-UUG-GUU-UUU-UUU-3'	-

In Abbildung 4.3 sind die Spektren der selbstkomplementären Stränge ds_5A-5U sowie ds_5G-5C im Vergleich zu den jeweiligen NMP-Spektren aufgetragen. Es ist hierbei leicht zu erkennen, dass sich in beiden Fällen annähernd alle starken Signale der NMPs im Spektrum des jeweiligen Oligonukleotides wiederfinden lassen. Im Fall von ds_5A-5U (Abbildung 4.3a) stimmen sowohl die spektralen Positionen als auch die Intensitätsverteilungen der Signale weitgehend überein. Die schwächeren NMP-Signale sind dagegen teilweise, zum Beispiel aufgrund von Signalüberlagerungen, nicht zu erkennen. Außerdem kann eine minimale Verschiebung des AMP-Signals innerhalb des Modellstrangs (1627 cm^{-1}) im Vergleich zum NMP (1624 cm^{-1}) beobachtet werden. Dies lässt sich eventuell auf die Basenpaarung bzw. Doppelstrangbildung zurückführen, wobei allerdings ein ähnlicher Effekt nicht für UMP beobachtet werden konnte.¹⁸⁴

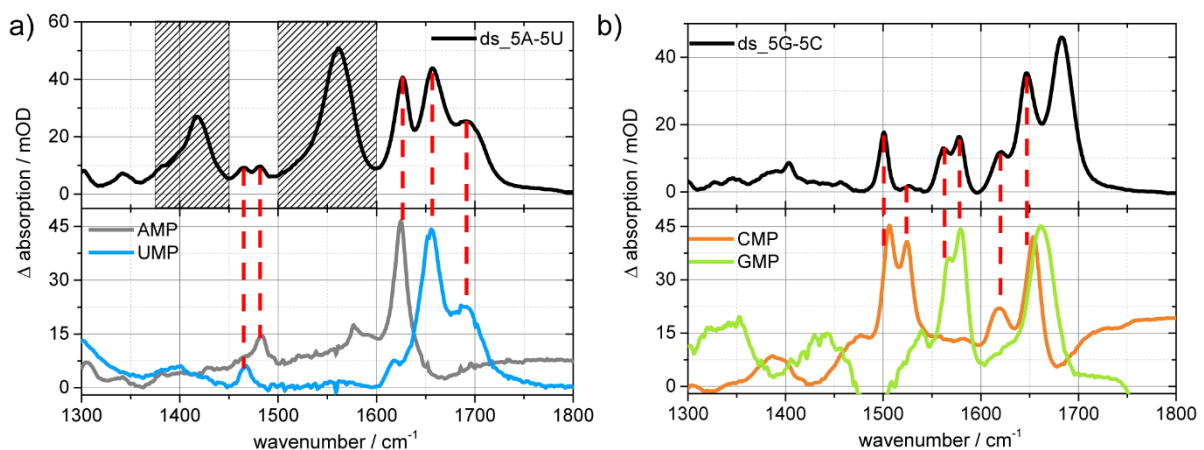


Abbildung 4.3. FTIR-Spektren der selbstkomplementären RNA-Modellsequenzen ds_5A-5U (a) und ds_5G-5C (b). Zum Vergleich sind jeweils zusätzlich die Spektren der entsprechenden NMPs aufgetragen. Die gestrichelten roten Linien sollen die Signalzuordnung verdeutlichen.

Neben den klar zuordenbaren Signalen der NMPs sind hier, wie auch bei einem Großteil der Spektren der Modellstränge, zwei weitere, stark ausgeprägte Signale zu beobachten. Diese Signale haben ihre Absorptionsmaxima bei 1417 cm^{-1} bzw. bei 1561 cm^{-1} . Die Intensität des Signals bei 1561 cm^{-1} ist in etwa doppelt so groß wie die Intensität des Signals bei 1417 cm^{-1} . Durch verschiedenste Vergleichsexperimente war es möglich, sequenzspezifische Gründe für die Signale weitgehend auszuschließen. So können die beiden Signale z.B. nicht einer Duplex- oder Quadruplexbildung zugeordnet werden. Auch eine Probenkontamination bei der Probenpräparation und Synthese konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Deshalb sind die Signale wahrscheinlich auf eine teilweise Degradation der Proben zurückzuführen. Allerdings war auch keine klare Zuordnung zu typischen Abbauprodukten möglich. Glücklicherweise verdecken die unbekanntene Signale die NMP-Signale nur im Fall der C=N-Ringschwingung (1567 cm^{-1} und 1578 cm^{-1}), sodass die Auswertung der RNA-Modellstränge durch diese Artefakte nur marginal beeinflusst wird. Entsprechend sind die Signale in den entsprechenden Abbildungen (Abbildung 4.3 bis Abbildung 4.6) durch Schraffur andeutungsweise verdeckt dargestellt.

Bei ds_5G-5C (Abbildung 4.3b) ist ganz ähnlich zu ds_5A-5U eine klare Signalzuordnung zu den entsprechenden NMP-Signalen möglich. Hier kommt es auch nicht zu Verdeckungen durch die beiden Artefaktsignale. Im

Unterschied zu ds_5A-5U sind hier allerdings deutlichere Verschiebungen der Signale sowie relative Intensitätsunterschiede festzustellen. Diese können allerdings der Basenpaarung bzw. der Doppelstrangbildung zugeordnet werden.

So weist die Verschiebung der $C^2=O^2$ -Streckschwingung des GMP von 1662 cm^{-1} zu 1683 cm^{-1} auf die Basenpaarung des Guanosins hin. Entsprechend spricht die Verschiebung der $C^2=O^2$ -Streckschwingung des CMP von 1653 cm^{-1} zu 1647 cm^{-1} für eine Basenpaarung des Cytidins. Wobei der Effekt im Fall von Guanosin offensichtlich ausgeprägter ist. Dafür zeigen die Signale der CMP-Ebenenschwingungen bei 1506 cm^{-1} und 1524 cm^{-1} eine relative Änderung der Signalintensität, die sich ebenfalls auf die Basenpaarung zurückführen lässt.¹⁸⁴

In Abbildung 4.4a ist das Spektrum der Probe ss_8A-2C aufgetragen. Im Fall dieser Probe sind keine Basenpaarungen zwischen den einzelnen Strängen zu erwarten. Die Signalbanden von CMP sind trotz der Artefaktüberlagerung relativ deutlich in ss_8A-2C zu erkennen und nicht spektral verschoben. Dagegen sind die Signalbanden von AMP nicht oder nur noch sehr schwach zu erkennen. Dies ist vor allem deshalb verwunderlich, da man aufgrund der Sequenz mit einer, relativ zu CMP, deutlich stärkeren Ausprägung der AMP-Signale rechnen konnte.

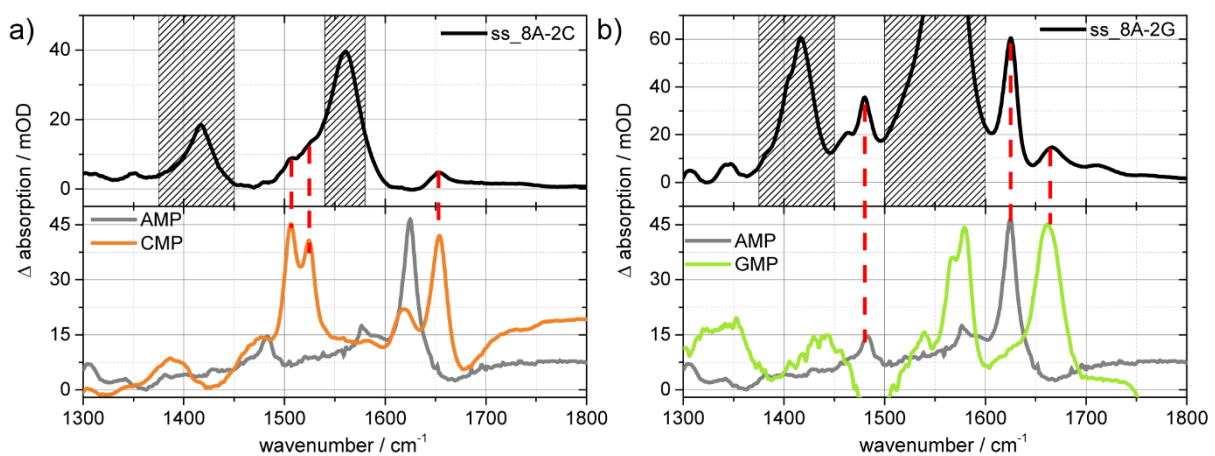


Abbildung 4.4. FTIR-Spektren der RNA-Modellsequenzen ss_8A-2C (a) und ss_8A-2G (b). Zum Vergleich sind jeweils zusätzlich die Spektren der entsprechenden NMPs aufgetragen. Die gestrichelten roten Linien sollen die Signalzuordnung verdeutlichen.

Dagegen sind die AMP-Signale im Spektrum der Probe ss_8A-2G (Abbildung 4.4b) sehr deutlich ausgeprägt und leicht zuzuordnen. Gleiches gilt für das nicht durch Artefakte verdeckte GMP-Signal bei 1662 cm^{-1} . Weder für die AMP-Signale noch für das GMP-Signal konnte eine Verschiebung des Signals festgestellt werden. Die relativen Signalintensitäten entsprechen tendenziell dem durch die Modellsequenz vorgegebenen Verhältnis.

Auch im Fall der Probe ss_8U-2C (Abbildung 4.5a) ist eine problemlose Zuordnung der einzelnen NMP-Signalbanden möglich. Gleiches gilt für die relativen Signalintensitäten. Diese lassen sich auch hier direkt mittels der Modellsequenz erklären.

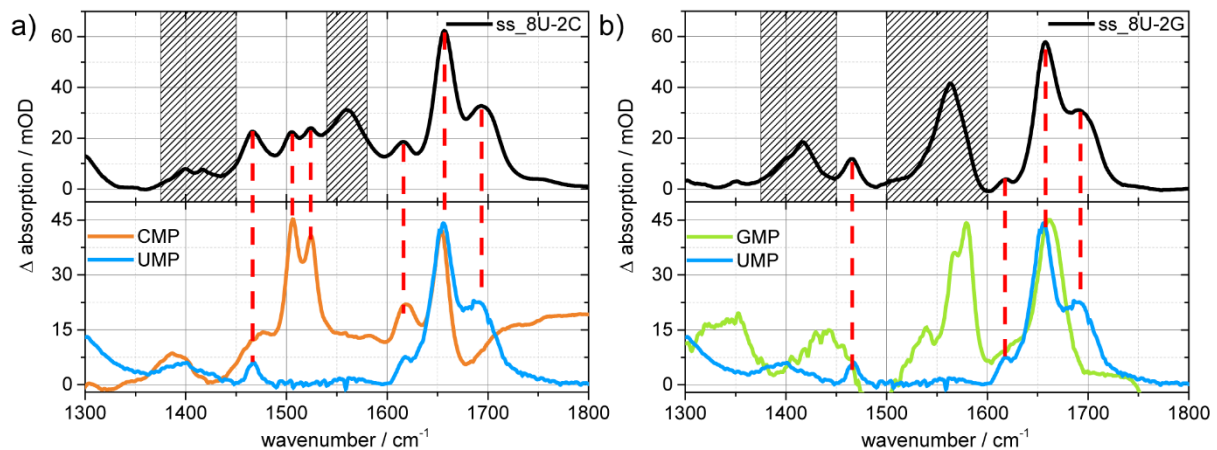


Abbildung 4.5. FTIR-Spektren der RNA-Modellsequenzen *ss_8U-2C* (a) und *ss_8U-2G* (b). Zum Vergleich sind jeweils zusätzlich die Spektren der entsprechenden NMPs aufgetragen. Die gestrichelten roten Linien sollen die Signalzuordnung verdeutlichen.

Bei der Probe *ss_8U-2G* (Abbildung 4.5b) ist ebenfalls eine sehr klare Zuordnung der Signale des UMP-Spektrums möglich. Allerdings überlappt das GMP-Spektrum deutlich mit dem UMP-Spektrum sowie mit den Artefaktbanden. Dementsprechend ist eine Zuordnung der GMP-Signale in diesem Fall nicht möglich.

Gleiches gilt für den längsten Modellstrang *ss_6A-2U-2G-8U* (Abbildung 4.6). Auch in diesem Fall wird das GMP-Signal vollständig vom UMP-Signal sowie von den Artefaktbanden verdeckt. Dagegen ist aber eine Zuordnung der UMP- und AMP-Signale leicht möglich. Im Fall dieser beiden Komponenten entsprechen auch die relativen Signalintensitäten dem durch die Sequenz gegebenen Verhältnis.

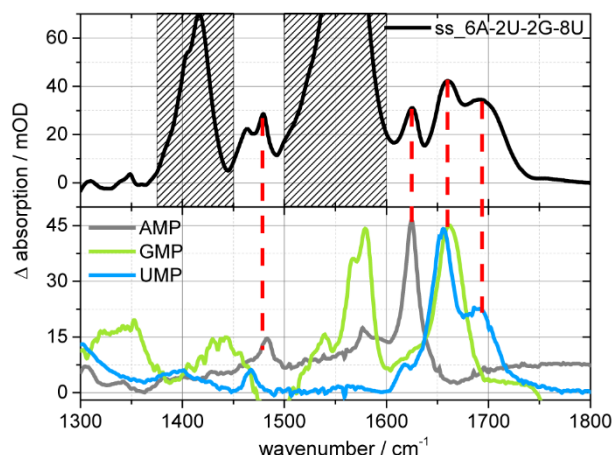


Abbildung 4.6. FTIR-Spektrum der RNA-Modellsequenz *ss_6A-2U-2G-8U*. Zum Vergleich sind zusätzlich die Spektren der entsprechenden NMPs aufgetragen. Die gestrichelten roten Linien sollen die Signalzuordnung verdeutlichen.

Zusammengefasst lassen sich anhand der hier gezeigten Messungen der Modellsequenzen einige allgemeine Aussagen zur FTIR-Spektroskopie an RNA-Oligonukleotiden machen: Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich Signale der NMPs in den Spektren der Oligonukleotide zumindest teilweise zuordnen lassen. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass die jeweiligen Signalintensitäten weitgehend dem durch die Modellsequenz gegebenen Verhältnis der verschiedenen Nukleotide entsprechen. Allerdings wird die Zuordnung von Signalbanden sowie deren Interpretation sehr erschwert, wenn es zu starken Überlagerungen der jeweiligen NMP-Signale kommt. Besonders kritisch ist dies für CMP, GMP und UMP im Spektralbereich von ca. 1625 cm⁻¹ bis ca. 1725 cm⁻¹, da sich in diesem Bereich die C=O-Streckschwingungen dieser Verbindungen direkt überlagern. Entsprechend sind einzelne Signalbeiträge in diesem Spektralbereich kaum zu interpretieren. Gleiches gilt natürlich für Banden, die durch Probenverunreinigungen oder Abbauprodukte hervorgerufen werden. Allgemein kann schon anhand der hier untersuchten, sehr kurzen Modellsequenzen erkannt werden, dass die Interpretation von Absolutspektren längerer Oligomere kaum möglich ist. Besteht die Sequenz zu annähernd gleichen Teilen aus allen vier RNA-Basen und ist deutlich länger als das hier gezeigte 18mer (*ss_6A-2U-2G-8U*, Abbildung 4.6), ist davon auszugehen, dass sich die einzelnen NMP-Signale nicht mehr zweifelsfrei zuordnen lassen. Dies gilt im Speziellen für Ligandenbindungsstudien oder Duplexbildungsstudien. Denn, wie anhand der Proben *ds_5A-5U* und *ds_5G-5C*

(Abbildung 4.3) leicht zu erkennen ist, sind die spektralen Änderungen, die durch Watson-Crick-Basenpaarung hervorgerufen werden, sehr klein. Kommt es hier zusätzlich noch zu Überlagerungen mit anderen Signalen, sind diese Änderungen nicht mehr zu erkennen. Entsprechend ist es hier empfehlenswert, die innerhalb der FTIR-Spektroskopie weit verbreitete Methode der Differenzspektroskopie anzuwenden. Dies stellt wiederum spezielle Anforderungen an die Probenpräparation, die Messbedingungen und das Auswertungsverfahren. Dementsprechend wurde eine solche Differenzspektroskopiestudie zu den Bindungsverhältnissen der purinbindenden Aptamere ASW und GSW durchgeführt. Dadurch sollten die Möglichkeiten sowie die Vor- und Nachteile dieser Methode ausgelotet werden.

4.1.3 Purinbindende Aptamere

Um die Ligandenbindung der purinbindenden Aptamere ASW und GSW zu untersuchen, wurden statische FTIR-Spektren der Aptamere mit und ohne den jeweiligen Liganden aufgenommen. Entsprechend wurden Spektren von ASW mit und ohne Adenosin (Ade) sowie Spektren von GSW mit und ohne Hypoxanthin (HX) aufgezeichnet. Als Vergleich dazu wurden ebenfalls ASW-Proben mit und ohne Hypoxanthin sowie GSW-Proben mit und ohne Adenosin untersucht. Wie erwartet zeigten die jeweiligen Absolutspektren keine signifikanten Unterschiede. Demnach konnte der Einfluss der verschiedenen Liganden auf die beiden Aptamere erst durch Differenzbildung beurteilt werden. Die entsprechenden Differenzspektren sind in Abbildung 4.7 zusammengefasst.

4.1.3.1 Ligand-Aptamer-Differenzspektren

Wie in Abbildung 4.7a zu erkennen ist, führt die Wechselwirkung von ASW mit Ade zur Ausbildung von vielen zusätzlichen Signalbanden, die nicht unmittelbar Ade zugeordnet werden können. Es ist zu vermuten, dass diese Banden der spezifischen Ligandenbindung zugeteilt werden können, denn bei der Bindung des Liganden ist mit größeren strukturellen Änderungen des Aptamers sowie direkten Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Ligand zu rechnen. Betrachtet man andererseits die Wechselwirkung von GSW und Ade (Abbildung 4.7b), so entspricht das FTIR-Spektrum größtenteils dem Ligandenspektrum (Ade). Nur eine zusätzliche Signalbande bei 1700 cm^{-1} ist im entsprechenden Differenzspektrum zu erkennen. Spektral könnte diese Bande auf eine Änderung der $\text{C}^2=\text{O}^2$ -Streckschwingung von Uridin hindeuten. Dazu könnte es beispielsweise bei der Bildung des U22-, U47-, U51- und C74-Quadrupels kommen. Allerdings sind die wenigen Signaländerungen ein Hinweis darauf, dass Ade von GSW nicht oder nur unspezifisch gebunden wird.

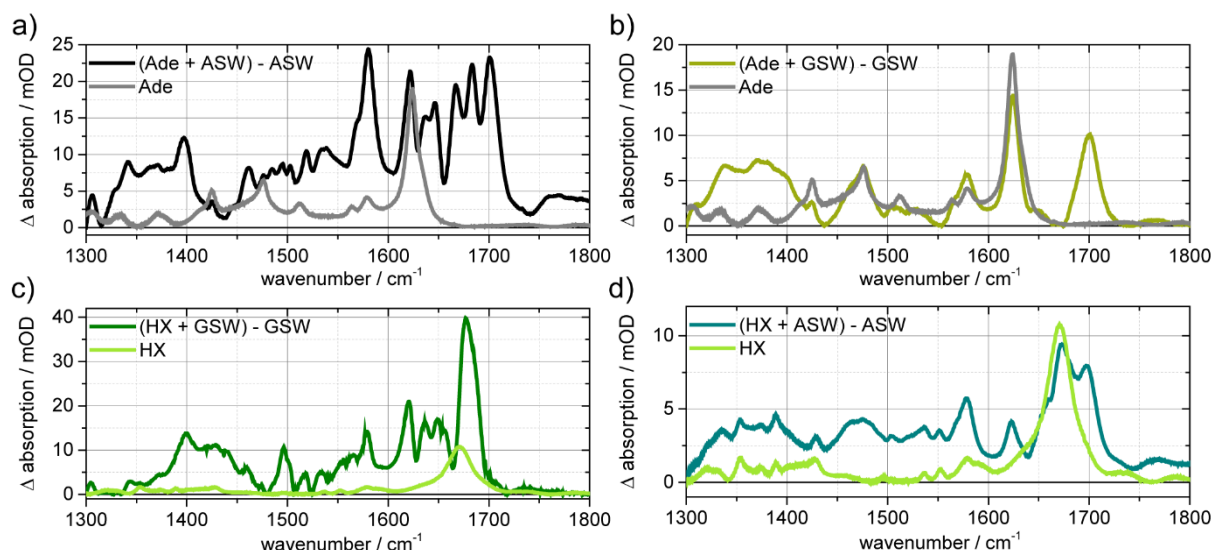


Abbildung 4.7. FTIR-Differenzspektren verschiedener Kombinationen aus Ligand und Aptamer jeweils im direkten Vergleich zum entsprechenden Ligandenspektrum. a) Ade + ASW, b) Ade + GSW, c) HX + GSW, d) HX + ASW.

Ein ganz ähnlicher Befund lässt sich für HX feststellen. So führt die Wechselwirkung von GSW und HX ebenfalls zur Bildung einiger Signale, die sich nicht HX zuordnen lassen (Abbildung 4.7c). Außerdem scheint die größte HX-Absorptionsbande bei 1670 cm^{-1} leicht zu 1677 cm^{-1} verschoben zu sein. Wie schon bei ASW und Ade lässt dies auf eine spezifische Bindung des HX durch GSW schließen. Andererseits sorgt die Wechselwirkung von ASW und HX nur für geringe Signaländerungen (Abbildung 4.7d). Das entsprechende Differenzspektrum entspricht weitestgehend dem Ligandenspektrum (HX). Allerdings zeigt sich hier ebenfalls eine Bande bei rund 1700 cm^{-1} . Dies kann wieder auf Änderungen der $\text{C}^2=\text{O}^2$ -Streckschwingung von Uridin hindeuten. Darüber hinaus ist eine weitere zusätzliche Bande bei 1623 cm^{-1} zu erkennen. Diese könnte mit Änderungen der Uridin-C=C-Ringschwingung zusammenhängen. Trotzdem ist auch hier aufgrund der vergleichsweise wenigen Signaländerungen davon auszugehen, dass HX von ASW nicht oder nur unspezifisch gebunden wird.

4.1.3.2 Isotopendifferenzspektren

Um den Einfluss der Aptamer-Ligand-Wechselwirkung auf die jeweiligen Signale der Liganden genauer und isoliert von den RNA-Signalen untersuchen zu können, wurden die Experimente mit isotoopenmarkierten Liganden

($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$) wiederholt. Dazu wurden zunächst Absolut- und Differenzspektren der nicht markierten und der markierten Liganden erstellt (Abbildung 4.8).

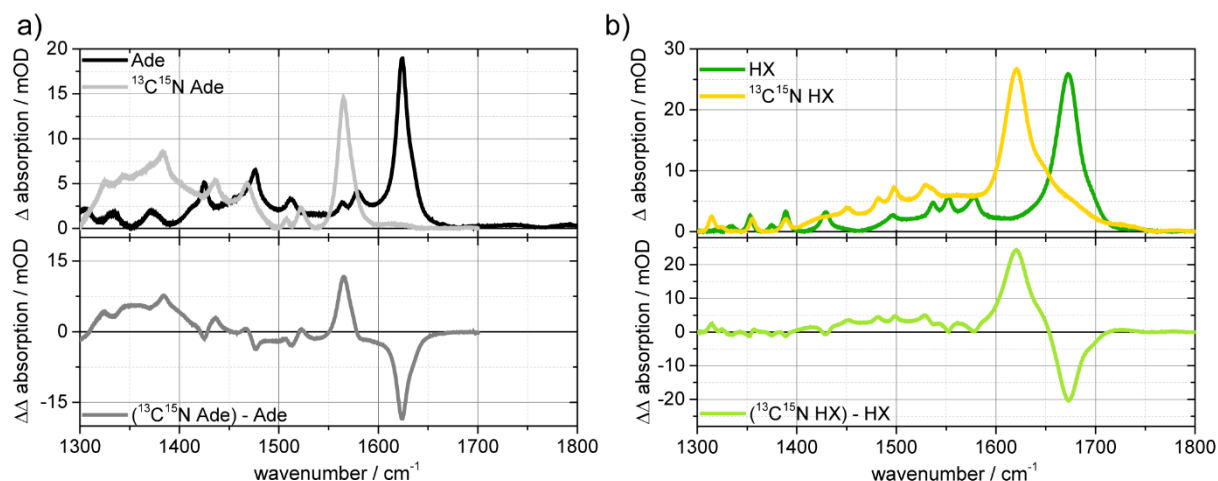


Abbildung 4.8. Absolut- und Differenzspektren von a) Adenosin (Ade) und $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem Adenosin ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Ade) sowie von b) Hypoxanthin (HX) und $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem Hypoxanthin ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ HX).

Die $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Markierung sorgt für eine deutliche Signalverschiebung (Isotopieverschiebung) der Absorptionsbanden. Am deutlichsten ist dies jeweils an den größten Absorptionsbanden zu beobachten, die der C=O-Streckschwingung zuzuordnen sind. Diese jeweilige Bande kann dementsprechend als Referenzsignal verwendet werden. Im Fall von Ade (Abbildung 4.8a) ist eine Isotopieverschiebung des Referenzsignals um -59 cm^{-1} von 1624 cm^{-1} (Ade) hin zu 1565 cm^{-1} ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Ade) zu beobachten. Das entsprechende HX-Signal (Abbildung 4.8b) verschiebt sich um 51 cm^{-1} von 1672 cm^{-1} (HX) zu 1621 cm^{-1} ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ HX). Entsprechend sollten diese Signale klar in den Differenzspektren der entsprechenden Bindungsstudie identifizierbar sein.

Anschließend wurde nun die Wechselwirkung der beiden Aptamere mit den beiden isotonenmarkierten Liganden untersucht. Für die Differenzenbildung wurde das jeweilige Spektrum des Aptamers mit unmarkiertem Ligand verwendet. Die resultierenden Differenzspektren sind in Abbildung 4.9 zusammengefasst und können so direkt mit den Isotopendifferenzspektren der freien Liganden verglichen werden.

Tabelle 4.3. Spektrale Position des Absorptionsmaximums bzw. Absorptionsminimums des $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Ade bzw. des Ade-Referenzsignals in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung (Wechselwirkung mit ASW, GSW oder frei in Lösung).

	$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Ade	Ade
ASW	1560 cm^{-1}	1625 cm^{-1}
GSW	1564 cm^{-1}	1624 cm^{-1}
Lösung	1565 cm^{-1}	1624 cm^{-1}

Betrachtet man zunächst Ade bzw. $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ Ade, so sind die entsprechenden Differenzsignale der Liganden sowohl im ASW- (Abbildung 4.9a) als auch im GSW-Differenzspektrum (Abbildung 4.9c) wiederzufinden. Form und Position der Referenzsignale entsprechen im GSW-Differenzspektrum annähernd dem Differenzspektrum der freien Liganden (vgl. Tabelle 4.3 und Abbildung 4.9e). Darüber hinaus ist nur eine weitere negative Bande bei 1700 cm^{-1} deutlich ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass es zwischen Ade und GSW keine nennenswerten Interaktionen gibt. Dadurch kann bestätigt werden, dass Ade von GSW nicht oder nur unspezifisch gebunden wird. Dagegen sind die Form und die Position der Ligandensignale im ASW-Differenzspektrum leicht verändert. Dies kann als Hinweis auf Interaktionen zwischen ASW und Ade interpretiert werden. Auch hier ist wieder eine zusätzliche negative Bande bei 1700 cm^{-1} zu erkennen.

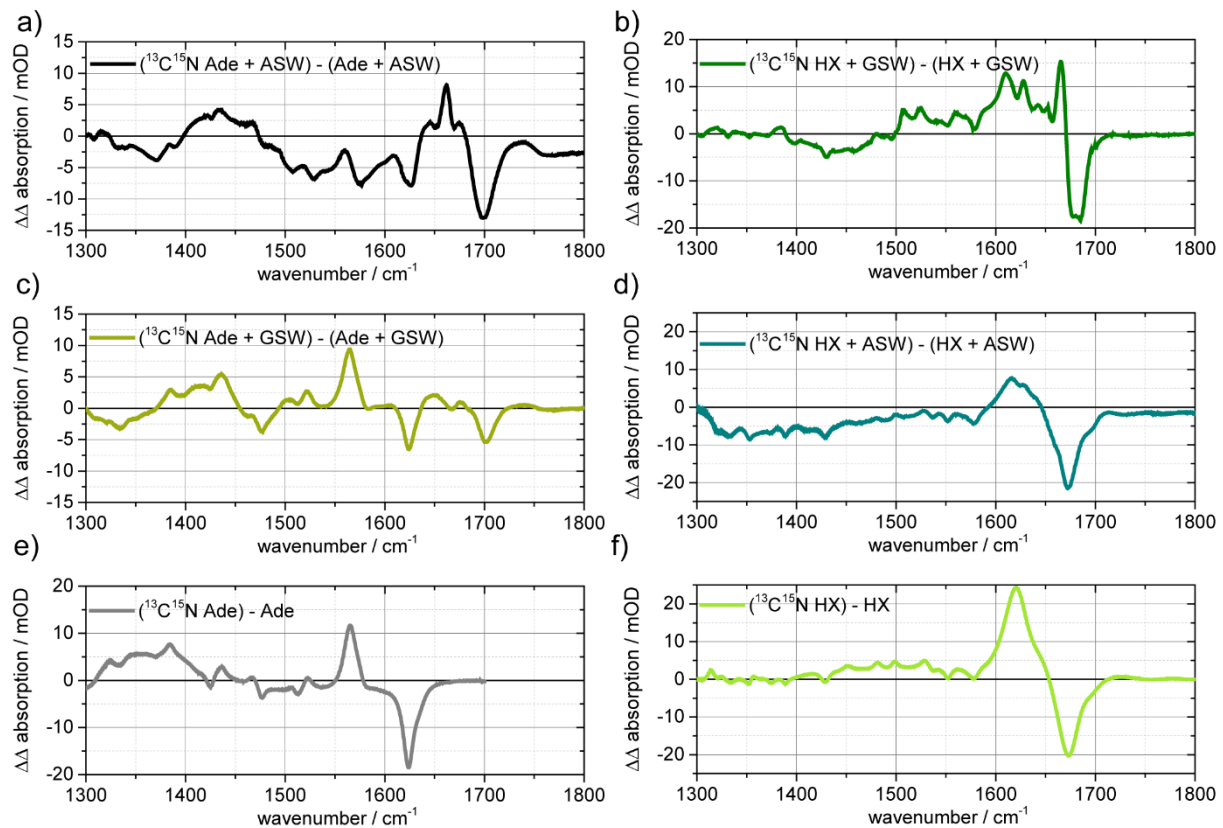


Abbildung 4.9. Isotopendifferenzspektren verschiedener Kombinationen aus Ligand und Aptamer a) Ade + ASW, b) HX + GSW, c) Ade + GSW, und d) HX + ASW im Vergleich zu den entsprechenden Isotopendifferenzspektren der Liganden e) Ade und f) HX.

Ein ganz ähnliches Verhalten zeigt sich für das HX- bzw. für das $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ HX-Signal (vgl. Tabelle 4.4). Auch diese Differenzsignale sind sowohl im entsprechenden ASW- als auch im entsprechenden GSW-Differenzspektrum zu erkennen. Im Fall des ASW-Differenzspektrums (Abbildung 4.9d) entsprechen die Form und die Position der Ligandensignale weitgehend dem Differenzspektrum der freien Liganden (Abbildung 4.9f). Allerdings weist die Bande bei rund 1625 cm^{-1} eine Doppelspitze auf. Trotzdem ist auch hier davon auszugehen, dass es nicht zu ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen HX und ASW kommt, also auch zu keiner spezifischen Bindung. Im Vergleich dazu kommt es im Fall des GSW-Differenzspektrums (Abbildung 4.9b) zu einer deutlichen Veränderung der spektralen Form und Position der Ligandensignale. Sowohl die negative HX-Bande als auch die positive $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ HX-Bande weisen eine Doppelspitze auf. Dies kann als Überlagerung des freien und des gebundenen Ligandenspektrums interpretiert werden. Deshalb kann hier von deutlichen Wechselwirkungen zwischen HX und GSW, z.B. einer spezifischen Bindung, ausgegangen werden.

Tabelle 4.4. Spektrale Position des Absorptionsmaximums bzw. Absorptionsminimums des $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ HX- bzw. des HX-Referenzsignals in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung (Wechselwirkung mit GSW, ASW oder frei in Lösung).

	$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ HX	HX
GSW	1610 cm^{-1}	1685 cm^{-1}
ASW	1615 cm^{-1}	1672 cm^{-1}
Lösung	1621 cm^{-1}	1672 cm^{-1}

4.1.3.3 Zusammenfassung der Bindungsstudien

Die Wechselwirkung von Ade mit ASW ist für größere Änderungen des Aptamersignals verantwortlich. Gleichzeitig sind die Änderungen des Ligandensignals eher klein. Dies spricht für eine spezifische Bindung des Liganden an die RNA, wobei es allerdings zu einer deutlichen Änderung der Konformation des Aptamers kommen muss. Die Wechselwirkung von HX mit ASW sorgt nur für sehr kleine Änderungen des RNA- sowie des HX-Signals. Dies kann als unspezifische Ligandenbindung interpretiert werden, wobei allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Ligand gar nicht gebunden wird.

Die Wechselwirkung von HX mit GSW verursacht sowohl eine deutliche Veränderung der Aptamer- als auch der Ligandensignale. Entsprechend kann auch hier von einer spezifischen Bindung des Liganden an die RNA ausgegangen werden. Dabei muss es zu signifikanten Konformationsänderungen des Aptamers kommen. Außerdem scheint die C=O-Schwingung des HX direkt durch die Bindung beeinflusst zu werden. Andererseits scheint es zwischen Ade und GSW so gut wie keine Wechselwirkungen zu geben. Sowohl das Spektrum des GSW-Aptamers als auch das Ade-Spektrum zeigen keine deutlichen Veränderungen. Bei den kleinen festzustellenden Differenzen kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Artefakte, z.B. aus der Differenzenbildung, handelt. Entsprechend gibt es für die Kombination aus GSW und Ade keine Hinweise auf eine (unspezifische) Bindung.

4.1.4 Zusammenfassung und Fazit

Mittels der hier durchgeführten Studie konnte allgemein gezeigt werden, dass sich FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung kleinerer RNA-Oligonukleotide (< ca. 20 Nukleobasen) eignet.

Vergleicht man die FTIR-Spektroskopie mit anderen, in der RNA-Forschung weit etablierten Methoden, wie NMR- oder Fluoreszenzspektroskopie, so zeigten sich einige generelle Vor- und Nachteile der Methode: Wie im Material- und Methodenkapitel beschrieben, sind dazu pro Probe zwar relativ hohe (z.B. im Vergleich zu Fluoreszenzmethoden) RNA-Konzentrationen (ca. 1 mM), aber nur sehr geringe (z.B. im Vergleich zu NMR) Volumina (< 40 μ l) nötig. Vorteilhaft ist, dass die Proben nicht zwangsläufig synthetisch modifiziert o.Ä. werden müssen, um mittels FTIR-Spektroskopie untersucht werden zu können. Allerdings sind die Probenpräparation und die Auswertung vergleichsweise aufwendig und fehleranfällig. Der instrumentelle Aufwand ist dagegen relativ gering.

Durch Vergleiche mit Literaturwerten und internen Standards war es mittels FTIR-Spektroskopie möglich, eine relativ klare Zuordnung der einzelnen Banden vorzunehmen. So war es z.B. möglich, Basenpaarungen spektroskopisch nachzuweisen oder das Verhältnis der Nukleobasen innerhalb einer Probe untereinander grob abzuschätzen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die infrarotspektroskopische Untersuchung von größeren Oligonukleotiden mittels Differenzspektroskopie möglich ist. Dementsprechend konnten auch Bindungsstudien von Aptameren durchgeführt werden.

Bei diesen Bindungsstudien konnte relativ klar eine Ligandenbindung nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von isotoopenmarkierten Liganden war es dabei möglich, die Veränderung des Ligandensignals getrennt von der Veränderung des RNA-Signals zu betrachten. Entsprechend konnten die Differenzsignale sehr grob in Ligand- und RNA-Signale eingeteilt werden. Eine klare Zuordnung der RNA-Banden zu einzelnen Basen, Strukturelementen oder Bindungsprozessen war in den hier gezeigten Beispielen allerdings nicht möglich.

Allgemein eröffnen sich, aufgrund der Signalanzahl, der Veränderung der Signalform und der spektralen Position, einige Interpretationsspielräume. Allerdings kann es hier leicht zur Über- oder Fehlinterpretation der Datenlage kommen, da z.B. durch die Differenzenbildung leicht Artefakte innerhalb der Spektren entstehen können. Dementsprechend musste festgestellt werden, dass spezifische Aussagen zu strukturellen Änderungen von größeren RNA-Oligomeren nur sehr eingeschränkt mittels FTIR-Spektroskopie getroffen werden können. Trotzdem kann abschließend festgestellt werden, dass die FTIR-Spektroskopie, in Kombination mit anderen biophysikalischen, biochemischen und spektroskopischen Methoden, relativ schnell und unaufwendig wertvolle Beiträge zur Untersuchung von RNA-Struktur und -Funktion liefern kann. Außerdem ist es möglich mittels zeitaufgelöster IR-Spektroskopie Informationen zur Dynamik der Proben zu erhalten, die mit anderen Methoden nicht oder nur schwer zugänglich sind. Dementsprechend kann die hier präsentierte statische IR-Studie als Grundlage für folgende zeitaufgelöste Experimente an RNA dienen.

4.2 ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel

Wie schon in der Einleitung und dem Theoriekapitel kurz angesprochen, wurden im Rahmen dieser Arbeit das Spinlabel ζ_m und das Fluoreszenzlabel ζ_m^f mittels optischer Spektroskopie untersucht und charakterisiert (Abbildung 4.10). Dabei wurde zunächst der im Fall von ζ_m auftretende Fluoreszenzlöschungsmechanismus untersucht. Dabei standen die photophysikalischen Eigenschaften der Label ζ_m und ζ_m^f im Fokus. Im Anschluss wurden die Wechselwirkungen des Fluorophors ζ_m^f mit RNA-Modellsträngen beobachtet und diskutiert. Im letzten Schritt wurde eine Ligandenbindungsstudie anhand des neomycinbindenden Aptamers durchgeführt.

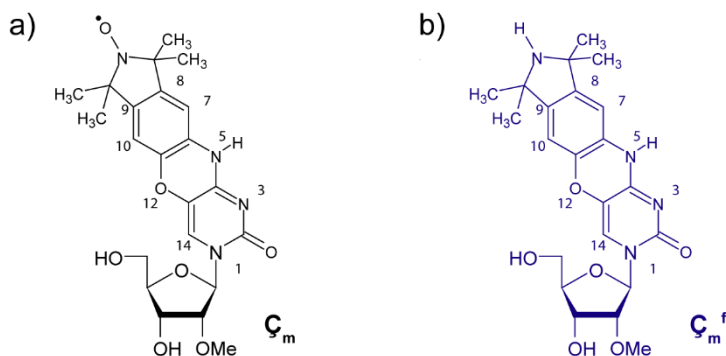


Abbildung 4.10. Struktur von ζ_m (a) und ζ_m^f (b).

4.2.1 Photophysik und Quenchingmechanismus

Wie schon im Theoriekapitel beschrieben wurde, ist es für den Einsatz des Fluorophors ζ_m^f als RNA-Label essenziell, auf detaillierte Informationen zu den photophysikalischen Eigenschaften der Verbindung zurückgreifen zu können. Außerdem ermöglicht eine vergleichende photophysikalische Studie der Label ζ_m und ζ_m^f Einblicke in den Fluoreszenzlöschungsmechanismus des Spinlabels ζ_m (Abbildung 4.10). In den folgenden Unterkapiteln werden zunächst die Ergebnisse, sortiert nach verschiedenen spektroskopischen Methoden, präsentiert. Anschließend werden dann die photophysikalischen Eigenschaften beider Label zusammengefasst und der ζ_m -Quenchingmechanismus anhand der gesammelten Ergebnisse diskutiert.^f

4.2.1.1 Statische Absorptions- und Emissionsmessungen

Zur spektroskopischen Charakterisierung von ζ_m und ζ_m^f wurden zunächst statische Absorptions- und Emissionsmessungen durchgeführt (Abbildung 4.11). Dabei zeigte sich, dass der Fluoreszenzlabel ζ_m^f und der Spinlabel ζ_m kaum zu unterscheiden sind. Die spektralen Formen der beiden Label ähneln sich in wässriger Lösung sehr stark. Außerdem ähneln die Spektren dem entsprechenden DNA-Label ζ^f .⁴⁸ Die Absorptionsmaxima der Verbindungen befinden sich jeweils bei 27630 cm^{-1} (362 nm). Die Absorptionsspektren weisen keine Feinstrukturen oder Schultern auf. Die spektrale Lage der Absorptionsspektren ist günstig für den Einsatz der Label in Nukleinsäuren, da die Spektren nicht mit der Absorptionsbande der Nukleobasen bei 260 nm überlagern.¹⁸⁵

^f Die in Kapitel 4.2.1 präsentierten Ergebnisse wurden außerdem folgendermaßen veröffentlicht:¹⁸⁵

Gustmann, H., Lefrancois, D., Reuss, A.J., Gophane, D.B., Braun, M., Dreuw, A., Sigurdsson, S.Th. and Wachtveitl, J. (2017), *Spin the light off: rapid internal conversion into a dark doublet state quenches the fluorescence of an RNA spin label*, **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 19, 26255

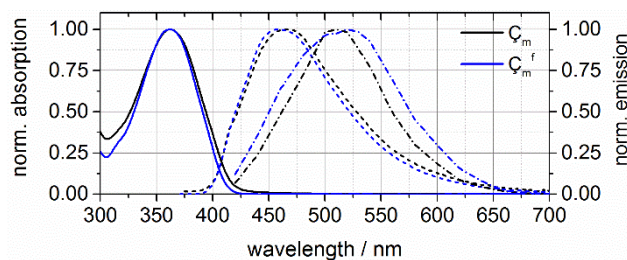


Abbildung 4.11. Normierte statische Absorptions- (durchgezogene Linien), Fluoreszenz- (gestrichelte Linien) sowie Tieftemperaturphosphoreszenzspektren (gestrichelte und gepunktete Linien) von ζ_m (schwarz) und ζ_m^f (blau).¹⁸⁵

Die Fluoreszenzspektren von ζ_m und ζ_m^f sind gegenüber dem Absorptionsspektrum um rund 5890 cm^{-1} (100 nm) bathochrom (rot) verschoben und weisen ebenfalls keine deutlichen Schultern oder Ähnliches auf. Durch diese starke Stokes-Verschiebung ist nur ein kleiner Überlapp zwischen den entsprechenden Absorptions- und Fluoreszenzspektren zu erkennen. Dies ist für den Einsatz als Fluoreszenzlabel ebenfalls von Vorteil, da z.B. Reabsorptionseffekte weitgehend ausgeschlossen werden können.

Allerdings unterscheiden sich die beiden Verbindungen sehr deutlich in ihrer Fluoreszenzquantenausbeute: Während ζ_m^f mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\phi = 38\%$ deutliche Fluoreszenz zeigt, emittiert ζ_m mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von nur $\phi < 1\%$ fast keinerlei Licht. In diesem deutlichen Unterschied zeigen sich die starken Fluoreszenzlöschungseigenschaften der Nitroxidgruppe des ζ_m .

Bei einer Temperatur von 77 K war es außerdem möglich, Phosphoreszenzspektren der beiden Verbindungen aufzuzeichnen. Diese ähneln sich ebenfalls sehr. So befindet sich das Emissionsmaximum von ζ_m bei 19600 cm^{-1} (510 nm), während das etwas breitere Phosphoreszenzspektrum von ζ_m^f leicht bathochrom (rot) verschoben ist, sodass sich sein Maximum bei 18850 cm^{-1} (530 nm) befindet. Die Maxima der Phosphoreszenzspektren sind also im Vergleich zu den entsprechenden Maxima der Fluoreszenzspektren um 2140 cm^{-1} (50 nm , ζ_m) bzw. 2890 cm^{-1} (70 nm , ζ_m^f) verschoben.

4.2.1.2 Messungen der Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauern von ζ_m und ζ_m^f wurden mittels TCSPC bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt (Abbildung 4.12). Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Labeln festgestellt werden. So kann der Fluoreszenzzerfall von ζ_m^f mit einer triexponentiellen Zerfallsfunktion beschrieben werden. Eine einzelne Zeitkonstante von 300 ps (τ_{pop}), mit einer negativen Amplitude, beschreibt dabei die Bevölkerung des angeregten strahlenden Zustands. Der Zerfall dieses angeregten Zustands wird durch zwei weitere Zeitkonstanten, eine dominante ($\tau_1=4,1 \text{ ns}$) und eine schwache ($\tau_2=1,4 \text{ ns}$) beschrieben,^s woraus sich nach Formel 3.12 eine intensitätsgewichtete, mittlere Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{\text{av}}=4,1 \text{ ns}$ ergibt.

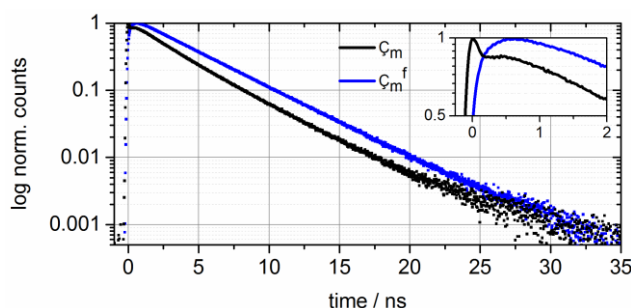


Abbildung 4.12. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m (schwarz) und ζ_m^f (blau). Eingebettet ist eine Vergrößerung der ersten 2 ns dieser Messungen dargestellt.¹⁸⁵

Um den Fluoreszenzzerfall von ζ_m zu beschreiben, sind vier exponentielle Zerfallsfunktionen nötig. Die vierte Komponente ist nötig, um einen sehr schnellen Zerfall zu beschreiben. Diese ist als Spitze (Peak) zu Beginn der

^s Die Amplitude bzw. der Beitrag von τ_2 ist relativ gering, weshalb sich der Zerfall prinzipiell auch mit einer biexponentiellen Funktion (τ_{pop} und τ_1) beschreiben ließe. Allerdings ist die Qualität des Fits in diesem Fall signifikant schlechter, weshalb letztlich nicht auf τ_2 verzichtet wurde.

Zerfallskurve zu erkennen und hat mit Abstand den größten Beitrag zum gesamten Fluoreszenzzerfall von ζ_m . Ein solcher Peak resultiert typischerweise aus Prozessen, die schneller als die Zeitauflösung des Instruments bzw. die Breite der IRF (FWHM 200 ps) sind.¹ Ein Fit des Peaks, unter Berücksichtigung der IRF, ergibt eine Zeitkonstante von $\tau_3=3$ ps, was allerdings nur als obere Grenze für die echte Zerfallszeit angenommen werden kann. Dies bestätigen transiente Absorptionsmessungen (siehe unten, Kapitel 4.2.1.6). Durch diese transienten Absorptionsmessungen konnte auch sichergestellt werden, dass ein Fit mit 3 ps überhaupt sinnvoll ist. Nur aufgrund der TSCPC-Daten wäre dies nicht möglich gewesen. Neben dem starken Peak ist ein zweiter, wesentlich schwächerer Fluoreszenzzerfall für ζ_m zu erkennen. Dieser baut sich zunächst mit $\tau_{pop}=230$ ps auf und zerfällt dann auf einer ns-Zeitskala. Dieser Signalabfall kann mit zwei Zerfallskomponenten $\tau_1=4,3$ ns und $\tau_2=2,3$ ns beschrieben werden.⁵ Aus den einzelnen Zerfallskomponenten ergibt sich nach Formel 3.12 eine intensitätsgewichtete, mittlere Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{av}=200$ ps.

Die ns-Zerfallskomponenten von ζ_m ähneln stark dem entsprechenden Zerfall von ζ_m^f . Dies ließ zunächst eine Kontamination der ζ_m -Probe mit ζ_m^f vermuten. Allerdings konnte dies klar durch die Aufreinigung via HPLC ausgeschlossen werden (siehe Probenpräparation, Kapitel 3.5.3). Die beiden Marker weisen deutlich unterschiedliche Laufzeiten auf, weswegen eine Kreuzkontamination sehr unwahrscheinlich ist.

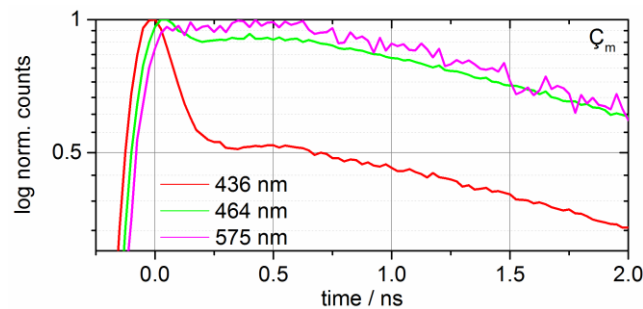


Abbildung 4.13. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m bei verschiedenen Detektionswellenlängen. Die Werte der Detektionswellenlänge entsprechen der Zentralwellenlänge der für diese Messung genutzten Bandpassfilter.¹⁸⁵

Mittels Bandpassfiltern war es möglich, zusätzliche spektrale Informationen zu den einzelnen ζ_m -Fluoreszenzzerfallskomponenten zu bekommen (Abbildung 4.13, Abbildung 4.14). Dabei zeigte sich, dass die Beiträge der schnellen (τ_3) und der langsameren (τ_1, τ_2) Zerfallskomponenten spektrale Unterschiede zeigen. Es ist also, zumindest ansatzweise, möglich, die Komponenten spektral zu separieren. So dominiert der schnelle Zerfall (τ_3) deutlich im Bereich der höherenergetischen Flanke des ζ_m -Fluoreszenzspektrums. Die langsameren Komponenten (τ_1, τ_2) dominieren dementsprechend in der niederenergetischen Flanke. Besonders deutlich ist dies an der Transienten bei 575 nm zu sehen. Hier ist kein Peak mehr zu erkennen und die Zerfallskurve ähnelt sehr stark der ζ_m^f -Zerfallskurve. Allerdings ist der Signalanstieg relativ schnell, sodass es hier offenbar immer noch Beiträge der schnellen Komponente geben muss. Wie in Abbildung 4.14b zu erkennen ist, kann für ζ_m^f dagegen keine spektrale Abhängigkeit des Fluoreszenzzerfalls festgestellt werden.

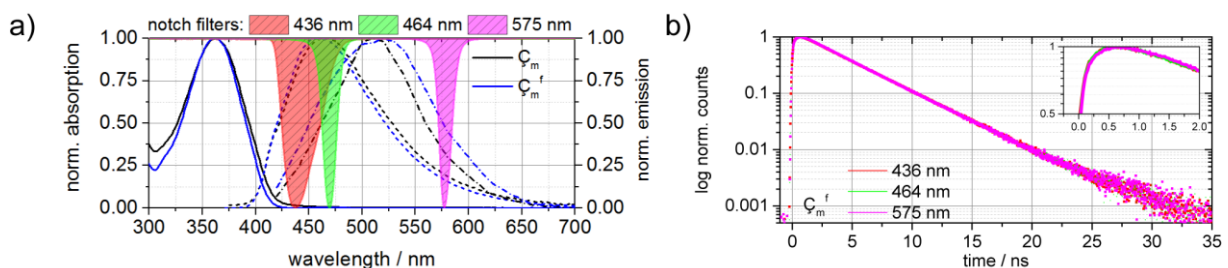


Abbildung 4.14. a) Absorptionsspektren der Bandpassfilter im Vergleich zu den statischen Absorptions- und Emissionsspektren von ζ_m und ζ_m^f . b) Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m^f bei verschiedenen Detektionswellenlängen. Die Werte der Detektionswellenlänge entsprechen der Zentralwellenlänge der für diese Messung genutzten Bandpassfilter.¹⁸⁵

¹ Unter anderem mittels transienter Absorptionsmessungen konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Peak um ein Streulichtartefakt handelt.

4.2.1.3 Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute sowie der Fluoreszenzlebensdauer

Gardarsson et al. beschreiben ausführlich eine starke pH-Abhängigkeit der ζ^f -Fluoreszenz⁸⁴. Dementsprechend konnte davon ausgegangen werden, dass ζ_m^f ein sehr ähnliches Verhalten zeigt und empfindlich auf diverse Eigenschaften des Lösungsmittels reagiert. Um dies weiter zu vertiefen, wurde eine Lösungsmittelabhängigkeitsstudie für ζ_m und ζ_m^f durchgeführt. Um den Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf die Fluoreszenz, unabhängig vom pH-Wert bzw. von Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen, zu untersuchen, wurde bei der Lösungsmittelstudie zunächst eine Reihe aprotischer Lösungsmittel (DMSO, Acetonitril, Toluol) verwendet. Für die Klassifizierung von Lösungsmitteln gibt es verschiedene Polaritätsskalen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Polaritätsindex P' nach Snyder verwendet, der vorrangig für die Flüssigchromatographie entwickelt wurde.^{186,187}

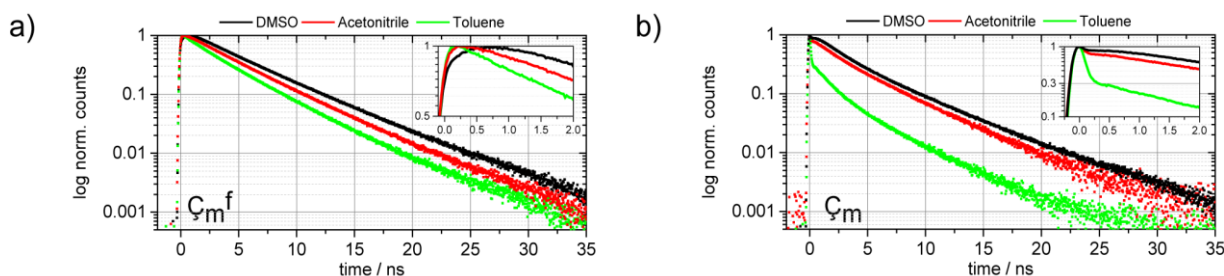


Abbildung 4.15. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m^f (a) und ζ_m (b) in verschiedenen aprotischen Lösungsmitteln. Eingebettet ist jeweils eine Vergrößerung der ersten 2 ns dieser Messungen dargestellt.¹⁸⁵

Wie anhand Abbildung 4.15 und Tabelle 4.5 zu sehen ist, zeigen sowohl die Fluoreszenzlebensdauer als auch Fluoreszenzquantenausbeute der beiden Label eine deutliche Lösungsmittelabhängigkeit. Sowohl für ζ_m^f als auch für ζ_m zeichnen sich innerhalb der hier untersuchten Lösungsmittel Trends ab. Besonders deutlich ist dies im Fall von ζ_m^f : Je kleiner hier der Polaritätsindex des Lösungsmittels ist, umso kürzer ist die Fluoreszenzlebensdauer und umso kleiner ist auch die Fluoreszenzquantenausbeute. Gleichzeitig ist an den ζ_m^f -Fluoreszenzzerfallkurven zu sehen, dass das Signal mit sinkendem Polaritätsindex immer schneller aufgebaut wird. Der fluoreszierende Zustand wird in apolaren, aprotischen Lösungsmitteln also besonders schnell be- und entvölkert. Bei polaren, aprotischen Lösungsmitteln sind beide Prozesse offenbar etwas langsamer.

Für die Fluoreszenzquantenausbeute von ζ_m ist es aus Empfindlichkeitsgründen allerdings nicht möglich, einen Trend zu diskutieren. Hier kann nur angegeben werden, dass die Fluoreszenzquantenausbeute in allen untersuchten Lösungsmitteln unterhalb von 1% liegt. Auch die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauern in den verschiedenen Lösungsmitteln gestaltet sich für ζ_m deutlich schwieriger. Die ps-Zerfallszeit τ_3 dominiert hier den Fluoreszenzzerfall, wie schon oben für Wasser beschrieben. Allerdings ist es schwer einzuschätzen, inwiefern die beobachteten lösungsmittelabhängigen Amplitudenunterschiede tatsächlich signifikant sind. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass dieser Zerfall weitgehend unabhängig vom Lösungsmittel ist. Dagegen zeigen die langsameren Zerfallskomponenten (τ_1 und τ_2) eine deutliche Lösungsmittelabhängigkeit, die stark den für ζ_m^f beschriebenen Trends folgt. Auch diese Zerfallskomponenten werden mit sinkender Lösungsmittelpolarität schneller. Dies führt auch dazu, dass das Verhältnis zwischen der schnellen ps-Komponente und den ns-Komponenten ebenfalls vom Lösungsmittel abhängt. In unpolaren aprotischen Lösungsmitteln erscheint der ps-Peak viel stärker ausgeprägt als in polaren aprotischen Lösungsmitteln. Über die Geschwindigkeit des

Signalaufbaus der ns-Komponenten kann allerdings keine sichere Aussage getroffen werden, da es hier zu einer Überlagerung mit ps-Peak kommt.

Tabelle 4.5. Fluoreszenzlebensdauern und Fluoreszenzquantenausbeuten von ζ_m und ζ_m^f in unterschiedlichen Lösungsmitteln.¹⁸⁵

P^{187}	Lösungsmittel		τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns	χ^2	τ_{av} / ns	FQY / %
10,2	H ₂ O	ζ_m^f	0,3	4,1 (96%)	1,4 (4%)	-	1,1	4,1	38
		ζ_m	0,2	4,3 (3%)	2,3 (2%)	0,003 (95%)	1,1	0,2	≤ 1
-	D ₂ O	ζ_m^f	0,3	5,7 (87%)	3,3 (13%)	-	1,1	5,5	48
		ζ_m	0,3	5,3 (5%)	2,5 (3%)	0,003 (92%)	1,2	0,4	≤ 1
7,2	DMSO	ζ_m^f	0,5	5,4 (81%)	2,7 (19%)	-	1,2	5,0	59
		ζ_m	0,4	5,7 (8,3%)	2,1 (4,3%)	0,003 (87,4%)	1,2	0,6	≤ 1
5,8	Acetonitril	ζ_m^f	0,1	5,0 (77%)	2,6 (23%)	-	1,1	4,5	44
		ζ_m	0,1	4,8 (5%)	1,6 (1%)	0,003 (94%)	1	0,3	≤ 1
2,4	Toluol	ζ_m^f	-	5,1 (48,3%)	2,9 (47,4%)	0,6 (4,3%)	1,1	3,9	30
		ζ_m	0,1	4,7 (0,4%)	1,4 (0,3%)	0,003 (99,3%)	1,1	0,03	≤ 1

P' = Synder Polaritätsindex; τ_i = Lebenszeit von Zerfallskomponente i , in Klammern: Amplitude der positiven Zerfallskomponente, τ_{pop} = Lebenszeit mit einer negativen Amplitude, die die Bevölkerung eines fluoreszierenden Zustands beschreibt; FQY = Fluoreszenzquantenausbeute

Um neben der Polarität auch noch den Einfluss von Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen bzw. Protonübertragungs- und Austauschreaktionen auf die Fluoreszenz zu untersuchen, wurden ζ_m^f und ζ_m ebenfalls in Deuteriumoxid (D₂O) untersucht und die Ergebnisse direkt mit den entsprechenden Messungen in Wasser (H₂O) verglichen (Abbildung 4.16, Tabelle 4.5). Dabei konnte für beide Label ein charakteristischer Isotopeneffekt festgestellt werden. So ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_{av} von ζ_m^f in D₂O um den Faktor 1,3 höher als in H₂O. Der gleiche Effekt kann auch für die Fluoreszenzquantenausbeute festgestellt werden. Im Fall von ζ_m kann festgestellt werden, dass die verschiedenen Komponenten des Fluoreszenzzerfalls unterschiedlich vom Lösungsmittel beeinflusst werden. Während die ps-Komponente (τ_3) des Zerfalls offenbar nicht vom Lösungsmittel beeinflusst wird, zeigen der Signalaufbau τ_{pop} (Faktor 1,5) sowie die längste Zerfallskomponente τ_3 (Faktor 1,2) ebenfalls einen deutlichen Isotopeneffekt. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der Hauptprozess der Fluoreszenzlöschung von ζ_m nicht durch den Lösungsmittelwechsel von H₂O zu D₂O beeinflusst wird. Dagegen werden der Aufbau und der Zerfall der langlebigeren Komponente in D₂O signifikant verlangsamt.

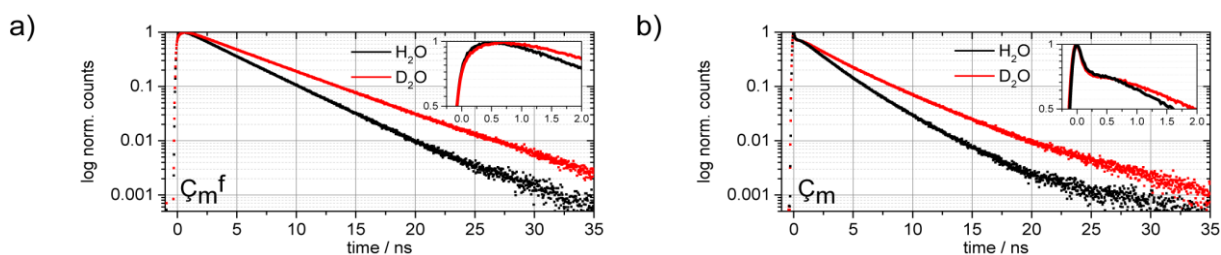


Abbildung 4.16. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m^f (a) und ζ_m (b) in H₂O (schwarz, pH 7,4) und D₂O (rot, pD 7,8).¹⁸⁸ Eingebettet ist jeweils eine Vergrößerung der ersten 2 ns dieser Messungen dargestellt.¹⁸⁵

4.2.1.4 pH-Wert-Abhängigkeit des Fluoreszenzspektrums sowie der Fluoreszenzlebensdauer von ζ_m

Wie schon erwähnt, wurde die pH-Wert-Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften des DNA-Labels ζ^f von Gardarsson et al. im Detail untersucht.⁸⁴ Es kann davon ausgegangen werden, dass ζ_m^f ein nahezu identisches Verhalten zeigt. Um nun den Einfluss des pH-Werts auf den Mechanismus des ζ_m -Fluoreszenzquenchings untersuchen zu können, wurde eine vergleichbare Studie für ζ_m durchgeführt.

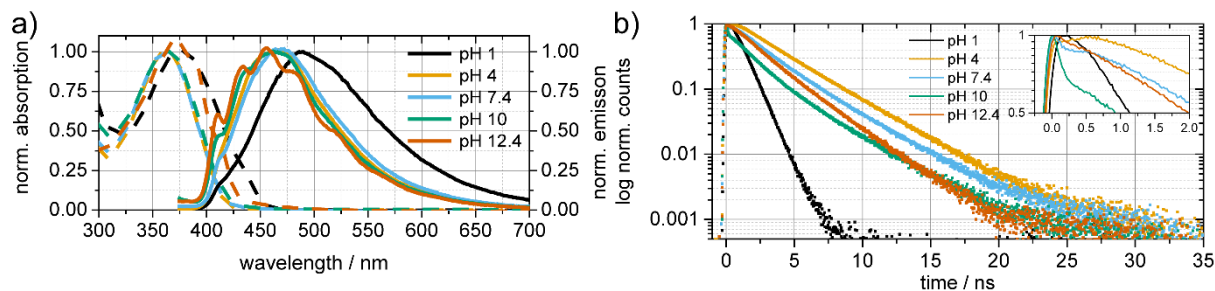


Abbildung 4.17. pH-Abhängigkeit des statischen Absorptions- und Emissionsspektrums (a) sowie des Fluoreszenzzerfalls (b) von ζ_m .¹⁸⁵

In Abbildung 4.17a sind die normierten statischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren von ζ_m in wässrigem Puffer bei fünf verschiedenen pH-Werten aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass die Spektren bei pH 4, pH 7,4 und pH 10 nahezu identisch sind. Dagegen sind sowohl das Absorptions- als auch das Fluoreszenzspektrum von ζ_m bei pH 1 deutlich bathochrom verschoben. Gleiches gilt für das Absorptionsspektrum von ζ_m bei pH 12,4. Allerdings ist der Effekt in diesem Fall kleiner als bei pH 1. Außerdem weist das Fluoreszenzspektrum von ζ_m bei pH 12,4 eine ausgeprägte Feinstruktur auf. Eine sehr ähnliche Beobachtung wurde auch von Gardarsson et al. für den Fall des deprotonierten ζ^f -Labels gemacht.⁸⁴

Die pH-Wert-Abhängigkeit der ζ_m -Fluoreszenzlebensdauer ist in Abbildung 4.17b gezeigt. Anhand der normierten Zerfallskurven ist zu erkennen, dass das Verhältnis zwischen der ps- und der ns-Zerfallskomponente abhängig vom pH-Wert ist. So ist die ps-Komponente bei pH 10 am stärksten ausgeprägt, während dies für die ns-Komponente bei pH 4 gilt. Allerdings ist kein pH-abhängiger Trend zu erkennen, weshalb kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Protonierungsgrad und dem Fluoreszenzquenchingmechanismus des ζ_m -Labels hergestellt werden kann.

Der Zerfall von ζ_m bei pH 1 unterscheidet sich allerdings deutlich von allen anderen Zerfällen. Da aber auch das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum dieser Probe deutlich bathochrom verschoben sind, ist davon auszugehen, dass in dieser niedrigen pH-Region der Chromophorteil des Labels größeren Veränderungen unterworfen ist.

4.2.1.5 Messungen der Phosphoreszenzlebensdauer

Wie schon weiter oben beschrieben wurde, zeigt sowohl ζ_m^f als auch ζ_m ein signifikantes Phosphoreszenzsignal bei einer Temperatur von 77 K. Um die Phosphoreszenzeigenschaften der beiden RNA-Label besser zu charakterisieren, wurden zeitaufgelöste Phosphoreszenzmessungen durchgeführt (Abbildung 4.18).

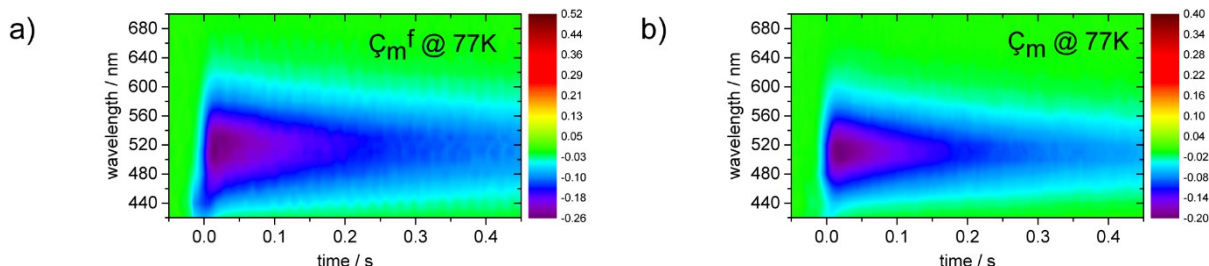


Abbildung 4.18. Transientenkarten der zeitaufgelösten Phosphoreszenzmessungen von ζ_m^f (a) und ζ_m (b) bei 77 K.¹⁸⁵

Wie in Abbildung 4.18 leicht zu erkennen ist, unterscheiden sich die Phosphoreszenzzerfälle von ζ_m^f und ζ_m kaum. Spektral erstrecken sich beide Signale im Bereich zwischen 440 nm und 600 nm, wobei das Maximum der ζ_m^f -Phosphoreszenz im Vergleich zur ζ_m -Phosphoreszenz minimal bathochrom verschoben ist. Vergleicht man den Verlauf der normierten Transienten im Signalmaximum (Abbildung 4.19), ist zu erkennen, dass das Phosphoreszenzsignal von ζ_m leicht schneller zerfällt als das entsprechende Signal von ζ_m^f .

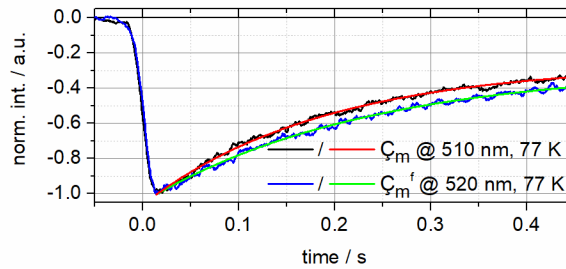


Abbildung 4.19. Zeitaufgelöste Phosphoreszenzmessungen von ζ_m (schwarz) und ζ_m^f (blau) bei 77 K. Dargestellt sind die Transienten der jeweiligen Phosphoreszenzmaxima inkl. der entsprechenden exponentiellen Anpassungen für ζ_m (510 nm, rot) und ζ_m^f (520 nm, grün).¹⁸⁵

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, also um die Phosphoreszenzlebensdauer der beiden RNA-Label zu bestimmen, wurden jeweils die Transienten im Signalmaximum mithilfe einer exponentiellen Funktion angepasst. Dabei ergab sich für ζ_m eine Phosphoreszenzlebensdauer von rund 190 ms, während für ζ_m^f eine Lebensdauer von rund 230 ns bestimmt wurde. Dementsprechend ist zwar eine Unterscheidung zwischen beiden Proben über die Phosphoreszenzlebensdauer möglich, allerdings sind die beobachteten Unterschiede zu klein, um daraus klare Rückschlüsse auf den Fluoreszenzquenchingmechanismus von ζ_m ziehen zu können. Es kann also davon ausgegangen werden, dass, zumindest bei 77 K, auch die Triplettlebenszeiten von ζ_m^f und ζ_m ähnlich sind. Dies macht ein ISC als Fluoreszenzquenchingmechanismus bzw. ein Triplett als nichtfluoreszierenden Zwischenzustand unwahrscheinlich.

4.2.1.6 Transiente Absorptionsmessungen

Besonders interessant bezüglich der Photophysik der RNA-Label ζ_m und ζ_m^f im Allgemeinen und bezüglich des Fluoreszenzquenchingmechanismus von ζ_m im Besonderen ist die Kurzzeitdynamik der beiden Proben. Dementsprechend wurden für beide Label transiente Absorptionsmessungen durchgeführt (Abbildung 4.20, Abbildung 4.21, Abbildung 4.22).

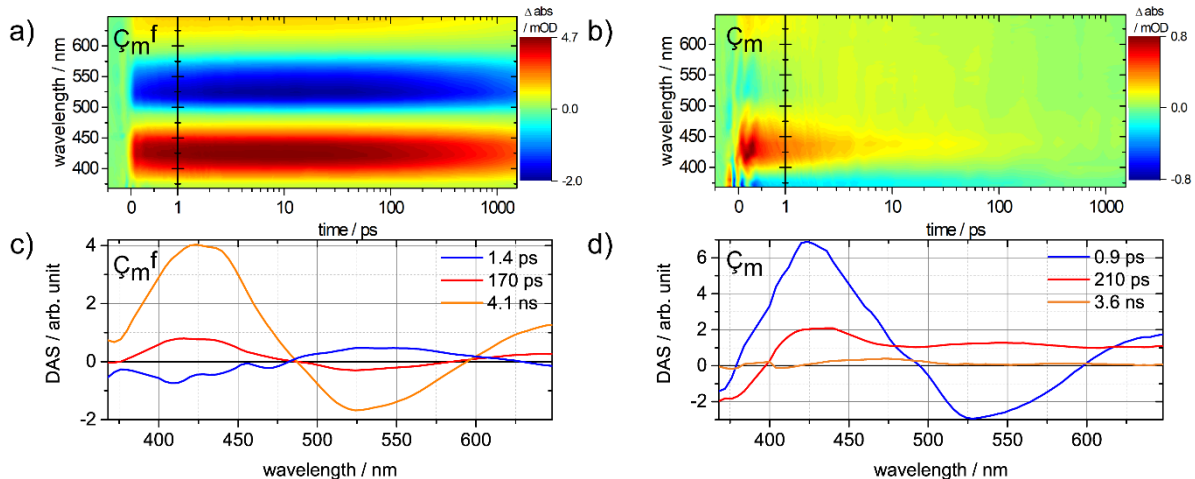


Abbildung 4.20. Transiente Absorptionsmessungen von ζ_m^f und ζ_m . Transiente Karten von ζ_m^f (a) und ζ_m (b). Zerfallsspektren (DAS) von ζ_m^f (c) und ζ_m (d).¹⁸⁵

Im Fall von ζ_m^f konnten dabei drei verschiedene transiente Absorptionsänderungen im untersuchten Spektralbereich zwischen 370 nm und 650 nm identifiziert werden (Abbildung 4.20a, c). So ist jeweils eine positive Bande im Bereich zwischen 370 nm und 490 nm sowie zwischen 590 nm und 680 nm festzustellen. Beide Banden können als Absorption der angeregten Zustände (*excited-state absorption*, ESA) interpretiert werden. Zwischen den beiden ESA-Signalen, also im Bereich von 490 nm bis 590 nm, befindet sich ein negatives Signal. Dementsprechend liegt es in etwa im Bereich des statischen Fluoreszenzspektrums, wobei hier berücksichtigt werden muss, dass das negative Signal offensichtlich vom breiten positiven ESA-Signal überlagert wird. Deshalb kommt es zur teilweisen Kompensation des Signals, was dessen Form sowie die Lage des Signalmaximums im Vergleich zum statischen Fluoreszenzspektrum leicht verändert. Trotzdem kann das Signal klar dem Prozess der stimulierten Emission zugeordnet werden. Dagegen kann kein negatives Signal ausgemacht werden, das dem

Grundzustandsbleichen (*ground state bleach*, GSB) zugeordnet werden könnte. Es ist davon auszugehen, dass dieses Signal komplett von dem hochenergetischen ESA-Signal überlagert wird.

Betrachtet man den transienten Signalverlauf, fällt zunächst auf, dass alle Signale direkt nach der Photoanregung auftreten und innerhalb der ersten 10 ps minimal an Intensität gewinnen. Anschließend ist ein langsamerer Zerfall aller Signale zu beobachten, der innerhalb des Messfensters noch nicht abgeschlossen ist. Um diese Dynamik nach der Photoanregung des Fluorophors genauer beschreiben zu können, wurden die gemessenen Daten mittels einer multiexponentiellen Zerfallsfunktion global angepasst. Dabei war es möglich, die Daten mittels dreier Zeitkonstanten zu beschreiben. Die entsprechenden zerfallsassoziierten Spektren (*decay associated spectra*, DAS) sind in Abbildung 4.20c dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die kleinste Zeitkonstante mit 1,4 ps den Aufbau der Signale beschreibt. Dazu kommt es wahrscheinlich durch einen internen Relaxationsprozess des Moleküls nach der Anregung. Die verbleibenden zwei Zeitkonstanten beschreiben mit 170 ps und 4,1 ns den langsameren Signalabbau. Wobei direkt auffällt, dass die langsamere der beiden Zeitkonstanten genau der mittels TCSPC bestimmten Fluoreszenzlebensdauer entspricht. Allerdings ist die Bestimmungsgenauigkeit dieser langen Zeitkonstante mittels transientser Absorption sehr limitiert, da der komplette Signalzerfall nicht innerhalb des Messfensters liegt. Entsprechend muss man für diese Zeitkonstante einen Fehler von $\pm 10\%$ annehmen.

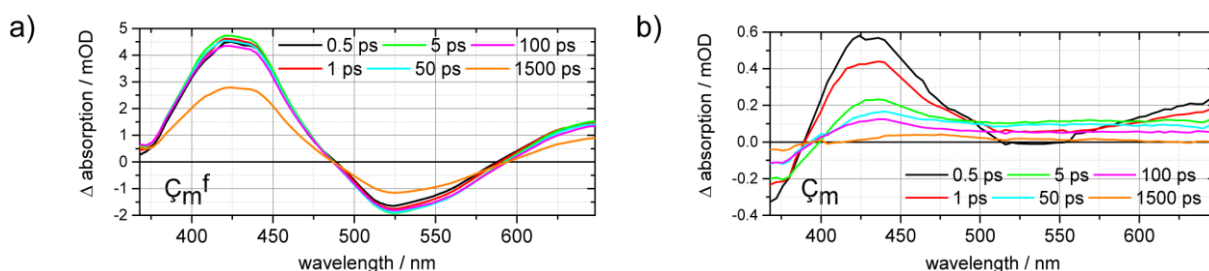


Abbildung 4.21. Ausgewählte Zeitschnitte der transienten Absorptionsmessung von ζ_m^f (a) und ζ_m (b).¹⁸⁵

Die transiente Absorptionsmessung des Spinlabels ζ_m weist dagegen vier transiente Signale im Bereich zwischen 370 nm und 650 nm auf (Abbildung 4.20b, d), obwohl insgesamt festgestellt werden kann, dass sich die spektralen Positionen der verschiedenen Signalbanden nicht signifikant von den entsprechenden Positionen bei ζ_m^f unterscheiden. Dementsprechend kann auch für ζ_m eine breite ESA im Bereich von 400 nm bis 680 nm beobachtet werden. Dieses Signal ist allerdings von einem schnell abfallenden SE-Signal zwischen 490 nm und 590 nm überlagert. Im Vergleich zu ζ_m^f sind die Amplituden der ESA und der SE im Fall von ζ_m deutlich schwächer. Deswegen ist in der transienten Messung der ζ_m -Absorption auch das Grundzustandsbleichen (*ground state bleach*, GSB) deutlich als negatives Signal zwischen 370 nm und 400 nm zu erkennen. Dementsprechend kommt es hier nicht zu einer vollständigen Kompensation dieses Signals durch die Überlagerung der ESA.

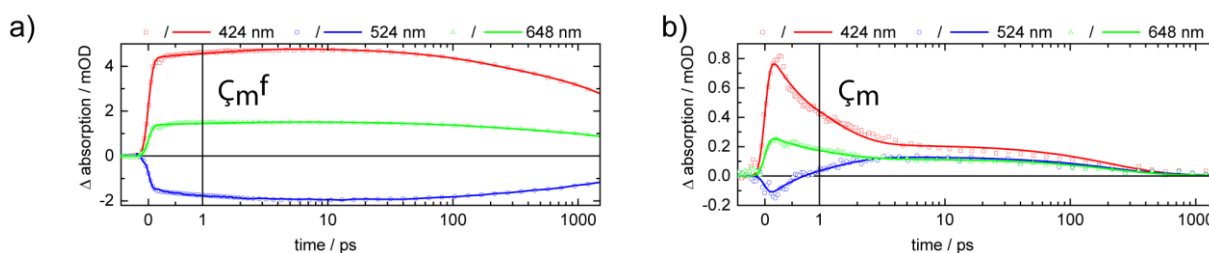


Abbildung 4.22. Ausgewählte Transienten der transienten Absorptionsmessung von ζ_m^f (a) und ζ_m (b).¹⁸⁵

Als größter Unterschied zwischen den transienten Absorptionsmessungen von ζ_m und ζ_m^f kann festgestellt werden, dass das Signal von ζ_m deutlich schneller abgebaut wird. Dies zeigt sich auch deutlich in den angepassten Zeitkonstanten, wobei allerdings auch für ζ_m eine Anpassung mit drei exponentiellen Funktionen möglich war. Hierbei beschreibt die kürzeste Zeitkonstante von 0,9 ps den kompletten Signalzerfall der SE sowie den Hauptteil des ESA-Zerfalls. Besonders eindrücklich ist dies anhand einzelner Transienten zu erkennen, wie sie in Abbildung 4.22 aufgetragen sind. Hier ist zu erkennen, dass das Signal direkt nach der Photoanregung relativ stark ist, dann aber sehr schnell innerhalb der ersten Picosekunde abklingt. Dementsprechend ist der SE-Zerfall des nichtfluoreszenten ζ_m ungefähr drei Größenordnungen schneller als der entsprechende Signalzerfall des Fluorophors ζ_m^f . Hier zeigt sich also deutlich die Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung im Fall von ζ_m .

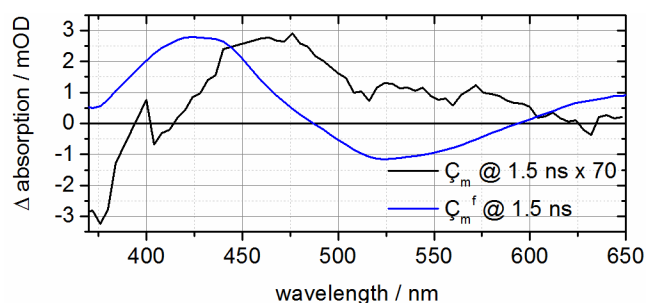


Abbildung 4.23. Vergleich der Zeitschnitte von ζ_m (schwarz) und ζ_m^f (blau) bei 1,5 ns.¹⁸⁵

Nach dem initialen schnellen Signalabbau durch die Fluoreszenzlöschung bleiben relativ schwache ESA- und GSB-Signale bestehen. Diese Signale zerfallen nun deutlich langsamer, wobei zur Beschreibung dieses Zerfalls zwei Zeitkonstanten mit 210 ps und 3,6 ns nötig sind. Allerdings ist die Amplitude der größten Zeitkonstante sehr gering, wie leicht anhand der entsprechenden DAS erkannt werden kann. Trotzdem kann diese langlebige, positive Signalkomponente nicht vernachlässigt werden. Das Signal besteht noch deutlich über das Messfenster hinaus, wie anhand der Zeitschnitte in Abbildung 4.23 leicht zu sehen ist. Gleichzeitig ist mittels dieser Darstellung zu beobachten, dass das Maximum des ESA-Signals von ca. 420 nm leicht bathochrom zu ca. 460 nm verschoben ist.

Insgesamt kann für die transienten Absorptionsmessungen festgestellt werden, dass die Ergebnisse in Einklang mit den Quantenausbeutebestimmungen sowie mit den zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten sind. Die effiziente Fluoreszenzlöschung im Fall von ζ_m kann direkt als schneller Abbau des SE-Signals beobachtet werden.

4.2.1.7 Quantenchemische Rechnungen

Dr. Daniel Lefrancois (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Dreuw, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg) hat eine Reihe quantenchemischer Rechnungen für ζ_m und ζ_m^f durchgeführt und ausgewertet. Die Interpretation der entsprechenden Ergebnisse wurde in enger Kooperation mit ihm geleistet, die Rechnungen unterstützen die Diskussion des Fluoreszenzquenchingmechanismus des Spinlabels ζ_m . Deshalb sollen die Ergebnisse hier kurz vorgestellt werden, was mit Dr. Daniel Lefrancois' freundlicher Genehmigung geschieht.¹⁸⁵

In Tabelle 4.7 sind die vertikalen Anregungsenergien von ζ_m^f und ζ_m zusammengefasst. Diese wurden ausgehend vom jeweiligen Singulett- (ζ_m^f , S_0) bzw. Dublettgrundzustand (ζ_m , D_0) berechnet. Für den ersten angeregten Zustand (S_1) des ζ_m^f -Labels ergaben sich dabei eine Anregungsenergie von 4,36 eV sowie eine Oszillatorstärke von 0,3. Der S_1 -Zustand lässt sich dadurch klar dem oben beschriebenen Maximum des Absorptionsspektrums bei 362 nm zuordnen. Für ζ_m konnte, mit dem zweiten angeregten Dublettzustand (D_2), ein nahezu identischer Zustand festgestellt werden. Der D_2 -Zustand weist eine Anregungsenergie von 4,32 eV und eine Oszillatorstärke von 0,29 auf und entspricht damit ebenfalls dem Maximum des ζ_m -Absorptionsspektrums. Der ζ_m^f - S_1 -Zustand entspricht also dem ζ_m - D_2 -Zustand. Dies lässt sich auch leicht anhand der Differenzzustandsdichten der beiden angeregten Zustände erkennen, wie sie in Tabelle 4.7 dargestellt sind. Hier zeigt sich, dass die elektronische Struktur der beiden Zustände identisch sowie typisch für π - π^* -Zustände ist. Gleiches gilt auch für die entsprechend höheren Zustände wie z.B. S_2 und D_3 . Auch diese Zustände sind elektronisch weitestgehend identisch (π - π^*), weisen allerdings verschwindend geringe Oszillatorstärken auf und sind dementsprechend für die weitere Diskussion nicht ausschlaggebend.

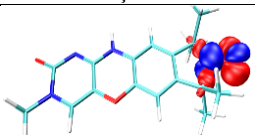
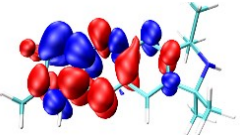

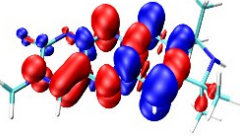
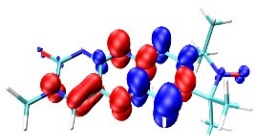
Tabelle 4.6. Vertikale Anregungsenergien (ω), Charakterisierung des Spinzustands durch $\langle \hat{S}^2 \rangle$ und die entsprechende Oszillatorstärke (f) des niedrigsten angeregten Zustandes von ζ_m^f und ζ_m . Bei den Rechnungen wurde von den S_0 - bzw. den D_0 -Grundzustandsgeometrien ausgegangen.¹⁸⁵

Zustand	E/eV [nm]		$\langle \hat{S}^2 \rangle$	f	
	ζ_m^{fb}	ζ_m^a		ζ_m^{fb}	ζ_m^a
D ₁	-	4,02 [308]	1,70	-	0,00
S ₁ /D ₂	4,36 [284]	4,32 [287]	1,09	0,30	0,29
S ₂ /D ₃	4,97 [249]	6,32 [196]	0,91	0,06	0,07
T ₁ /Q ₁	3,09 [401]	2,91 [426]	3,75	0,00	0,00
T ₂ /Q ₂	3,73 [323]	3,58 [346]	2,75	0,00	0,00

^a Berechnet mittels der SF-TDDFT-Methode und einer Quartettreferenz. ^b Berechnet mittels der konventionellen TDDFT-Methode. ^c Der erwartete Wert für die spin-reinen Dublett- bzw. Quartettwellenfunktion ist 0,75 bzw. 3,75 ($S^2=S(S+1)$).

Allerdings gibt es für den ζ_m -D₁-Zustand keine Entsprechung in ζ_m^f . Beim D₁-Zustand handelt es sich also quasi um einen zusätzlichen Zustand, der nur im Spinlabel ζ_m vorkommt. Der Zustand hat eine Anregungsenergie von 4,02 eV, aber praktisch keine Oszillatorstärke. Daher zeigt dieser Zustand keine Absorption im UV/vis-Bereich, weshalb man hier von einem dunklen, also nicht sichtbaren Zustand sprechen kann. Wie anhand von Tabelle 4.7 zu erkennen ist, handelt es sich dabei außerdem um einen typischen n- π^* -Zustand, der komplett auf der Nitroxidgruppe lokalisiert ist.

Tabelle 4.7. Dichtedifferenzen der niedrigsten angeregten Zustände von ζ_m^f und ζ_m . Die Abbildungen stellen die Änderung der Elektronendichte, ausgelöst durch die Anregung aus dem elektronischen Grundzustand zum entsprechenden angeregten Zustand, dar. Blau entspricht negativen Änderungen, während rot für positive Änderungen steht. Die Art des jeweiligen Übergangs ist in Klammern angegeben.¹⁸⁵

Zustand	ζ_m^f	ζ_m
D ₁ (n- π^*)	-	
S ₁ (π - π^*)/ D ₂ (π - π^*)		
S ₂ (π - π^*)/ D ₃ (π - π^*)		

Um darüber hinaus Aussagen über die Fluoreszenzeigenschaften der beiden RNA-Label treffen zu können, wurden die Gleichgewichtsstrukturen des S₁- sowie des D₂-Zustandes, also der jeweils fluoreszierenden Zustände, optimiert. Da diese Zustände fast ausschließlich im starren, aromatischen Bereich der Label zu finden sind, verändert sich die Gleichgewichtsstruktur nur gering. Die Label bleiben also weitgehend planar, da es nur zu geringen geometrischen Änderungen kommt. Die, basierend auf den Gleichgewichtsgeometrien, berechneten vertikalen Anregungsenergien entsprechen den Fluoreszenzenergien der Label. Dabei geht man von Fluoreszenz aus den jeweiligen Zustandsminima aus. Für ζ_m^f ergibt sich dadurch eine Energie von 3,66 eV und für ζ_m eine Energie von 3,69 eV. Dies entspricht wiederum einem Stokes-Shift von rund 0,7 eV, was in sehr guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert 0,73 eV (5890 cm⁻¹) ist. Dies deutet darauf hin, dass das beobachtete Fluoreszenzsignal von ζ_m^f bzw. ζ_m vom S₁- bzw. dem D₂-Zustand herrührt.

Das statische Dipolmoment dieses angeregten Zustandes beträgt 5,1 Debye. Der Wert ist annähernd identisch mit dem statischen Dipolmoment des Grundzustandes von 5,3 Debye. Entsprechend gibt es keine Hinweise auf einen Ladungstransferzustand (CT).

4.2.1.8 Photophysikalischer Vergleich der Label und Vorschlag des ζ_m -Fluoreszenzquenchingmechanismus

In diesem Unterkapitel sollen kurz die Hauptpunkte der obigen Ergebnisse zu den photophysikalischen Eigenschaften der RNA-Label ζ_m^f und ζ_m zusammengefasst und verglichen werden. Dieser Vergleich ermöglicht im Anschluss eine detaillierte Diskussion des Fluoreszenzquenchingmechanismus des Spinlabels ζ_m . Hierbei wird der zusätzliche D₁-Zustand des ζ_m -Labels im Detail diskutiert und in diesem Zusammenhang ein Quenchingmechanismus der ζ_m -Fluoreszenz vorgeschlagen.

Bei dem RNA-Label ζ_m^f handelt es sich um einen Fluorophor mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 38% und einer Fluoreszenzlebensdauer in der ns-Region. Hierbei ist auffällig, dass sich der Fluoreszenzzerfall nicht monoexponentiell beschreiben lässt, sondern von zwei Zerfallskomponenten in der ns-Region bestimmt wird. Diese beiden Zerfallskomponenten zeigen dabei allerdings eine signifikante Lösungsmittelabhängigkeit.

Andererseits ist der RNA-Spinlabel ζ_m mit einer Fluoreszenzquantenausbeute unterhalb von 1% faktisch nicht fluoreszent. Dies manifestiert sich auch in der ζ_m -Fluoreszenzlebenszeit, die sich in der ps-Region bewegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese schnelle und effiziente Fluoreszenzlöschung weitgehend unabhängig von Lösungsmiteleinflüssen ist. Allerdings zeigen die Fluoreszenzlebensdauermessungen neben dieser schnellen ps-Zerfallskomponente auch zwei sehr schwache ns-Zerfallskomponenten. Diese ähneln, sowohl vom Wert als auch vom Lösungsmittelverhalten her, stark den beiden Hauptzerfallskomponenten des ζ_m^f -Labels. Ähnlich lange ($>1,5$ ns), aber schwache Signalzerfälle (ESA) konnten auch mittels transienten Absorptionsmessungen festgestellt werden.

ζ_m und ζ_m^f zeigen also große Unterschiede in den Fluoreszenzquantenausbeuten und der jeweiligen Photodynamik. Bemerkenswert ist allerdings, dass Form und Lage der statischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren ununterscheidbar sind. Entsprechend gilt dies natürlich auch für die vertikalen Anregungsenergien, die mittels quantenchemischer Rechnungen bestimmt wurden. Diese beschriebene starke strukturelle und spektrale Ähnlichkeit bei einer gleichzeitig sehr deutlichen Löschung der Fluoreszenz ist sehr typisch für FNRO-Verbindungen.⁵⁷ Allerdings lassen sich mit den üblicherweise beschriebenen Fluoreszenzquenchingmechanismen für FNRO-Verbindungen nicht alle quantenchemischen und spektroskopischen Befunde für ζ_m erklären. Dementsprechend musste davon ausgegangen werden, dass hier ein neuer bzw. ein nicht in diesen Details beschriebener Mechanismus vorliegt. Anhand der quantenchemischen Rechnungen wurde diesbezüglich schnell klar, dass der dunkle Dublettzustand (D_1), der keine Entsprechung in ζ_m^f aufweist, eine wesentliche Rolle bei der Fluoreszenzlöschung von ζ_m spielen muss. Offenbar wird dieser Zustand schnell und effektiv bevölkert, was zur Löschung der Fluoreszenz führt. Allerdings blieb zunächst offen, über welchen photophysikalischen Prozess dieser Zustand bevölkert wird und ob dies der einzig mögliche bzw. einzig auftretende Mechanismus ist. Um dies zu klären, müssen zunächst die photophysikalischen Eigenschaften beider Label im Detail verglichen werden, wobei ausgenutzt wird, dass beide Label den gleichen Chromophor besitzen.

4.2.1.8.1 Photophysikalische Charakterisierung von ζ_m^f

Durch die quantenchemischen Rechnungen konnte gezeigt werden, dass für ζ_m^f eine Anregung aus dem Singulettgrundzustand (S_0) in den ersten angeregten Singulettzustand (S_1) möglich ist. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Energie des ersten angeregten Singulettzustandes annähernd mit der Energie des dritten Triplettzustandes (T_3) identisch ist. Allerdings ist trotzdem ein ISC sehr unwahrscheinlich, da beide Zustände π - π^* -Anregungen entsprechen.

Die Fluoreszenzlebensdauermessungen zeigen zwei Zerfallskomponenten in der ns-Region. Die längere dieser beiden Komponenten (τ_1) dominiert den Signalzerfall in polaren, aprotischen und protischen Lösungsmitteln. Im Fall dieser Lösungsmittel kann davon ausgegangen werden, dass es zu vielen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und dem Label kommt. Dagegen ist, im Fall von apolaren aprotischen Lösungsmitteln, der Beitrag der beiden ns-Zerfallskomponenten (τ_1 , τ_2) ähnlich groß. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass τ_1 sowohl von spezifischen als auch von unspezifischen Wechselwirkungen beeinflusst wird. Dagegen scheint τ_2 nur von unspezifischen Lösungsmittelwechselwirkungen betroffen zu sein. Außerdem lassen die zwei Zerfallskomponenten natürlich auf mindestens zwei getrennte fluoreszente angeregte Zustände oder Konformationen des Labels schließen, wobei jeweils eine Zerfallszeit einem Zustand zugeordnet werden kann. Allerdings war eine klare Zuordnung oder Identifizierung dieser Zustände nicht möglich: So konnte zum Beispiel die Bevölkering eines lokal angeregten Zustands (*locally excited state*, LE) und eines Ladungstransferzustands (*charge transfer state*, CT) durch die quantenchemischen Rechnungen ausgeschlossen werden. Als weitere Erklärung für den biexponentiellen Fluoreszenzzerfall könnten auch zwei unterschiedliche Konformationen des Moleküls herangezogen werden.⁵¹ Allerdings würde man in diesem Fall zumindest leicht unterschiedliche Emissionsspektren für die verschiedenen Konformationen erwarten. Da aber eine solche Beobachtung nicht gemacht werden konnte, kann auch dieses Erklärungsmodell ausgeschlossen werden. Dagegen ist eine Unterscheidung zwischen den beiden Zuständen über spezifische Lösungsmittelwechselwirkungen möglich. So müssen die beobachteten H/D-Effekte mit der Ausbildung oder der Veränderung von Wasserstoffbrücken bzw. der De-/Protonierung des Chromophors (z.B. an Position N3, vgl. Abbildung 2.1) verknüpft sein. Dadurch werden die Stabilisierung und die Bevölkering des Zustandes mit der τ_1 -Lebenszeit beeinflusst. Eine nähere Beschreibung der τ_1 -Komponente und vor allem der τ_2 -Komponente sowie der entsprechenden Zustände war allerdings nicht möglich. Es kann, zumindest in wässrigen Lösungsmitteln, davon ausgegangen werden, dass τ_1 den Zerfall dominiert, während der Beitrag von τ_2 zum Gesamtzerfall verschwindend

gering ist und somit weitestgehend ignoriert werden kann. Dementsprechend wird in der Folge ausschließlich τ_1 als die Fluoreszenzlebenszeit des lösungsmittelrelaxierten S_1 -Zustands ($S_{1\text{solv}}$) diskutiert.

4.2.1.8.2 Modell der ζ_m^f -Photodynamik

Ausgehend von den oben beschriebenen Beobachtungen und der entsprechenden Interpretation der Ergebnisse ergibt sich folgendes Modell für die Photodynamik des ζ_m^f -Labels in wässrigem Puffer (Abbildung 4.24a): ζ_m^f kann zunächst vom Grundzustand S_0 am Franck-Condon-(FC-)Punkt in die S_1 -Potentialhyperfläche angeregt werden. Ausgehend vom FC-Punkt kommt es dann zu internen Relaxationsprozessen bis zum niedrigsten S_1 -Schwingungszustand (TAS: 1,4 ps). Der der S_1 -Zustand interagiert mit dem Lösungsmittel (Lösungsmittelrelaxation, TAS: ca. 200 ps; TCSPC: 300 ps). Dadurch wird der $S_{1\text{solv}}$ -Zustand bevölkert, welcher wiederum strahlend und nichtstrahlend in den Grundzustand S_0 entvölkert wird (TCSPC und TAS: 4,1 ns).

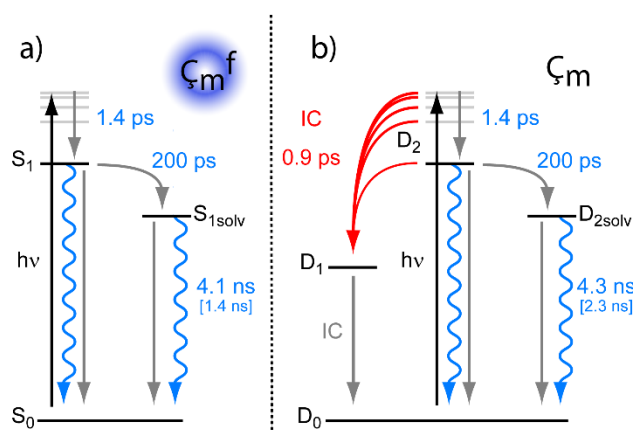


Abbildung 4.24. Photodynamik von ζ_m^f (a) und ζ_m (b). Strahlende Übergänge sind als blaue, gewellte Pfeile und nichtstrahlende Übergänge als graue oder rote Pfeile dargestellt.¹⁸⁵

4.2.1.8.3 Modell der ζ_m -Photodynamik und Fluoreszenzquenchingmechanismus

Außerdem ergibt sich auch ein Modell für die Photodynamik des ζ_m -Labels in wässrigem Puffer (Abbildung 4.24b): Zunächst befindet sich ζ_m im Dublettgrundzustand D_0 . Die Anregung in den D_1 -Zustand ist Dipolverboten, da es sich dabei um eine $n-\pi^*$ -Anregung handeln würde. Die Anregung in den D_2 -Zustand ist dagegen erlaubt. Hierbei ist zu beachten, dass der D_2 -Zustand energetisch dem ζ_m^f - S_1 -Zustand entspricht. Die Energie des D_2 -Zustandes ist außerdem sehr ähnlich der Energie des vierten Quartettzustandes Q_4 . Allerdings ist auch hier, vergleichbar zur Situation bei ζ_m^f , ein ISC vom D_2 -Zustand in angeregte Quartettzustände nicht möglich, da dies die Drehimpulserhaltung verletzen würde (El-Sayed-Regel).¹³¹ Dagegen ist aber ein ISC vom D_1 -Zustand in einen Quartettzustand Q_n erlaubt.

Wie schon oben erwähnt, ist der Hauptunterschied zwischen ζ_m und ζ_m^f die Existenz des dunklen D_1 -Zustandes des ζ_m -Labels. Dieser Zustand hat keine Entsprechung in ζ_m^f . Die berechnete Energielücke zwischen dem D_2 - und dem D_1 -Zustand ist mit 0,3 eV relativ klein (SF-TDDFT). Deshalb kann, basierend auf dem Energielückengesetz (*energy gap law*)^{189,190}, davon ausgegangen werden, dass der D_1 -Zustand wahrscheinlich durch eine schnelle IC aus dem D_2 -Zustand bevölkert wird. Durch diesen schnellen Übergang vom emittierenden D_2 -Zustand in den spektroskopisch dunklen D_1 -Zustand wird also die $D_2 \rightarrow D_0$ -Fluoreszenz effektiv gelöscht.

Wie anhand der Dichtedifferenzen (Tabelle 4.7) leicht zu erkennen ist, ist der D_1 -Zustand fast ausschließlich auf der Nitroxidgruppe des ζ_m -Labels lokalisiert. Allerdings zeigt diese Gruppe keine nennenswerte Absorption im beobachteten UV/vis-Spektralbereich. Dementsprechend ist es nicht möglich, den D_1 -Zustand mittels UV/vis-spektroskopischen Methoden zu detektieren. Dadurch ist es auch nicht möglich, eine Aussage über die Lebensdauer dieses Zustands zu machen. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass auch der D_1 -Zustand durch einen IC in den D_0 -Zustand entvölkert wird. Alternativ ist aber auch ein ISC in höhere Quartettzustände Q_n möglich. Hinweise zur Entvölkerung des D_1 -Zustandes sind eventuell in der transienten Absorptionsmessung zu finden. Denn bei 1,5 ns, also am äußeren Ende des Messfensters, ist ein schwaches ESA-Signal zu erkennen. Dies könnte aus der $D_1 \rightarrow D_n$ -Absorption oder aus einer Quartettabsorption herrühren.

4.2.1.9 Diskussion des vorgeschlagenen Fluoreszenzquenchingmechanismus und Vergleich zu anderen Mechanismen

Um den oben vorgeschlagenen Mechanismus der Ç_m-Fluoreszenzlöschung zu verifizieren, werden in den folgenden Absätzen die ermittelten theoretischen und spektroskopischen Ergebnisse mit anderen etablierten Fluoreszenzquenchingmechanismen für FNRO-Verbindungen verglichen.

4.2.1.9.1 ISC

Ein typischer Fluoreszenzlöschungsmechanismus für FNRO-Verbindungen ist ein verstärktes ISC (EISC). Allerdings, wie schon weiter oben ausgeführt, konnte anhand der quantenchemischen Rechnungen gezeigt werden, dass ISC-Mechanismen im Fall von Ç_m unwahrscheinlich sind, da diese hier gegen die El-Sayed-Regel verstoßen würden.¹³¹ Trotzdem war bei einer Temperatur von 77 K ein Phosphoreszenzsignal messbar. Allerdings kann dieses eventuell auf die kontinuierliche Beleuchtung bei 77 K zurückgeführt werden, was zu einer Akkumulation von Quartettzustände führen könnte. Man kann also unter diesen Umständen eine schwache Bevölkerung der Quartettzustände über ISC nicht komplett ausschließen.

4.2.1.9.2 Ladungs- und Protonentransfer

Auch Ladungs- und Protonentransferprozesse können bei der Fluoreszenzlöschung von FNRO-Verbindungen eine entscheidende Rolle spielen. Allerdings konnte die sehr effektive Fluoreszenzlöschung im Fall von Ç_m bei allen getesteten Lösungsmitteln - ungeachtet der Lösungsmittelpolarität oder der Lösungsmittelprotizität - beobachtet werden. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Ladungs- und Protonentransferprozesse keinen entscheidenden Einfluss auf den Löschungsprozess haben.

Unabhängig von diesen experimentellen Beobachtungen sprechen auch TD-DFT-Rechnungen gegen einen Ladungstransferprozess als Hauptprozess der Fluoreszenzlöschung, denn es konnte kein Hinweis für einen Ladungstransferzustand (weder D₁- noch D₂-Zustand) gefunden werden.

Nichtdestotrotz war festzustellen, dass die Fluoreszenzeigenschaften inklusive der Fluoreszenzlöschung durchaus vom Lösungsmittel beeinflusst werden. Allerdings waren die Effekte in keinem Fall groß genug, um die Fluoreszenzlöschung signifikant aufzuheben. Betrachtet man diesbezüglich beispielhaft die Fluoreszenzzerfälle von Ç_m in H₂O und in D₂O, so ist festzustellen, dass diese sich nur in den ns-Komponenten (τ₁, τ₂) unterscheiden. Die ps-Zerfallskomponente (τ₃) wird dagegen nicht deutlich durch den H₂O/D₂O-Austausch beeinflusst.

Allerdings lässt dieses unterschiedliche Verhalten der ns- und der ps-Zerfallskomponenten auf mindestens zwei unterschiedliche Entvölkerungswege des D₂-Zustandes schließen. Ein Entvölkerungsweg scheint dabei zu effizientem Löschen der Fluoreszenz zu führen. Der andere Weg dagegen führt währenddessen zu einem nur schwach bevölkerten, aber emittierenden Zustand. Dieser zweite Zustand scheint im Großen und Ganzen stark dem emittierenden Zustand von Ç_m^f zu ähneln.

4.2.1.9.3 Förster- und Dexter-Mechanismus

In der bisherigen Diskussion wurde ζ_m als ein zusammenhängendes Molekül, also als ein Quantensystem betrachtet. Entsprechend ergaben sich die beschriebenen elektronischen Zustände mit Dublett- und Quartettmultiplizitäten. Dadurch war es, wie oben beschrieben, möglich, EISC, Ladungstransfer, Protonentransfer sowie Protonenaustausch als Fluoreszenzlöschmechanismen auszuschließen. Allerdings gibt es auch eine alternative Betrachtungsweise:

Wie leicht anhand der jeweiligen Differenzdichten zu erkennen, haben der D_2 - und der D_1 -Zustand praktisch keinen Überlapp. Der D_2 -Zustand befindet sich ausschließlich im Bereich des Chromophors, während der D_1 -Zustand klar an der Nitroxidgruppe lokalisiert ist. Dementsprechend könnte man ζ_m auch als zwei zwar strukturell verbundene, aber elektronisch unabhängige funktionelle Gruppen betrachten. In diesem Bild kann der Chromophor als unabhängiges Singulett und die Nitroxidgruppe als unabhängiges Dublett betrachtet werden. Davon ausgehend wiederum kann man Transferprozesse der Anregungsenergie vom D_2 - zum D_1 -Zustand als Förster- oder Dexter-Transfer diskutieren. In der hier beschriebenen Situation versteht man unter den Begriffen Folgendes:

- **Förster-Mechanismus:** Ein Elektron des angeregten Chromophors relaxiert aus dem D_2 -Zustand in den Grundzustand des Chromophors. Gleichzeitig wird aus dem Grundzustand der Nitroxidgruppe ein Elektron in den D_1 -Zustand der gleichen Gruppe angehoben.
- **Dexter-Mechanismus:** Ein Elektron wird vom angeregten Chromophor- D_2 -Zustand direkt in das niedrigste nichtbesetzte Orbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) der Nitroxidgruppe transferiert. Gleichzeitig wird ein Elektron des höchsten besetzten Nitroxidorbitals (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) in den Grundzustand des Chromophors transferiert.

Ein Förster-Energietransfer aus dem D_2 -Zustand der Nitroxidgruppe zum D_1 -Zustand des Chromophors kann allerdings weitestgehend als Quenchingmechanismus ausgeschlossen werden. Grund dafür ist, dass die Nitroxidgruppe keinen wesentlichen Beitrag zum Absorptionsspektrum des ζ_m liefert, also kein Absorptionsdipolmoment aufweist.⁷⁴ Dementsprechend kann es keinen effizienten FRET zwischen dem Chromophor und dem Nitroxid geben. Mit gleicher oder ähnlicher Argumentation wurde FRET auch im Fall einiger ähnlicher Verbindungen ausgeschlossen.^{59,62,63,68,69,72,76,191,192}

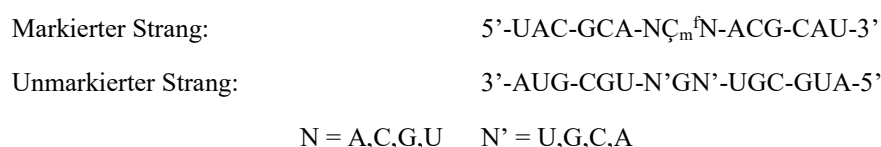
Für einen Dexter-Energietransfer bzw. Elektronenaustausch sollte der Abstand zwischen dem Chromophor (Donor) und dem Nitroxid (Akzeptor) geringer als 1 nm sein. Dies ist im Fall von ζ_m , durch die direkte Verbindung beider Gruppen, gegeben. Außerdem ist die Energiedifferenz zwischen dem D_2 - und dem D_1 -Zustand relativ klein. Entsprechend kann der oben beschriebene schnelle Übergang vom D_2 - in den D_1 -Zustand auch als Dexter-Energietransfer interpretiert werden.

4.2.2 Ç_m^f in RNA-Modellsequenzen

Nachdem die photophysikalischen Eigenschaften des Fluoreszenzlabels Ç_m^f in wässriger Lösung eingehend untersucht wurden, wurde Ç_m^f nun in RNA eingebaut. Zunächst soll hierbei mittels simpler RNA-Modellstränge der Einfluss der RNA auf die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors aufgeklärt werden. Umgekehrt soll auch die Frage beantwortet werden, inwieweit das Einbringen des Fluorophors die RNA stabilisiert oder destabilisiert. Allgemein dienen die Modellstränge dazu, die Stärken und Schwächen des Fluorophors im Hinblick auf den Einsatz in weiterführenden Hybridisierungs- und Ligandenbindungsstudien zu erkunden. Die entsprechenden Ergebnisse dieser Modellstudie dienen dann als Vergleichsmessungen (*benchmark*) für alle weiteren Experimente mit Ç_m^f und RNA.

Als RNA-Modellsequenz wurde eine einfach Ç_m^f-markierte palindromische RNA-Sequenz verwendet, die bereits im Rahmen einer ähnlichen Studie für das Fluoreszenzlabel 2-(1-Ethylpyren)-Adenosin (2PyA) eingesetzt wurde und sich dort bewährt hat.²⁷ Dies hat den Vorteil, dass die Ergebnisse der hier gezeigten Studie direkt vergleichbar mit der 2PyA-Studie sind.

Die Sequenz wurde so gewählt, dass sich stabile Doppelstränge (ds) aus einem markierten Strang und einem unmarkierten Gegenstrang bilden sollten. Bei den markierten Einzelsträngen (ss) handelte es sich um 15-mere, in deren Zentrum (Position 8) der Fluorophor platziert wurde. Die direkten Nachbarbasen des Fluorophors (N, Position 7 und 9) wurden für die verschiedenen Proben variiert, wobei Ç_m^f immer im Zentrum zweier identischer Basen stand. Durch die Variation der direkten Nachbarbasen sollte der Einfluss der direkten chemischen Umgebung auf die Photophysik des Labels untersucht werden. Die unmarkierten Gegenstränge waren entsprechend der markierten Stränge aufgebaut, weshalb auch hier die Basen an Position 7 und 9 (N') für die verschiedenen Proben variiert wurden.



Es ergaben sich acht verschiedene Proben (siehe Anhang, Tabelle 7.3), vier markierte Einzelstränge (ss_NÇ_m^fN), also ohne Gegenstrang, sowie vier markierte Doppelstränge (ds_NÇ_m^fN). Außerdem wurden noch die entsprechenden unmarkierten Stränge (ss_NCN, ds_NCN) untersucht, um den Einfluss des Fluorophors auf die Modellsysteme einschätzen zu können.

4.2.2.1 Statische Emissionsmessungen

Zur Charakterisierung der RNA-Modellsequenzen wurden zunächst statische Emissionsspektren aufgezeichnet sowie die Fluoreszenzquantenausbeute und die Fluoreszenzanisotropie der Proben bestimmt. Dabei zeigte sich zunächst, dass die Form der Emissionsspektren der markierten Einzel- und Doppelstränge nicht von den direkten Nachbarbasen beeinflusst ist. Die normierten Emissionsspektren der verschiedenen ss_NÇ_m^fN bzw. ds_NÇ_m^fN überlagern sich dementsprechend fast perfekt (Abbildung 4.25). Allerdings unterscheidet sich die spektrale Form aller Doppelstränge deutlich von der spektralen Form der markierten Einzelstränge. Die Emissionsspektren der Duplexe weisen eine Schwingungsfeinstruktur auf. Entsprechend sind Maxima bzw. Schultern bei 420 nm, 448 nm, 480 nm sowie bei 520 nm zu erkennen. Dieses Phänomen ist schon aus Studien mit Ç^f-markierten DNA-Strängen bekannt, wobei die Feinstruktur zur Identifizierung von Basenfehlpaarungen verwendet wurde.^{83,84} Die Feinstruktur steht in direktem Zusammenhang mit den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ç_m^f bzw. Ç^f und der entsprechenden Gegenbase im Doppelstrang. Dies konnte unter anderem über pH-Titration von Ç^f gezeigt werden. So zeigt der deprotonierte Fluorophor (speziell Position N5) in Lösung ebenfalls ein strukturiertes Emissionsspektrum.⁸⁴ Entsprechend ist es also möglich allein über die Form des Emissionsspektrums zwischen einem basengepaarten und einem nicht basengepaarten Ç_m^f zu unterscheiden.

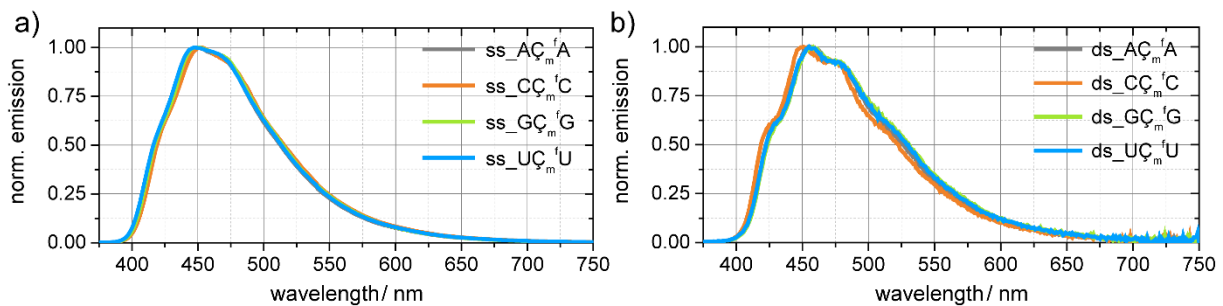


Abbildung 4.25. Normierte Emissionsspektren von ζ_m^f -markierten Einzel- (a) und Doppelsträngen (b) bei 20 °C.

Außerdem unterscheiden sich die jeweiligen Fluoreszenzquantenausbeuten (FQY) der markierten Einzel- und Doppelstränge deutlich voneinander (Tabelle 4.8). So weisen die markierten Doppelstränge im Mittel^u eine Fluoreszenzquantenausbeute von 24% auf, während die markierten Einzelstränge eine mittlere Fluoreszenzquantenausbeute von 44% zeigen. Im Vergleich zum freien Fluorophor in Lösung (FQY=38%) erhöht sich also die Fluoreszenzquantenausbeute von ζ_m^f durch den Einbau in einzelsträngige RNA, während die Fluoreszenzquantenausbeute in doppelsträngiger RNA reduziert wird. Außerdem wird die Fluoreszenzquantenausbeute im Fall der markierten Duplexe auch von den flankierenden Nachbarbasen des Fluorophors beeinflusst. So ist die Quantenausbeute bei benachbarten Purinbasen leicht höher als im Fall von benachbarten Pyrimidinbasen.

Die statische Fluoreszenzanisotropie der ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelstränge ist deutlich höher als die Anisotropie des freien Fluorophors in Lösung (Tabelle 4.8). Dies bestätigt den festen und starren Einbau des Fluorophors in die entsprechenden RNA-Oligonukleotide. Des Weiteren ist die Anisotropie der Doppelstränge systematisch höher (Faktor 1,4) als die Anisotropie der Einzelstränge. Außerdem ist festzustellen, dass die direkten Nachbarn des Labels einen schwachen Einfluss auf die Anisotropie haben, wobei sich allerdings kein klarer Trend ablesen lässt.

Tabelle 4.8. Fluoreszenzquantenausbeuten (FQY) und statische Fluoreszenzanisotropie (r_f) der ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelstränge bei 20 °C.

	Probe	FQY / %	r_f
Lsg.	ζ_m^f	38	0,04
ds	A ζ_m^f A	25	0,12
	C ζ_m^f C	22	0,14
	G ζ_m^f G	26	0,14
	U ζ_m^f U	22	0,17
ss	A ζ_m^f A	54	0,08
	C ζ_m^f C	39	0,11
	G ζ_m^f G	42	0,09
	U ζ_m^f U	41	0,09

4.2.2.2 Schmelzexperimente

Eine Destabilisierung bzw. eine Stabilisierung der Modellsequenzen durch den Einbau von ζ_m^f würde sich in einer deutlichen Veränderung des Schmelzpunkts der markierten Probe im Vergleich zu einer entsprechenden unmarkierten Probe zeigen. Entsprechend wurde das Schmelzverhalten der Proben mittels verschiedener Methoden genau beobachtet (Tabelle 4.9). Durch die Aufzeichnung von Absorptionsschmelzkurven kann der Schmelzpunkt der RNA-Sequenzen unabhängig vom Fluoreszenzlabel und dessen Position und Umgebung bestimmt werden. Hier ist also ein direkter Stabilitätsvergleich zwischen markierten und unmarkierten Proben möglich. Dagegen geben Fluoreszenzschmelzkurven ein wesentlich lokaleres Bild des Schmelzvorganges wieder, da die Fluoreszenzänderung direkt mit Änderungen in der Mikroumgebung des Fluorophors zusammenhängt. Der Fluorophor wird hier als lokale Sonde verwendet und kann eventuell spezifischere Informationen liefern als den globalen Schmelzpunkt.

^u Gemittelt über die vier verschiedenen Proben.

Die über die Absorption der RNA bei 260 nm aufgezeichneten Schmelzkurven zeigen einen typischen sigmoidalen Anstieg im Bereich des Schmelzpunktes. Die Schmelzkurve des unmarkierten Doppelstrangs ds_ACA ist beispielhaft im Methodenkapitel gezeigt (Kapitel 3.2.2).

Tabelle 4.9. Schmelztemperaturen der unmarkierten und markierten Modellsequenzen.

Probe	unmarkiert	markiert			$\Delta T_m/$ °C
	$T_{m_ab}/$ °C	$T_{m_ab}/$ °C	$T_{m_em}/$ °C	$T_{m_sr}/$ °C	
AÇ _m ^f A	70	67	67	45	3
CC _m ^f C	81	82	81	63	-1
GC _m ^f G	78	76	76	56	2
UC _m ^f U	70	72	70	56	-2

T_{m_ab} = Schmelzpunkt bestimmt über Absorptionsänderung bei 260 nm; T_{m_em} = Schmelzpunkt bestimmt über Emissionsänderung bei 460 nm; T_{m_sr} = Schmelzpunkt bestimmt über spektralaufgelöste Schmelzanalyse; $\Delta T_m = T_{m_ab}(\text{unmarkiert}) - T_{m_ab}(\text{markiert})$.

In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der Schmelzexperimente zusammengefasst. Vergleicht man zunächst nur die Schmelzpunkte, die über die Absorptionsänderung bei 260 nm bestimmt wurden (T_{m_ab}), ist festzustellen, dass sich die Schmelzpunkte der unmarkierten und der markierten Proben nur minimal unterscheiden. Mittels der Absorptionsschmelzkurven konnten auch die entsprechenden thermodynamischen Parameter bestimmt werden und vor allem die freie Enthalpie (ΔG) bei 37 °C berechnet werden (Tabelle 4.10). Dies erlaubt eine genauere Betrachtung der Stabilität der Proben. Auch für ΔG sind die Unterschiede (2–5 kcal/mol) zwischen den markierten und unmarkierten Strängen gering, entsprechen allerdings der Energie von 1–2,5 Wasserstoffbrückenbindungen (ca. 2 kcal/mol pro H-Brücke).^{193–196} Entsprechend muss also von einer leichten Destabilisierung der markierten Stränge ausgegangen werden, wobei allerdings zu beachten ist, dass sich auch der Fehler der ΔG -Bestimmung im Bereich von 2 kcal/mol bewegt.

Tabelle 4.10 Thermodynamische Parameter der unmarkierten und markierten Modellsequenzen.

Probe	unmarkiert			markiert			$\Delta\Delta G/$ kcal/mol
	$-\Delta H/$ kcal/mol	$-\Delta S/$ cal/(mol·K)	$-\Delta G/$ kcal/mol	$-\Delta H/$ kcal/mol	$-\Delta S/$ cal/(mol·K)	$-\Delta G/$ kcal/mol	
AÇ _m ^f A	102	272	18	56	140	13	-5
CC _m ^f C	95	245	20	59	141	15	-5
GC _m ^f G	90	231	18	54	129	14	-4
UC _m ^f U	94	248	17	70	177	15	-2

$\Delta\Delta G = \Delta G(\text{unmarkiert}) - \Delta G(\text{markiert})$.

Sowohl die markierten als auch die unmarkierten Proben mit einem erhöhten GC-Gehalt, also ds_CC_m^fC und ds_GC_m^fG, weisen einen leicht erhöhten Schmelzpunkt auf. Dies lässt sich durch die höhere Anzahl an Wasserstoffbrücken (H-Brücken) sowie größere Stapelwechselwirkungen innerhalb dieser Proben erklären, die zu einer größeren Stabilität der Duplexe führen. Dieser Zusammenhang lässt sich allerdings nicht mittels der bestimmten ΔG -Werte bestätigen.

Vergleicht man die über Absorptionsmessungen bestimmten Schmelzpunkte (T_{m_ab}) der markierten Stränge mit den entsprechenden über Emission (T_{m_em}) bestimmten Werten ist festzustellen, dass die Werte im Rahmen der Genauigkeit der Methode gleich sind. Dementsprechend ist auch hier eine leichte Schmelzpunkterhöhung bei ds_CC_m^fC und ds_GC_m^fG festzustellen. Aus diesem Vergleich kann geschlossen werden, dass die Modellstränge ein homogenes Schmelzverhalten zeigen. Die Basenpaarungen am Rand sowie im Zentrum der Stränge werden also gleichzeitig aufgelöst. Dieser Befund spricht ebenfalls dafür, dass der Fluorophor die Stabilität der RNA-Doppelstränge nicht verändert.

Die Emissionsschmelzkurven (Abbildung 4.26, Abbildung 4.27) zeigen, im Vergleich zu den Absorptionsschmelzkurven, eine komplexere Temperaturabhängigkeit. Im Fall der markierten Einzelstränge ist zunächst festzustellen, dass das Fluoreszenzsignal mit steigender Temperatur abnimmt (Abbildung 4.26a). Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Fluoreszenzlöschungsrates durch Kollisionen zurückzuführen. Gleichzeitig muss davon ausgegangen werden, dass die Flexibilität der Einzelstränge mit steigenden Temperaturen zunimmt. Dadurch kommt es zu stärkeren Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel. Die unterschiedlich starke Ausprägung der temperaturabhängigen Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der Nachbarbasen des Fluorophors hängt wahrscheinlich mit der Lösungsmittelabschirmung durch die Nachbarbasen zusammen. Während das Fluoreszenzsignal von ss_UC_m^fU vergleichsweise stark abgeschwächt wird, ist der Effekt im Fall

von $ss_G\zeta_m^fG$ nur sehr schwach. Außerdem ist im Fall von Pyrimidinen als Nachbarbasen des Labels sogar zunächst ein minimaler Signalanstieg im Temperaturbereich zwischen 20 °C und 50 °C zu beobachten. Dies kann eventuell mit konformationellen Änderungen aufgrund von höherer Beweglichkeit der Stränge bei höheren Temperaturen erklärt werden. Dadurch könnte der Fluorophor etwas besser vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt werden, was wiederum die Quantenausbeute erhöhen würde.

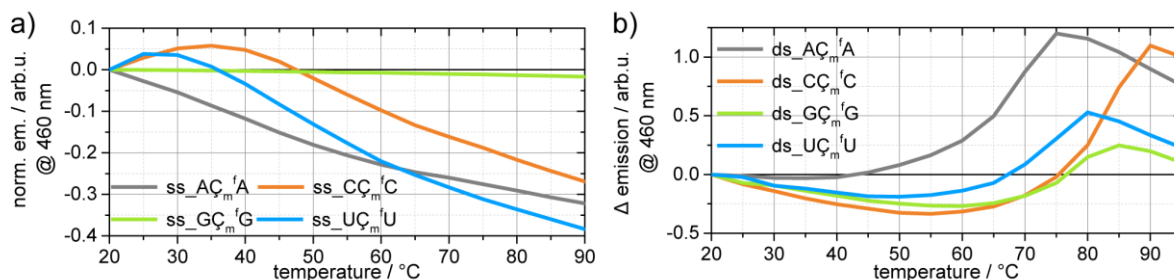


Abbildung 4.26. Fluoreszenzschmelzkurven (Nachweiswellenlänge 460 nm) der ζ_m^f -markierten Einzel- (a) und Doppelstränge (b). Die Kurven sind auf den Wert bei 20 °C normiert.

Im Fall der doppelsträngigen Proben ist zunächst ebenfalls eine Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Temperatur festzustellen (Abbildung 4.26b und Abbildung 4.27). Dies kann auch hier mit einer Vergrößerung der Flexibilität der RNA und einer Erhöhung der Kollisionsrate erklärt werden. Anschließend ist ein deutlicher und schneller Anstieg des Emissionssignals zu erkennen, der dem Schmelzprozess zugeordnet werden kann. Durch den größer werdenden Anteil an ungepaarter RNA bzw. ungepaartem Fluorophor steigt die Fluoreszenzquantenausbeute der Probe an. Im Laufe dieses Schmelzprozesses geht außerdem die oben beschriebene Feinstruktur des Emissionsspektrums verloren (Abbildung 4.27). Nach dem starken Signalanstieg schließt sich wieder ein schwächerer Signalzerfall an, der wieder auf Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und den nun vollständig aufgeschmolzenen Strängen zurückzuführen ist. Insgesamt kann man also im Fall der Emissionsschmelzkurven der markierten Doppelstränge ebenfalls einen sigmoidalen Signalanstieg beobachten, der allerdings von einem annähernd linearen Signalabfall überlagert ist.

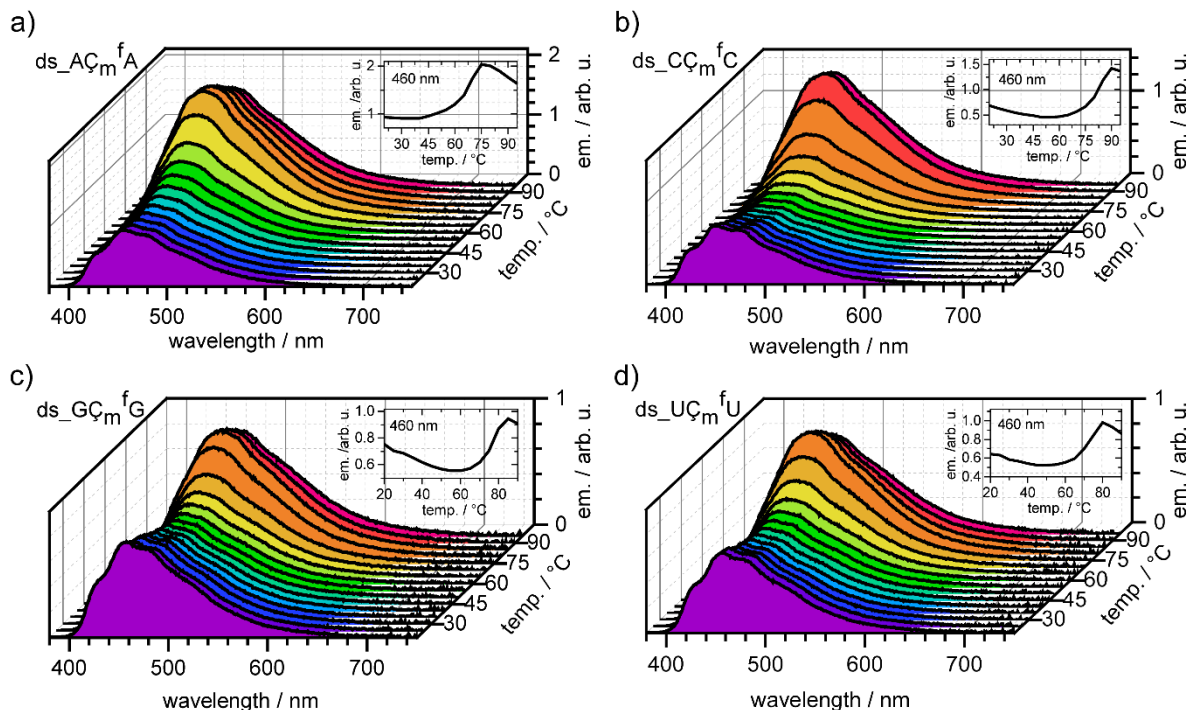


Abbildung 4.27. Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzspektrums der ζ_m^f -markierten Doppelstränge. a) $ds_A\zeta_m^fA$, b) $ds_C\zeta_m^fC$, c) $ds_G\zeta_m^fG$, d) $ds_U\zeta_m^fU$.

Das Verschwinden der Feinstruktur der Emissionsspektren der doppelsträngigen Proben wurde näher untersucht, indem Schmelzpunkte durch die Änderungen bei verschiedenen Nachweiswellenlängen bestimmt wurden. Dabei wurden die Wellenlängenmaxima der Feinstruktur verwendet. Wie in Tabelle 7.6 (siehe Anhang) zu sehen, hat die

Nachweiswellenlänge keinen Einfluss auf die ermittelten Schmelzpunkte. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass das Emissionssignal einer einheitlichen Änderung bei Temperaturerhöhung unterworfen ist. Die Emissionsfeinstruktur, die direkt mit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken verknüpft ist, sollte also auch gleichförmig reduziert werden. Dies ermöglicht eine weitere Auswertungsmethode (T_{m_sr}), um einen näheren Blick auf den Schmelzvorgang zu bekommen. Hierbei geht man in erster Näherung und zur Vereinfachung der Auswertung zunächst davon aus, dass bei 20 °C annähernd 100% der RNA-Stränge als Duplex vorliegen. Entsprechend kann die spektrale Form des Emissionsspektrums bei 20 °C als sog. Doppelstrangspektrum verwendet werden. Gleichzeitig sollten nach dem sigmoidalen Signalanstieg annähernd 100% einzelsträngige RNA vorliegen. Dementsprechend kann die spektrale Form des Emissionsspektrums mit dem größten Signal (größte Quantenausbeute) als sog. Einzelstrangspektrum verwendet werden. Ausgehend von diesen Annahmen sollten alle anderen Emissionsspektren der Schmelzexperimente als Linearkombination aus den beiden Reinspektren darstellbar sein (Abbildung 4.28a). Dadurch ist es möglich, die Mischspektren zu entfalten, um den jeweiligen Anteil an Doppelstrang- und Einzelstrangspektrum zu ermitteln. Für diese Aufgabe wurde ein kurzes MATLAB-Skript (siehe Anhang, Kapitel 7.1.2.3) entwickelt, welches eine nichtlineare Anpassung der Spektren nach der Methode der kleinsten Quadrate (*nonlinear least-squares fitting*) durchführt.

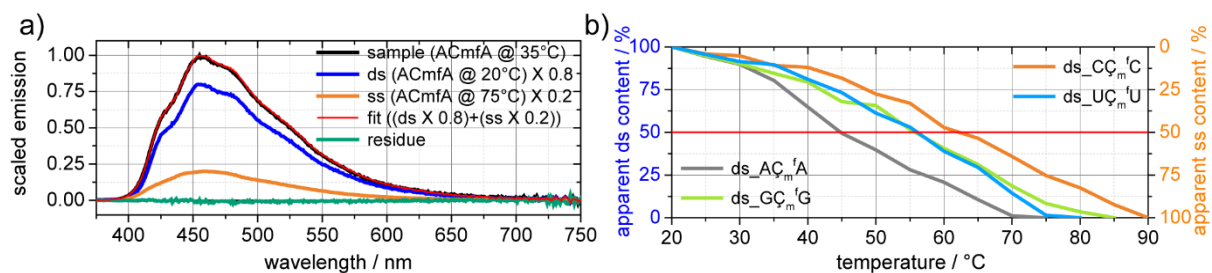


Abbildung 4.28. a) Beispiel einer sogenannten spektralaufgelösten Schmelzanalyse des Fluoreszenzspektrums von $ds_AC_m^fA$ bei 35 °C. b) Mittels spektralaufgelöster Schmelzanalyse ermittelte Temperaturabhängigkeit des Doppelstrang- bzw. Einzelstranganteils der vier markierten Doppelstrangproben.

Mithilfe dieser sogenannten spektralaufgelösten Schmelzanalyse (T_{m_sr}) war es möglich, einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen der Temperatur und dem Doppelstrang- bzw. Einzelstranggehalt einer Probe zu finden (Abbildung 4.28b). Deshalb sollte die Temperatur bei 50% Doppelstrang- bzw. 50% Einzelstrangspektrum dem Schmelzpunkt (T_{m_sr}) der Probe entsprechen. Allerdings zeigt sich dabei, dass die durch diese Methode bestimmten Schmelzpunkte 14–22 °C unterhalb der Schmelzpunkte zu finden sind, die über herkömmliche Schmelzpunktanalysemethoden bestimmt wurden. Eventuell kommt es an den, über die spektralaufgelöste Schmelzanalyse, ermittelten Temperaturen schon zur Auflösung der H-Brücken des Fluorophors, während andere Wechselwirkungen mit den Nachbarbasen und dem Gegenstrang weiterhin bestehen bleiben. Die so ermittelten Temperaturen würden demnach den ersten Schritt des Schmelzprozesses darstellen, was auch zu den herkömmlich aufgezeichneten Schmelzkurven passen würde.

4.2.2.3 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Wie schon oben erwähnt, wird die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors stark von dessen chemischer Umgebung beeinflusst. Dementsprechend verändert sich die Fluoreszenzlebensdauer von ζ_m^f deutlich durch den Einbau in RNA-Doppel- und RNA-Einzelstränge. Dies ist qualitativ recht deutlich durch den direkten Vergleich der jeweiligen Zerfälle (Abbildung 4.29 und Abbildung 4.30) festzustellen.

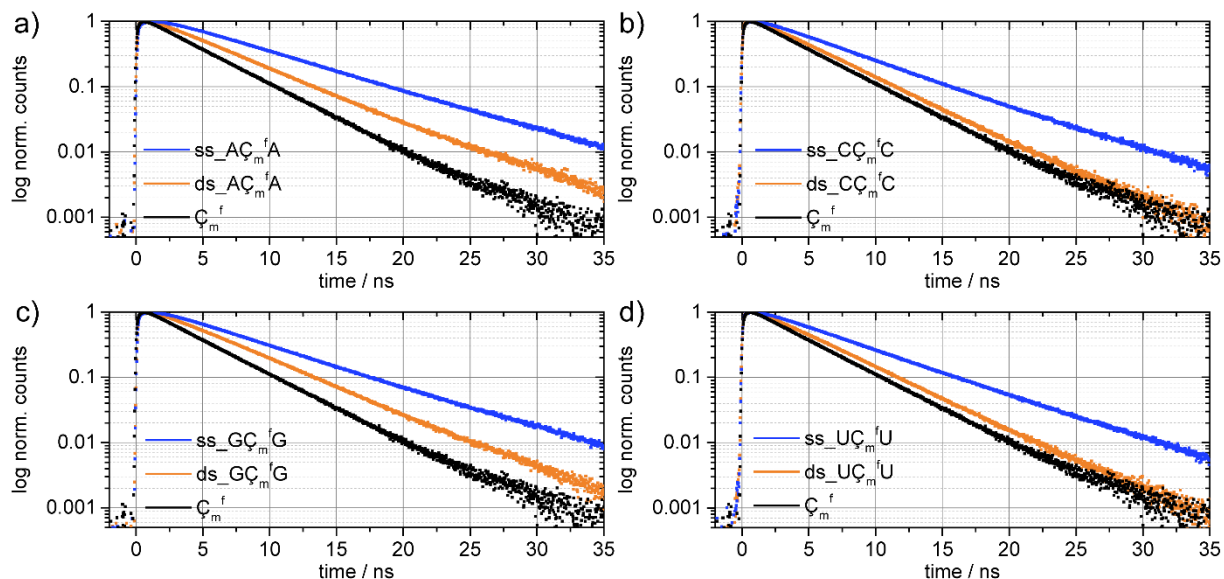


Abbildung 4.29. Vergleich der normierten Fluoreszenzzerfälle der ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelstränge mit dem freien Fluorophor in Lösung. a) AC_m^fA , b) CC_m^fC , c) GC_m^fG , d) UC_m^fU .

Im Vergleich zum freien Fluoreszenzlabel in Lösung wird die mittlere Fluoreszenzlebensdauer (τ_{av}) durch den Einbau in RNA verlängert, wobei dieser Effekt im Fall der markierten Einzelstränge ausgeprägter ist.

$$\tau_{av}: \quad C_m^f < ds_NC_m^fN < ss_NC_m^fN$$

Des Weiteren haben die Nachbarbasen des Fluorophors einen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer. So ist die Fluoreszenzlebensdauer im Fall von benachbarten Purinbasen systematisch länger als im Fall von benachbarten Pyrimidinbasen. Dies gilt sowohl für die doppelsträngigen als auch für die einzelsträngigen Proben.

$$\tau_{av}: \quad ss/ds_CC_m^fC < ss/ds_UC_m^fU < ss/ds_GC_m^fG < ss/ds_AC_m^fA$$

Entsprechend ist es also möglich, über die Fluoreszenzlebensdauer zwischen einzel- und doppelsträngigen Proben sowie zwischen flankierenden Purin- und Pyrimidinbasen zu unterscheiden. Diese Beobachtungen können, wie schon oben im Fall der Fluoreszenzquantenausbeute beschrieben, auf Stapelwechselwirkungen, sterische Abschirmung und Basenpaarung zurückgeführt werden. Durch Wechselwirkungen mit den Nachbarbasen (Abschirmung, Stapelwechselwirkungen) wird der S_1 -Zustand des Fluorophors stabilisiert, was letztlich die Fluoreszenzlebensdauer verlängert. Besonders ausgeprägt sind diese Wechselwirkungen im Fall der benachbarten Purinbasen. Umgekehrt scheint es im Fall der markierten Doppelstränge weitere Wechselwirkungen zu geben, wie z.B. die Basenpaarungen, die den S_1 -Zustand destabilisieren, die nichtstrahlende Rate erhöhen und damit die Fluoreszenzlebensdauer verkürzen.

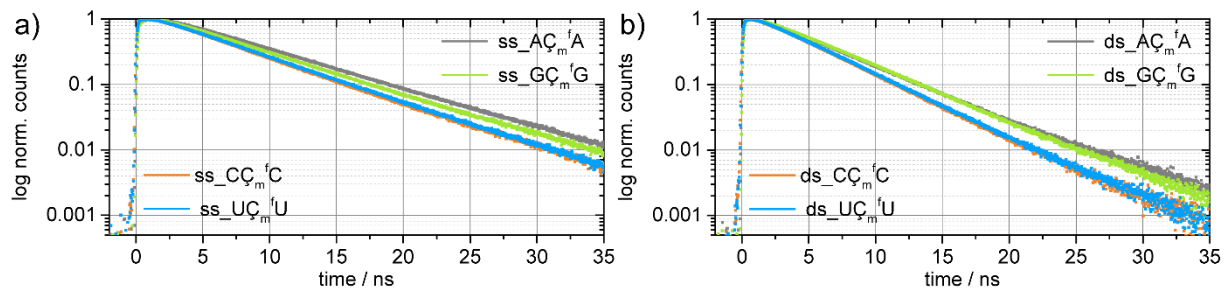


Abbildung 4.30. Normierte Fluoreszenzzerfälle der ζ_m^f -markierten Einzel- (a) und Doppelstränge (b).

Die Fluoreszenzzerfälle können durch eine Summe aus exponentiellen Zerfallsfunktionen beschrieben werden, was eine quantitative Beschreibung der Daten erlaubt (Tabelle 4.11). Wie beim freien Fluorophor in Lösung (vgl. oben, Kapitel 4.2.1.2) sind jeweils mindestens drei exponentielle Zerfallskomponenten nötig, um den Fluoreszenzzerfall des Fluorophors in RNA zu beschreiben. Auch im in RNA eingebauten Zustand beschreibt dabei eine kurze Komponente (τ_{pop}), mit einer negativen Amplitude, die Bevölkerung des emittierenden Zustands des Fluorophors. Der eigentliche Zerfall wird dann durch zwei längere Lebenszeitkomponenten beschrieben.

Allerdings fällt auf, dass alle drei Komponenten durch den Einbau in RNA verlängert werden. Dies trifft sowohl auf den Fall der markierten Einzelstränge als auch auf die markierten Doppelstränge zu. Der Effekt ist aber bei den einzelsträngigen Proben deutlicher ausgeprägt, was sich voll und ganz mit der oben aufgeführten qualitativen Beschreibung der Zerfälle deckt. Genauer gesagt ist festzustellen, dass die Fluoreszenzlebensdauern der markierten Einzelstränge rund 1,4-fach länger als die Fluoreszenzlebensdauern der entsprechenden markierten Doppelstränge sind. Insbesondere ist die Amplitude der Komponente τ_2 im Fall der Einzelstränge stärker als im Fall der Doppelstränge. Gleichzeitig ähnelt aber der Wert von τ_2 der Doppelstränge ungefähr den Werten für τ_1 und τ_2 der Einzelstränge. Dementsprechend kann die Komponente τ_2 der Doppelstrangmessungen eventuell als einzelsträngiger Anteil in der entsprechenden Probe interpretiert werden.^v

Tabelle 4.11. Fluoreszenzlebensdauern der Ç_m^f-markierten Einzel- und Doppelstränge bei 20 °C.

Probe	$\tau_{\text{pop}} / \text{ns}$	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	$\tau_{\text{av}} / \text{ns}$	
Ç _m ^f	0,3	4,1 (96%)	1,4 (4%)	1,1	4,1	
ds	AÇ _m ^f A	1,5	4,6 (89%)	7,6 (11%)	1,2	5,3
	CÇ _m ^f C	1,7	4,1 (96%)	6,8 (4%)	1,1	4,5
	GÇ _m ^f G	2,3	4,7 (97%)	7,5 (3%)	1,3	5,2
	UÇ _m ^f U	1,6	4,2 (97%)	7,4 (3%)	1,1	4,6
ss	AÇ _m ^f A	1,5	6,4 (71%)	8,5 (29%)	1,1	7,5
	CÇ _m ^f C	1,5	5,1 (77%)	8,2 (23%)	1,1	6,4
	GÇ _m ^f G	1,6	5,6 (69%)	8,2 (31%)	1,1	7
	UÇ _m ^f U	1,9	3,9 (36%)	6,8 (64)	1,2	6,5

4.2.2.4 Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors ist üblicherweise deutlich von der Temperatur abhängig. Wie im vorhergehenden Unterkapitel gezeigt, lassen sich die einzelnen Komponenten des Fluoreszenzzerfalls grob dem doppel- und dem einzelsträngigen Anteil der Probe zuordnen. Um dies zu überprüfen und um gleichzeitig einen detaillierteren Einblick in den Schmelzprozess von RNA-Doppelsträngen zu erhalten, wurden temperaturabhängige TCSPC-Messungen der mit Ç_m^f-markierten, einzel- und doppelsträngigen Modellsequenzen vorgenommen. Dazu wurden die Proben in 10 °C-Schritten von 20 °C bis 90 °C aufgeheizt.

Es zeigte sich, dass sich die Befunde aus den statischen Schmelzexperimenten über diese Methode gut ergänzen und überprüfen lassen. Dabei musste allerdings festgestellt werden, dass der quantitative Vergleich und die Diskussion des Verlaufs von jeweils drei separaten Zerfallskomponenten im Fall von acht Proben über acht Temperaturschritte sehr kompliziert ist (vgl. Anhang, Kapitel 7.1.2.5). Außerdem erschwert eine nie ganz auszuschließende, teilweise Kompensation der einzelnen Lebensdauern die Interpretation der jeweiligen Temperaturabhängigkeiten. Auch die Betrachtung der gemittelten Lebensdauern ermöglicht zwar die Interpretation des allgemeinen Trends, allerdings gehen hierbei natürlich die Informationen verloren, die eventuell über die Temperaturabhängigkeiten der einzelnen Komponenten erhältlich sind. Gleichzeitig eignete sich die herkömmliche grafische Darstellung der Zerfallskurven nicht, um die entsprechenden Trends qualitativ zu beschreiben, da die entsprechenden Änderungen relativ klein sind und sich die verschiedenen Zerfallskurven deshalb stark überlagern. Dies gilt vor allem für die doppelsträngigen Proben.

^v Dieser Anteil wurde z.B. bei der spektralaufgelösten Schmelzanalyse nicht berücksichtigt.

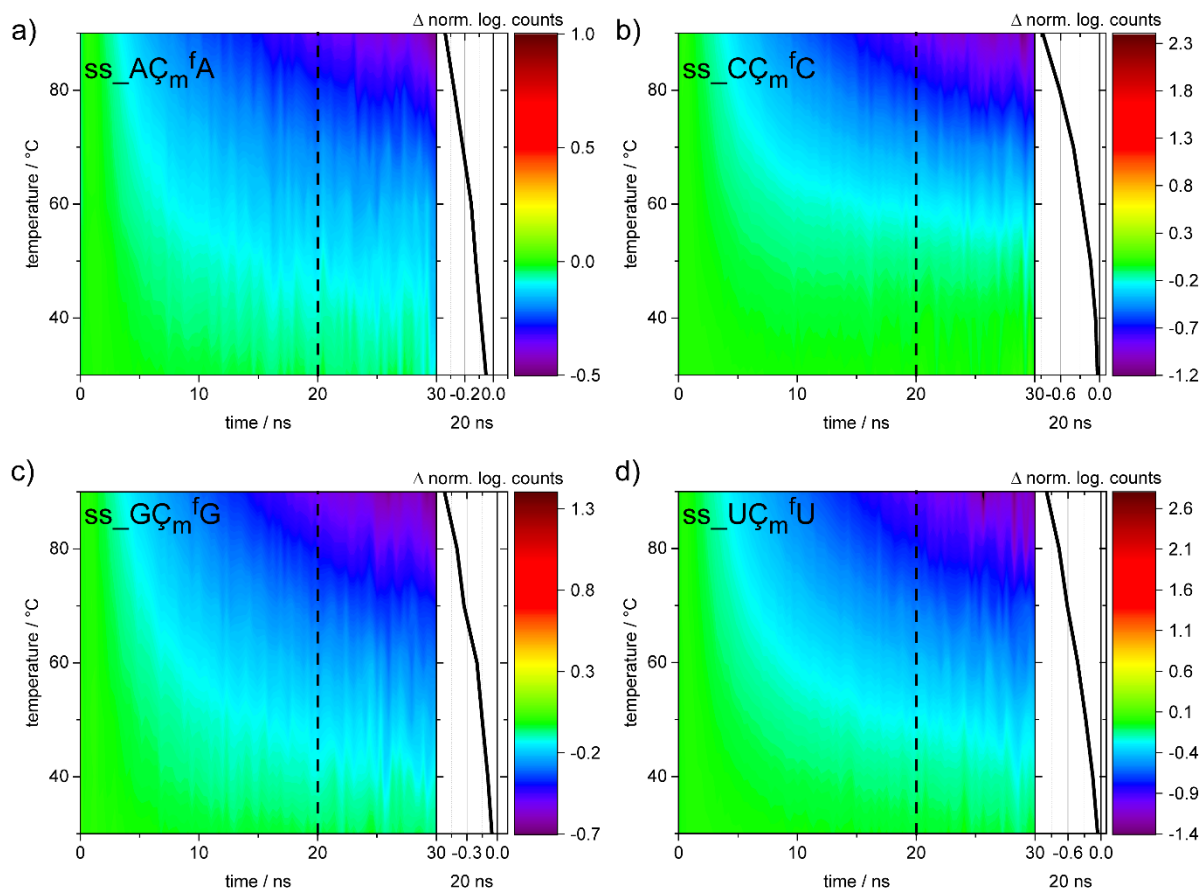


Abbildung 4.31. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer der C_m^f -markierten Einzelstränge dargestellt als Transientenkarten. a) $A C_m^f A$, b) $C C_m^f C$, c) $G C_m^f G$, d) $U C_m^f U$.

Dementsprechend wurde, in grober Anlehnung an die Transientenkarten der transienten Absorptionsmessungen, eine spezielle Darstellungsart für die Temperaturabhängigkeit von Fluoreszenzzerfällen entwickelt (Abbildung 4.31 und Abbildung 4.33). Für diese grafische Analyse wurden alle Zerfallskurven zunächst auf ihren Maximalwert normiert. Anschließend wurde der normierte Zerfall bei 20 °C von allen anderen temperaturabhängigen Zerfällen dieser Probe subtrahiert. Die so erhaltenen Differenzen wurden anschließend in Form von temperaturabhängigen Transientenkarten aufgetragen, wobei wie gewohnt negative Signaländerungen blau und positive Signaländerungen rot dargestellt werden. Als zusätzliche Unterstützung ist am Rand jeder temperaturabhängigen Transientenkarte ein Schnitt durch die Differenzdarstellung nach 20 ns aufgetragen. Dieser Schnitt ist als gestrichelte Linie in jeder Differenzdarstellung markiert.

Betrachtet man zunächst nur die vier verschiedenen einzelsträngigen, markierten Modellstränge, so ist eine simple Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer mit steigender Temperatur zu erkennen (Abbildung 4.31). Dies trifft auf alle Einzelkomponenten und damit auch auf die mittlere Fluoreszenzlebensdauer zu, die in Abbildung 4.32a temperaturabhängig aufgetragen ist. Die Beobachtung deckt sich mit den statischen Experimenten, in denen eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute mit steigender Temperatur beobachtet werden konnte. Wie schon für diese Experimente beschrieben, ist die Amplitude dieser Abnahme allerdings deutlich von der Probe abhängig. Außerdem ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzlebensdauer annähernd linear mit steigender Temperatur abnimmt. Allerdings weicht zumindest $ss_C C_m^f C$ von diesem linearen Verhalten ab. Dies und die unterschiedlich starke Ausprägung der Änderungen mit steigender Temperatur bei verschiedenen Proben lassen vermuten, dass die Fluoreszenzlebensdauern der Proben nicht nur durch Fluoreszenzlöschung aufgrund von Stößen mit dem Lösungsmittel beeinflusst werden. Vielmehr scheinen hier zusätzlich intramolekulare Wechselwirkungen wie Kompaktierung der Stränge durch Stacking zwischen den benachbarten Basen, aber auch sterische Wechselwirkungen eine Rolle zu spielen, die den Effekt der Stoßlöschung abmildern bzw. kompensieren können. Entsprechend ist hierbei auch die konformationelle Flexibilität der Einzelstränge ausschlaggebend, die offenbar signifikant von den variierten Nachbarbasen des C_m^f -Labels beeinflusst wird. Entsprechend wird, bei steigender Temperatur, die Fluoreszenzlebensdauer der Proben mit Purinnachbarbasen des C_m^f -Labels weniger stark reduziert als bei den entsprechenden Proben mit Pyrimidinnachbarbasen.

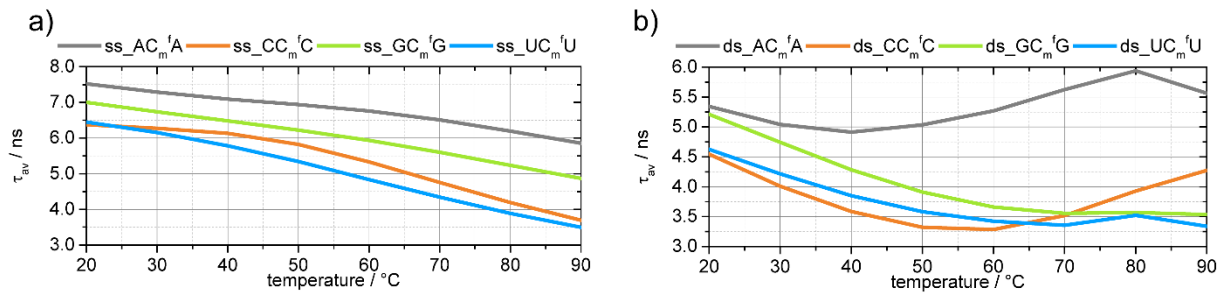


Abbildung 4.32. Temperaturabhängigkeit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_{av} der ζ_m^f -markierten Einzel- (a) und Doppelstränge (b).

Im Fall der markierten Doppelstränge ist der temperaturabhängige Verlauf der Fluoreszenzlebensdauern mehreren, sich zum Teil kompensierenden Effekten unterworfen (Abbildung 4.33). Diese Kompensationen zeigen sich deutlich im Verlauf der mittleren Fluoreszenzlebensdauern, die in Abbildung 4.32b dargestellt sind. So ist hier zunächst ebenfalls die oben, im Fall der Einzelstränge, beschriebene Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer zu erkennen. Auch hier sorgen zusätzlich intramolekulare Wechselwirkungen dafür, dass der Effekt unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Im Bereich der jeweiligen Schmelztemperaturen ist allerdings in der Folge ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzlebensdauer oder ein Gleichbleiben dieses Wertes zu beobachten. Der steigende Anteil an einzelsträngiger markierter RNA (τ_2) führt hier also zu einer Verlängerung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer (vgl. Anhang, Kapitel 7.1.2.5 und Tabelle 4.11). Dieser Anstieg wird allerdings im Fall von $ds_{GC_m^fG}$ und $ds_{UC_m^fU}$ durch die gleichzeitige Erhöhung des Kollisionsquenchings ausgeglichen. Dies resultiert in einer annähernd konstanten Fluoreszenzlebensdauer im Bereich zwischen 60 °C und 90 °C.

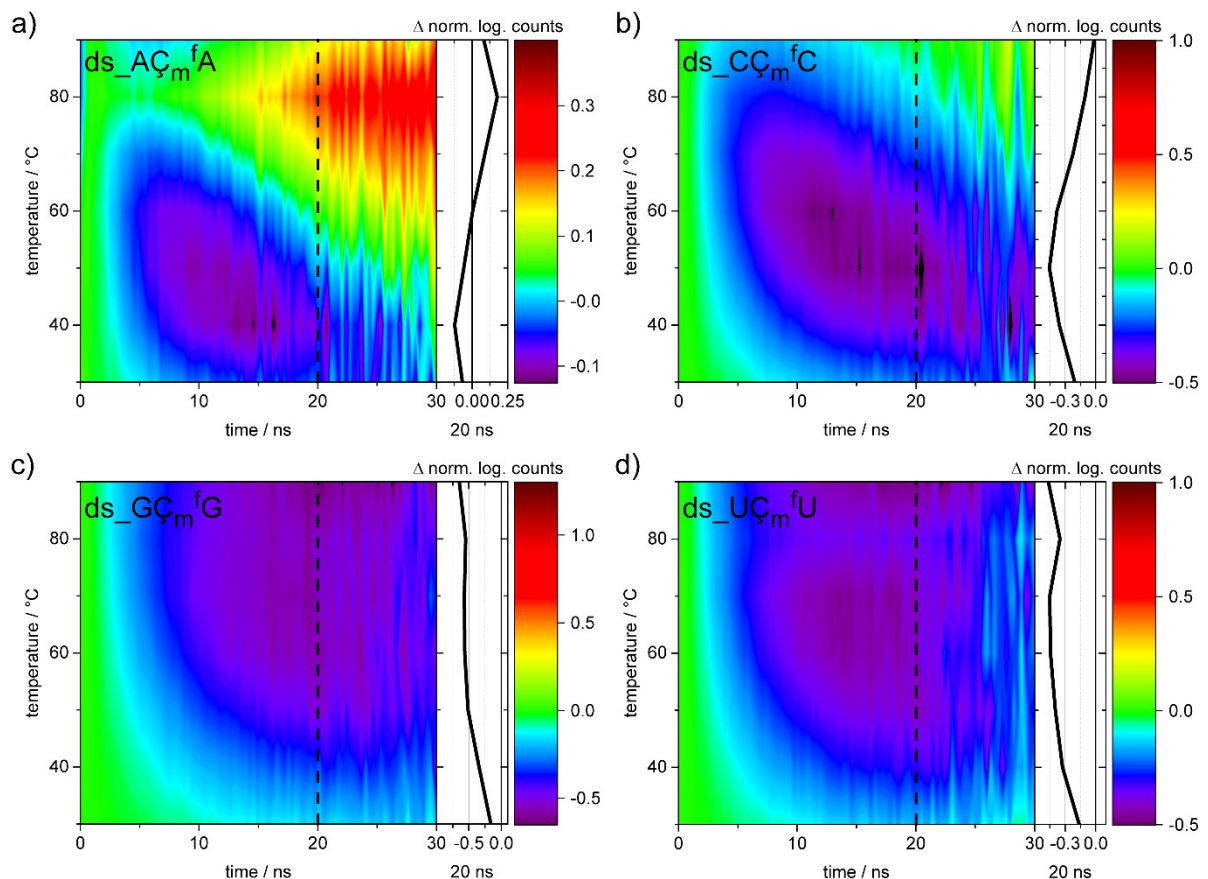


Abbildung 4.33. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer der ζ_m^f -markierten Doppelstränge dargestellt als Transientenkarten. a) AC_m^fA , b) CC_m^fC , c) GC_m^fG , d) UC_m^fU .

Nach der kompletten Separation der beiden Einzelstränge beim Schmelzvorgang dominiert das Kollisionsquenching wieder, was wiederum zu einer leichten Beschleunigung des Fluoreszenzzerfalls führt. Dies ist besonders bei den leicht niedriger schmelzenden Proben $ds_{AC_m^fA}$ und $ds_{UC_m^fU}$ zu erkennen.

Der eigentliche Schmelzprozess der Doppelstränge lässt sich also im Rahmen dieses Experiments an einem Anstieg der Amplitude der längeren Zerfallskomponente (τ_2) erkennen (vgl. Anhang, Kapitel 7.1.2.5). Dieser Zusammenhang ist gut in den Differenzdarstellungen (Abbildung 4.33) auszumachen. So sieht man vor allem im Fall von $ds_A\zeta_m^fA$ und $ds_C\zeta_m^fC$, über annähernd den kompletten Temperaturbereich, den Anstieg der τ_2 -Amplitude, während die τ_1 -Amplitude abnimmt.

4.2.2.5 Zeitaufgelöste Anisotropiemessungen

Wie schon oben erwähnt, war es möglich, mittels statischer Anisotropiemessungen zwischen ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelsträngen zu unterscheiden. Um diese Ergebnisse zu überprüfen und um weitere Probeneigenschaften wie die Rotationskorrelationszeit ermitteln zu können, wurden zusätzlich zeitaufgelöste Anisotropiemessungen mittels der TCSPC-Anlage durchgeführt (Abbildung 4.34).

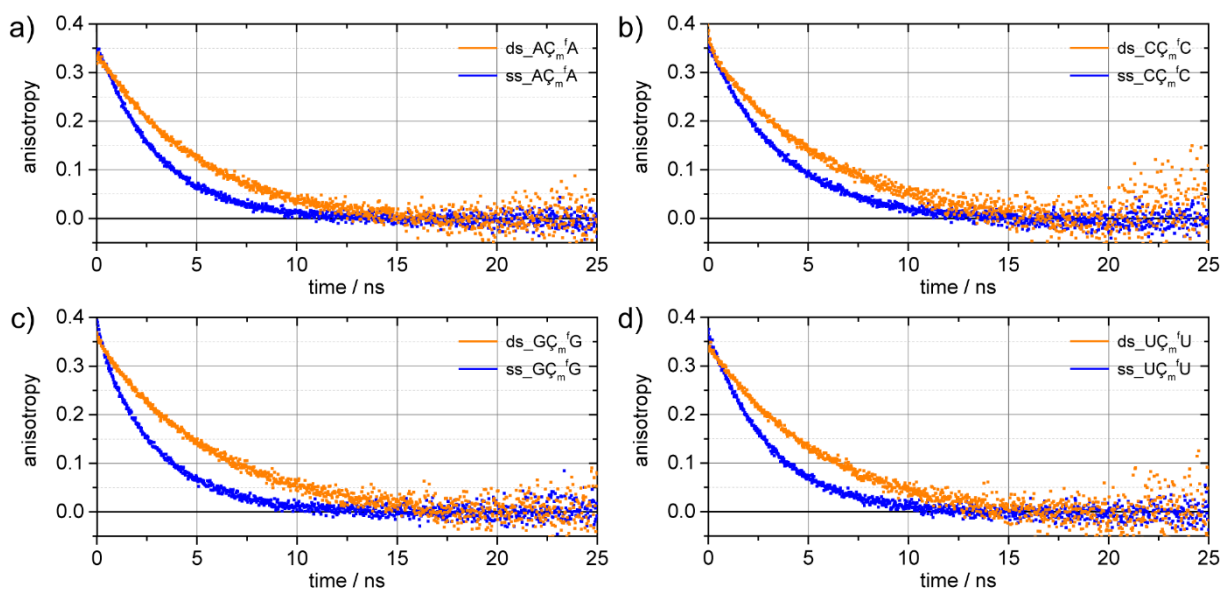


Abbildung 4.34. Vergleich der Fluoreszenzanisotropiezerfälle der ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelstränge. a) $A\zeta_m^fA$, b) $C\zeta_m^fC$, c) $G\zeta_m^fG$, d) $U\zeta_m^fU$.

Betrachtet man zunächst rein qualitativ die Anisotropiezerfälle der verschiedenen Proben, so fällt auf, dass sich die Zerfälle der Einzelstränge deutlich von den Zerfällen der Doppelstränge unterscheiden (Abbildung 4.34). Im Fall der Einzelstränge wird die Ausgangsanisotropie, die sich für die verschiedenen Proben grob im Bereich von 0,3 bis 0,4 bewegt, deutlich schneller abgebaut als im Fall der Doppelstränge. Gleichzeitig ist allerdings festzustellen, dass sich die Anisotropieverläufe der verschiedenen einzelsträngigen bzw. doppelsträngigen Proben nicht unterscheiden (Abbildung 4.35). Dementsprechend ist es möglich, mittels zeitaufgelöster Anisotropie zwischen einzelsträngigen und doppelsträngigen Modellsequenzen zu unterscheiden. Dies bestätigt die statischen Befunde und war aufgrund der unterschiedlichen molaren Masse bzw. der unterschiedlichen Volumina der beiden Probenklassen zu erwarten. Andererseits ist deutlich zu erkennen, dass die leichten Sequenzunterschiede, aufgrund unterschiedlicher Nachbarbasen des Labels, keinen signifikanten Einfluss auf das Anisotropieverhalten der Proben haben. Dies gilt sowohl für die einzel- als auch für die doppelsträngigen Proben. Die einzige Ausnahme dazu bildet die Probe $ss_C\zeta_m^fC$, die im Vergleich zu den anderen einzelsträngigen Proben einen etwas langsameren Anisotropiezerfall zeigt. Dies deckt sich mit den entsprechenden statischen Messungen. Offenbar führen die drei aufeinanderfolgenden Cytosinbasen (inkl. ζ_m^f) zu einer leicht veränderten voluminöseren Struktur des Einzelstrangs. Es kann vermutet werden, dass im Fall von $ss_C\zeta_m^fC$ vergleichsweise wenige Stacking-Wechselwirkungen zwischen den Basen auftreten. Dies führt zu einer geringeren Kompaktierung dieses Modellstrangs, was die etwas höhere Anisotropie der Probe $ss_C\zeta_m^fC$ erklären kann.

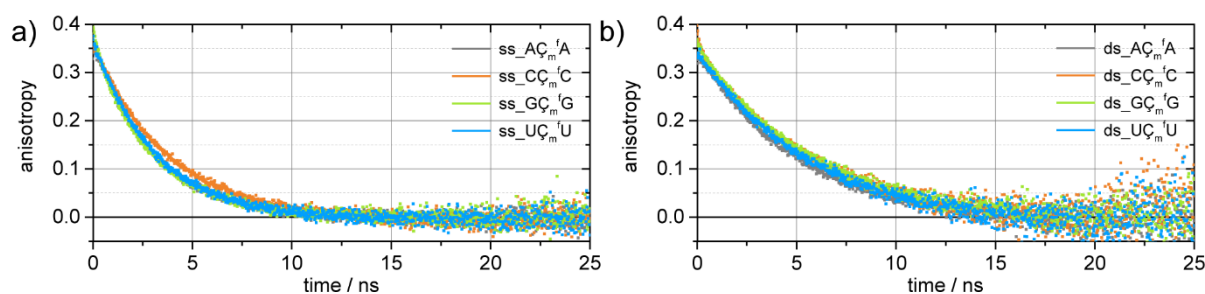


Abbildung 4.35. Fluoreszenzanisotropiezerfälle der Ç_m^f-markierten Einzel- (a) und Doppelstränge (b).

Durch exponentielle Anpassung der Anisotropiezerfallskurven ist es möglich, die oben qualitativ beschriebenen Effekte zu quantifizieren. Die monoexponentielle Anpassung der Kurven resultiert jeweils in einem Wert für die Rotationskorrelationszeit (θ , Tabelle 4.12). Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Rotationskorrelationszeiten für die markierten Doppelstränge systematisch höher sind als für die markierten Einzelstränge. Ein klarer Trend, aufgrund von Wechselwirkungen mit den Ç_m^f-Nachbarbasen, ist auch mittels der Rotationskorrelationszeiten nicht auszumachen. Allerdings ist hier ebenfalls zu erkennen, dass ss_CÇ_m^fC ein leicht verändertes Verhalten im Vergleich zu den anderen Einzelsträngen zeigt.

Tabelle 4.12. Rotationskorrelationszeiten, ermittelt über zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen, der Ç_m^f-markierten Einzel- und Doppelstränge bei 20 °C.

Probe	ss		ds	
	Θ / ns	V / nm ³	Θ / ns	V / nm ³
AÇ _m ^f A	3,0	12,1	4,7	19,0
CÇ _m ^f C	3,7	15,0	4,3	17,4
GÇ _m ^f G	2,8	11,3	5,0	20,2
UÇ _m ^f U	3,0	12,1	4,9	19,8

Wie schon durch die statischen Messungen gezeigt, kann auch durch die zeitaufgelösten Anisotropiemessungen darauf geschlossen werden, dass der Fluorophor Ç_m^f äußerst starr in die Modellsequenzen eingebaut ist. Dies scheint sowohl für die Einzel- als auch für die Doppelstränge zu gelten. Dementsprechend kann man auch im Fall der Einzelstränge von zumindest schwachen Stacking-Wechselwirkungen ausgehen. In jedem Fall wird Ç_m^f an einer freien und schnellen Rotation gehindert.

Ausgehend von den ermittelten Rotationskorrelationszeiten kann man über die folgende Gleichung Rückschlüsse auf das Volumen des verwendeten Fluorophors ziehen.¹³⁶

$$V = \frac{\theta \cdot R \cdot T}{\eta \cdot N_A} = \frac{\theta \cdot k_B \cdot T}{\eta} \quad \text{Formel 4.1}$$

Wobei hier R für die ideale Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, η für die Viskosität des Lösungsmittels, N_A für die Avogadro-Konstante und k_B für die Boltzmann-Konstante steht.

Da hier der Fluorophor, in erster Näherung, als fest und starr mit den RNA-Strängen verbunden angesehen werden kann, gibt die Rotationskorrelationszeit Auskunft über das Volumen des markierten Strangs. In Formel 4.1 wird allerdings der markierte Strang als kugelförmig genähert. Konzeptionell besser wäre zwar eine Näherung als Zylinder, wobei allerdings mindestens zwei verschiedene Rotationskorrelationszeiten verrechnet werden müssten. Die Anpassung der Anisotropiezerfallskurven mit einer biexponentiellen Zerfallsfunktion stellt allerdings eine Überparametrisierung der Daten dar, weshalb auf diese Auswertung verzichtet wurde.

Entsprechend der oben genannten Näherungen wurden, ausgehend von den angepassten Rotationskorrelationszeiten mittels Formel 4.1, die Volumina der markierten Modellsequenzen berechnet (Tabelle 4.12). Dabei wurde von einer Lösungsmittelviskosität von 1 mPa·s bei 20 °C ausgegangen. Die errechneten Volumina für die Einzel- und Doppelstränge zeigen natürlich die gleichen Trends wie die zugrunde liegenden Rotationskorrelationszeiten. Allerdings ist hier nun zu erkennen, dass die Doppelstränge ungefähr das 1,2- bis 1,8-fache Volumen der Einzelstränge einnehmen. Entsprechend ist auch durch diesen Befund davon auszugehen, dass auch die Einzelstränge in mehr oder weniger gestreckter und helikaler Form vorliegen.

Die über die Rotationskorrelationszeiten berechneten Volumina bewegen sich generell in der richtigen Größenordnung für RNA-15-mer: Geht man in erster Näherung davon aus, dass es sich bei einer RNA-A-Helix um einen Zylinder handelt, kann aus den Literaturwerten für den Höhenunterschied pro Basenpaar (0,23 nm) und den Durchmesser der Helix (2,55 nm) das entsprechende Volumen eines 15-mer-Doppelstrangs berechnet werden.⁹² Nach dieser Abschätzung ergibt sich ein 15-mer-A-Helix-Doppelstrangvolumen von 17,6 nm³, was relativ genau den durch zeitaufgelöste Anisotropiemessungen bestimmten Volumina entspricht.

4.2.2.6 Transiente Absorptionsmessungen

Neben den zuvor eingehend beschriebenen, statischen Eigenschaften sowie den Fluoreszenzlebensdauerstudien der ζ_m^f -markierten Doppelstränge wurden auch die Ultrakurzzeitdynamiken des Fluorophors mittels transientser Absorptionsmessungen in RNA untersucht (Abbildung 4.36 und Abbildung 4.37).

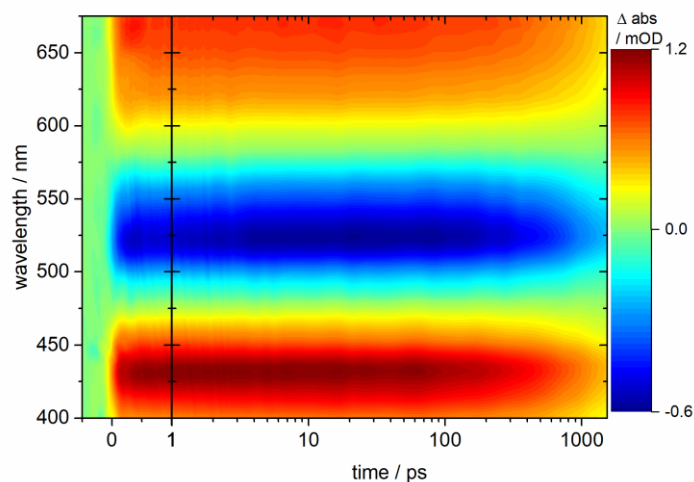


Abbildung 4.36. Transientenkarte der Probe $ds_A\zeta_m^fA$, als Beispiel für die transienten Absorptionsmessungen.

Wie im Fall des freien Fluorophors in Lösung (vgl. Kapitel 4.2.1.6) waren bei diesen Messungen drei Signalbanden im Bereich zwischen 400 nm und 675 nm zu identifizieren: Zwischen 400 nm und 475 nm sowie zwischen 580 nm und 675 nm ist jeweils eine langlebige positive Absorptionsänderung zu sehen. Zwischen den beiden positiven Banden, also im Bereich von 475 nm bis 580 nm, ist eine langlebige negative Absorptionsänderung erkennbar. Alle drei Banden bauen sich instantan mit der Anregung auf und zerfallen anschließend relativ langsam, sodass der vollständige Zerfall nicht im Messfenster der transienten Absorptionsmessung dargestellt werden kann.

Wie schon für den ungebundenen Fluorophor beschrieben wurde, handelt es sich bei den positiven Signalen um eine breite ESA, die sich über den kompletten spektralen Nachweisbereich erstreckt. Die ESA wird allerdings von einem negativen Signal überlagert. Dieses Signal kann der SE zugeordnet werden, obwohl es, durch die Überlagerung zwischen ESA und SE, spektral nicht vollumfänglich der Lage des statischen Fluoreszenzspektrums entspricht. Ähnliches gilt für den GSB: Dieser ist, aufgrund der Überlagerung mit der ESA, nicht als negative Bande zu erkennen.

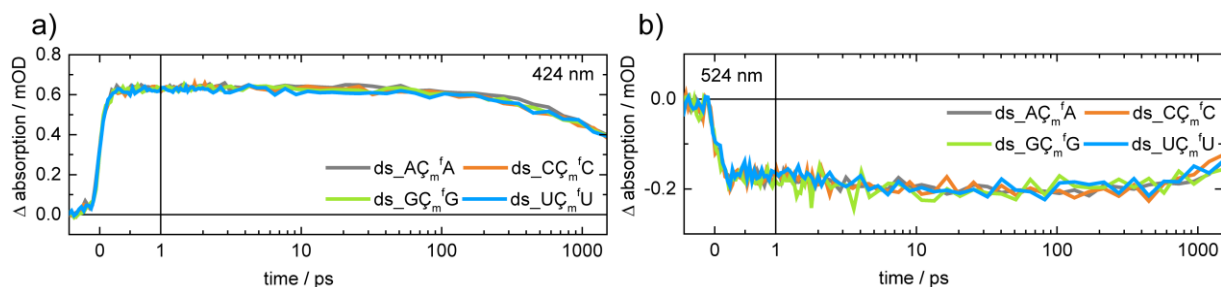


Abbildung 4.37. Ausgewählte, skalierte Transienten der transienten Absorptionsmessungen der ζ_m^f -markierten Doppelstränge. Nachweiswellenlängen: a) 424 nm und b) 524 nm.

Diese Befunde entsprechen völlig der weiter oben beschriebenen Photophysik des freien Fluorophors in Lösung (vgl. Kapitel 4.2.1.6). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die ps-Dynamik des Ç_m^f-Labels durch den Einbau in RNA nicht beeinflusst wird. Der oben beschriebene Einfluss auf die ns-Dynamik des Fluorophors lässt sich mittels der hier gezeigten, transienten Absorptionmessungen nicht weiter aufklären, da diese außerhalb des Messbereichs der Methode bzw. des verwendeten Aufbaus liegt. Darüber hinaus ist, durch direkten Vergleich der Messungen der verschiedenen markierten Doppelstränge, leicht zu erkennen, dass die Kurzzeiddynamik der Proben nicht von den direkt benachbarten Basen beeinflusst wird (Abbildung 4.37).

4.2.3 ζ_m^f im neomycinbindenden Aptamer

Im vorhergehenden Unterkapitel konnte gezeigt werden, dass die Stabilität eines RNA-Stranges durch die Markierung mit dem starren Fluorophor ζ_m^f nicht entscheidend beeinflusst wird. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass ζ_m^f , aufgrund der signifikanten umgebungsabhängigen Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften (Spektrum, Quantenausbeute, Lebensdauer, Anisotropie) als spezifischer RNA-Fluoreszenzlabel eingesetzt werden kann. Deshalb können mithilfe des Fluorophors und verschiedener spektroskopischer Methoden Basenpaarungen, Stapelwechselwirkungen sowie die Flexibilität von RNA-Strängen bzw. die Zugänglichkeit des Lösungsmittels beobachtet werden. Deshalb sollte der Fluorophor für den Einsatz in verschiedensten Ligandenbindungs- oder Doppelstrangbildungsstudien geeignet sein.

Wie schon im Theoriekapitel ausgeführt, handelt es sich beim neomycinbindenden Aptamer (N1) um einen sehr kleinen, regulierenden, synthetischen Riboschalter. Die Struktur des N1 ist weitestgehend bekannt und es gibt eine recht genaue Vorstellung bezüglich der Ligandenbindung des Aptamers. Allerdings gibt es bis jetzt keine Informationen zur Bindungsdynamik. Dabei ist davon auszugehen, dass die Dynamik wesentliche Informationen zum Bindungsmechanismus liefern kann. Deshalb ist das N1-Aptamer ein geeigneter Kandidat für die erste mittels ζ_m^f -Markierung durchgeführte Ligandenbindungsstudie.

4.2.3.1 Auswahl der Labelpositionen

Im Vorfeld der Studie war es nötig, geeignete Positionen für die ζ_m^f -Markierung zu finden. Hierbei wurde versucht, ζ_m^f in Bereiche des Aptamers einzubringen, die im Rahmen der Ligandenbindung einer strukturellen Änderung unterworfen sind. Gleichzeitig sollte der Fluorophor nicht die Ligandenbindung behindern oder zu Fehlfaltungen des Aptamers führen. Bei diesen Überlegungen wurden die veröffentlichten NMR-Strukturdaten (NDB/PDB-ID: 2KXM) und das dazu postulierte Bindungsmodell berücksichtigt.^{95,96} Um also im Vorfeld der Synthese eine grobe Abschätzung des sterischen Einflusses des Fluorophors auf das Aptamer zu erhalten, wurde die ζ_m^f -Struktur mit den NMR-Strukturdaten überlagert (Abbildung 4.38).

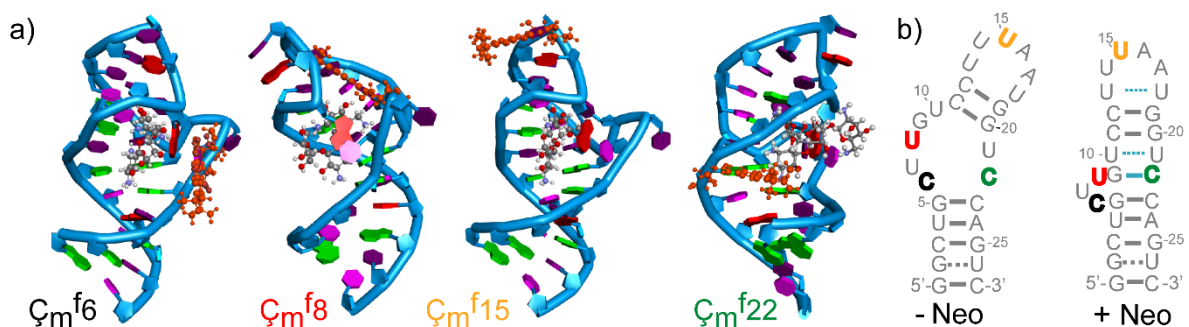


Abbildung 4.38. ζ_m^f -markierte Positionen innerhalb des neomycinbindenden Aptamers.⁹⁶ a) Darstellung der Positionen in der pdb-Struktur. ζ_m^f ist jeweils rotorange markiert. b) Darstellung der Positionen in der Sekundärstruktur. Die Positionen sind jeweils farbig in der vorgeschlagenen Struktur, ohne (links) und mit (rechts) Ligand, markiert.⁹⁶

So wurden vier verschiedene Labelpositionen innerhalb des Aptamers identifiziert (Abbildung 4.38, Tabelle 4.13). Alle vier Positionen sind wahrscheinlich nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt. Drei Positionen befinden sich innerhalb oder in der Nähe der Ligandenbindetasche des Aptamers (ζ_m^f6 , ζ_m^f8 , ζ_m^f22) und eine Position befindet sich in der terminalen Schleife des Aptamers (ζ_m^f15). Im Fall von ζ_m^f8 und ζ_m^f15 wurde jeweils eine Uracilbase durch den Fluorophor ersetzt. ζ_m^f6 und ζ_m^f22 ersetzen dagegen jeweils eine Cytosinbase.

Im Fall der Positionen 6, 8 und 15 konnte außerdem mittels Mutationsanalysen gezeigt werden, dass die entsprechenden Nukleotide, ohne Verlust der *in vivo* Regulationsfähigkeit des Aptamers, ausgetauscht werden können.^{99,197}

Tabelle 4.13. Sequenzen der ζ_m^f -markierten N1-Aptamere.

Probe	Sequenzen
ζ_m^f6	5'-GGC-UG ζ_m^f -UUG-UCC-UUU-AAU-GGU-CCA-GUC-3'
ζ_m^f8	5'-GGC-UGC-U ζ_m^f G-UCC-UUU-AAU-GGU-CCA-GUC-3'
ζ_m^f15	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UU ζ_m^f -AAU-GGU-CCA-GUC-3'
ζ_m^f22	5'-GGC-UGC-UUG-UCC-UUU-AAU-GGU- ζ_m^f CA-GUC-3'

Die Positionen ζ_m^f6 und ζ_m^f8 wurden ausgewählt, da hier unter anderem eine Veränderung der Stacking-Wechselwirkungen aufgrund der Ligandenbindung zu erwarten war. Im Fall von ζ_m^f22 sollte durch Ligandenbindung die Ausbildung einer Watson-Crick-Basenpaarung stattfinden. Allerdings wurden an dieser Labelposition große Wechselwirkungen zwischen Ligand und Label vermutet, sodass hier eventuell keine Bindung zu beobachten sein würde. Entsprechend sollte ζ_m^f22 als Negativkontrolle für die Ligandenbindung dienen.

Ausgehend von den oben präsentierten Ergebnissen im Fall von ζ_m^f -markierten Modellsequenzen war bei den drei Labelpositionen ζ_m^f6 , ζ_m^f8 und ζ_m^f22 jeweils eine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals der Probe im Zuge der Ligandenbindung bzw. Ligandenwechselwirkung zu erwarten. Die Position ζ_m^f15 sollte dagegen als Negativkontrolle dienen, da hier nicht mit signifikanten Wechselwirkungen zwischen Label, RNA und Ligand gerechnet werden konnte.

4.2.3.2 Statische Emissionsmessungen und isotherme Titrationskalorimetrie

Zu Beginn der Ligandenbindungsstudie des N1-Aptamers mithilfe der ζ_m^f -markierten Aptamersequenzen wurden zunächst statische Emissionsspektren aufgezeichnet (Abbildung 4.39). Dies ermöglicht zunächst den Vergleich der Spektren in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Labelpositionen. Außerdem wurde jede Probe in Abwesenheit (– Neo) und Anwesenheit (+ Neo) des Liganden untersucht.

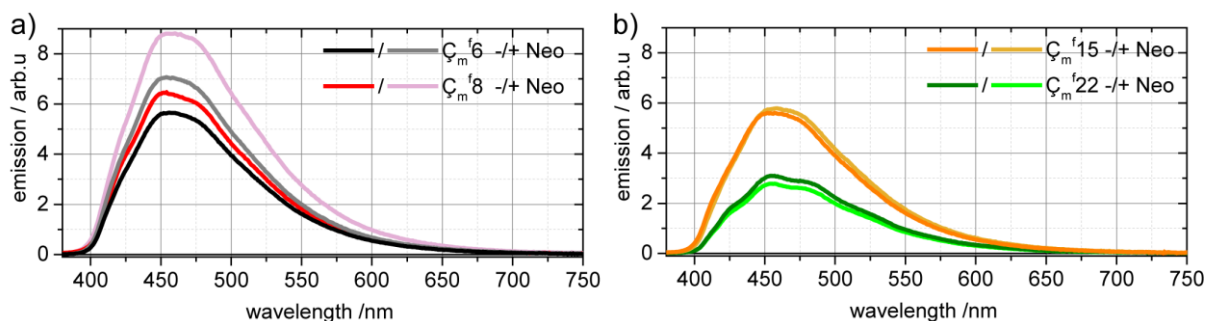


Abbildung 4.39. Konzentrationskorrigierte statische Emissionsspektren der vier ζ_m^f -markierten N1-Proben, ohne (–) und mit (+) Neomycin. a) ζ_m^f6 und ζ_m^f8 , b) ζ_m^f15 und ζ_m^f22 .

Dabei zeigte sich zunächst, dass sich die Form der Emissionsspektren für die verschiedenen Labelpositionen untereinander sehr ähnelt und sich außerdem nicht wesentlich von der Form des Emissionsspektrums des freien Fluorophors in Lösung unterscheidet. Dieser Befund ist konsistent zu den mittels der Modellsequenzen gemachten Beobachtungen. Dementsprechend erstreckt sich die Emission über den Bereich zwischen 400 nm und 650 nm und weist bei rund 460 nm das globale Maximum auf. Die einzigen Ausnahmen zu dieser Beobachtung bilden die Proben ζ_m^f22 (+/– Neo) (Abbildung 4.40). Die Spektren der beiden Proben zeigen jeweils die für eine Watson-Crick-Basenpaarung des Fluorophors typische Schwingungsfinestruktur (vgl. Emissionsspektren der doppelsträngigen Modellsequenzen, Abbildung 4.25b). Dies lässt auf eine weitgehende Vorformung der N1-Struktur im Fall von ζ_m^f22 schließen.

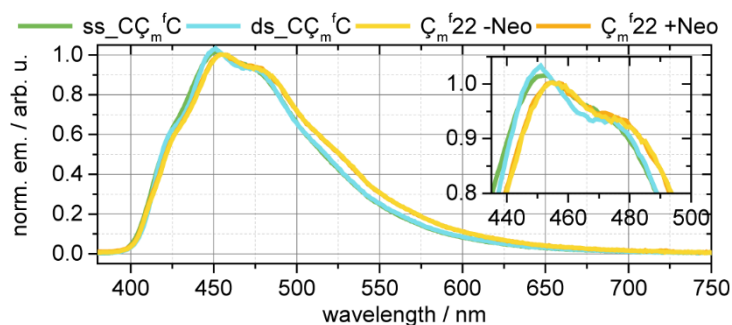


Abbildung 4.40. Beispielhafter Vergleich der normierten Emissionsspektren der Proben $ss_CC_m^fC$, $ds_CC_m^fC$, $C_m^f22 -Neo$ und $C_m^f22 +Neo$.

Im Unterschied zu der spektralen Form der Emission unterscheiden sich die Fluoreszenzquantenausbeuten der unterschiedlich markierten Proben deutlich (Tabelle 4.14). Dies gilt sowohl für die verschiedenen Labelpositionen als auch für die Ab- und Anwesenheit des Liganden. So zeigen C_m^f6 und C_m^f8 einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute in Anwesenheit von Neomycin. Die Quantenausbeute von C_m^f6 (+ Neo) ist relativ zu C_m^f6 (- Neo) um 25% höher. Im Fall von C_m^f8 ist ein relativer Anstieg von 43% festzustellen. Dementsprechend ist hier von einer direkten Wechselwirkung zwischen Label und Ligand sowie von größeren strukturellen Änderungen in der jeweiligen Umgebung des Fluorophors auszugehen.

Dagegen ändert sich die Quantenausbeute von C_m^f15 mit einer relativen Zunahme bei Ligandenanwesenheit um 4% quasi nicht. Entsprechend kann vermutet werden, dass diese Position nur gering von der Ligandenbindung beeinflusst wird. Bei C_m^f22 kommt es allerdings sogar zu einer leichten Abnahme (-10%) der Fluoreszenzquantenausbeute in Anwesenheit von Neomycin. Dies kann eventuell durch direkte Wechselwirkungen zwischen dem Label und dem Liganden hervorgerufen werden.

Tabelle 4.14. Form des Emissionsspektrums, relative Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute durch Anwesenheit von Neomycin, statische Fluoreszenzanisotropie, Schmelzpunkt (bestimmt über die Absorptionsänderung bei 260 nm oder die Emissionsänderung bei 460 nm) sowie K_D der verschiedenen C_m^f -markierten und -unmarkierten N1-Aptamerproben. Jeweils in Abwesenheit (-) und in Anwesenheit (+) des Liganden Neomycin.

Probe	Neo	np / p	ΔFQY / %	r_f	T_{m_em} / °C	T_{m_ab} / °C	K_D / nM
N1	-					56	6
	+					66	
C_m^f6	-	np		0,15	46 [+]	50	375
	+	np	+25	0,14	50 [-]	55	
C_m^f8	-	np		0,16	50 [+]	56	318
	+	np	+43	0,15	51 [-]	61	
C_m^f15	-	np		0,14	59 [+]	54	480
	+	np	+4	0,15	57 [-]	61	
C_m^f22	-	p		0,17	59 [+]	57	11700
	+	p	-10	0,17	59 [+]	55	

np = ungepaart, p = gepaart; Die Zeichen [-]/[+] stehen für das Vorzeichen der Fluoreszenzquantenausbeuteänderung während des Schmelzvorgangs im Bereich der Schmelztemperatur. T_{m_ab} = Schmelzpunkt bestimmt über Absorptionsänderung bei 260 nm; T_{m_em} = Schmelzpunkt bestimmt über Emissionsänderung bei 460 nm.

Die statischen Messungen der Fluoreszenzanisotropie zeigen keine signifikanten Änderungen durch unterschiedliche Positionen des Fluorophors. Auch die Ab- oder Anwesenheit des Liganden beeinflusst nicht die Fluoreszenzanisotropie (Tabelle 4.14). Allerdings sind die Werte für C_m^f22 (-/+ Neo) im Vergleich zu den anderen Proben leicht erhöht. Dies kann eventuell durch den besonders starren Einbau des Fluorophors in der Stammregion des Aptamers erklärt werden.

Geht man allgemein davon aus, dass der Fluorophor starr in N1 eingebaut ist, ist es möglich, die Anisotropie mit dem Volumen des Aptamers in Beziehung zu setzen. Dementsprechend bedeutet die Unabhängigkeit der Anisotropie von der Neomycinkonzentration, dass das Volumen und damit auch die Form des Aptamers weitgehend unabhängig von der Ligandenkonzentration sein müssen. Umgekehrt würde man also bei größeren Änderungen der Tertiärstruktur mit einer deutlichen Änderung der Fluoreszenzanisotropie rechnen. Deshalb spricht die konstante Anisotropie des N1-Aptamers für eine weitgehende Vorformung des Aptamers und damit für den Bindungsmodus der Konformationsauswahl (*conformational selection*). Andererseits können natürlich

kleinere konformationelle Änderungen, die die Form des Aptamers nicht wesentlich verändern, mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden.

Mittels isothermer Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) war es möglich, die Bindungsstärke der markierten Aptamerproben, unabhängig vom Fluoreszenzsignal, zu untersuchen (siehe Anhang, Kapitel 7.1.3.1). Die so ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst. Anhand der Werte ist deutlich zu erkennen, dass die Ligandenbindung durch die Markierung mit ζ_m^f deutlich verschlechtert wird. Gleichzeitig kann aber auch festgestellt werden, dass ζ_m^f6 , ζ_m^f8 und ζ_m^f15 eindeutig Neomycin binden. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsaffinität dieser drei Proben vergleichbar groß ist.

Die K_{DS} von ζ_m^f6 , ζ_m^f8 und ζ_m^f15 sind außerdem vergleichbar mit dem K_D für die Bindung von Ribostamycin an das unmarkierte N1-Aptamer (330 nM). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung von Neomycin und Ribostamycin an das Aptamer identisch ist. Die *in vivo* regulatorische Aktivität des N1-Aptamers mit Ribostamycin konnte jedenfalls nachgewiesen werden.^{95,96}

Für ζ_m^f22 kann nur eine sehr geringe Bindungsaffinität festgestellt werden. Entsprechend muss davon ausgegangen werden, dass es im Fall von ζ_m^f22 zu praktisch keiner Neomycinbindung kommt. Deshalb müssen die beobachteten Änderungen des Fluoreszenzsignals auf direkte Wechselwirkungen zwischen Ligand und Label, unabhängig von der Bindung, zurückzuführen sein.

Im Fall von ζ_m^f15 sollte es dagegen zu keinen sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Label und dem Liganden kommen. Allerdings kann für keine der untersuchten Positionen ausgeschlossen werden, dass es durch elektrostatische Abstoßung zu einer Verschlechterung der Bindungsaffinität kommt. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsaffinität von ζ_m^f15 hauptsächlich von elektrostatischen Kräften beeinflusst wird. Außerdem ist bekannt, dass Mutationen an Position 15 des Aptamers zu einer veränderten Vorfaltung der Haarnadelstruktur führen.¹⁹⁷ Dies sollte ebenfalls die Bindungsaffinität, nicht aber die direkten Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindetasche verändern.

4.2.3.3 Schmelzexperimente

Um den Einfluss der ζ_m^f -Markierung auf die Stabilität des Aptamers untersuchen zu können, wurden Absorptionsschmelzkurven des unmarkierten Aptamers sowie der vier markierten Proben aufgezeichnet. Hierbei konnte außerdem jeweils das Schmelzverhalten in Ab- und Anwesenheit des Liganden beobachtet werden.

Die Experimente zeigen, dass die ζ_m^f -Markierung nur für eine leichte Verringerung der Schmelztemperaturen verantwortlich ist. Allerdings führt im unmodifizierten Aptamer die Ligandenbindung zu einem Anstieg der Schmelztemperatur um 10 °C. Dieser Effekt ist deutlich kleiner im Fall der markierten Proben. So wird der Schmelzpunkt der Proben ζ_m^f6 , ζ_m^f8 und ζ_m^f15 um lediglich 5–7 °C angehoben, wenn Neomycin anwesend ist. ζ_m^f22 nimmt auch hier eine Sonderstellung ein, da hier sogar eine kleine Abnahme der Schmelztemperatur um 2 °C in Anwesenheit des Liganden zu beobachten ist. Trotzdem kann allgemein davon ausgegangen werden, dass die Stabilität des N1-Aptamers durch die Markierung mit ζ_m^f nicht wesentlich beeinflusst wird.

Die Ergebnisse der Emissionsschmelzexperimente unterscheiden sich deutlich von den entsprechenden Absorptionsschmelzexperimenten (Abbildung 4.41). Hier zeigt sich die Eigenschaft des Fluorophors als lokale Sonde innerhalb des Aptamers. Bei den Proben ζ_m^f6 , ζ_m^f8 und ζ_m^f15 ist insgesamt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur zu erkennen. Dies kann auf die erhöhte Fluoreszenzlöschung durch eine höhere Stoßrate bei steigender Temperatur zurückgeführt werden, wie es schon für die Modellsequenzen beschrieben wurde. Ohne Ligand tritt im Bereich des Schmelzpunkts ein Anstieg der Fluoreszenz auf, der das Kollisionsquenching annähernd kompensiert. Deshalb entsteht in diesem kleinen Bereich der Schmelzkurve sozusagen ein Plateau, in dem sich die Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur nicht ändert. Mit Neomycin kommt es in der gleichen Temperaturregion dagegen zu einem verstärkten Abfall der Fluoreszenzintensität.

Die für die Proben ohne Neomycin beschriebene faltungsinduzierte Fluoreszenzzunahme scheint hier also durch die Ligandenbindung überkompensiert zu werden. Dieses unterschiedliche Schmelzverhalten spricht für eine leicht unterschiedliche Faltung des Aptamers mit und ohne Ligand sowie für mögliche direkte Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und dem Liganden.

Im Fall von ζ_m^f15 sind beide Schmelzeffekte, also mit und ohne Neomycin, allerdings nur sehr schwach ausgeprägt. Auch hier ist dies dadurch zu erklären, dass ζ_m^f15 hauptsächlich Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel und nicht mit der RNA einzugehen scheint. Dementsprechend wird es von der Ligandenbindung nur minimal beeinflusst.

Das Schmelzverhalten der Probe ζ_m^f22 unterscheidet sich deutlich von dem der anderen Proben. Sowohl ohne als auch mit Neomycin ist hier jeweils die typische sigmoidale Schmelzkurve eines markierten Doppelstrangs zu erkennen. Wie schon für die Modellstränge beschrieben, ist diese sigmoidale Kurve ebenfalls mit einer Signalabnahme durch Kollisionsquenching überlagert. Eine Unterscheidung der Schmelzkurven mit und ohne Liganden ist im Fall von ζ_m^f22 nicht möglich. Auch dies zeigt, dass es im Fall von ζ_m^f22 zu keiner Bindung des Liganden kommt.

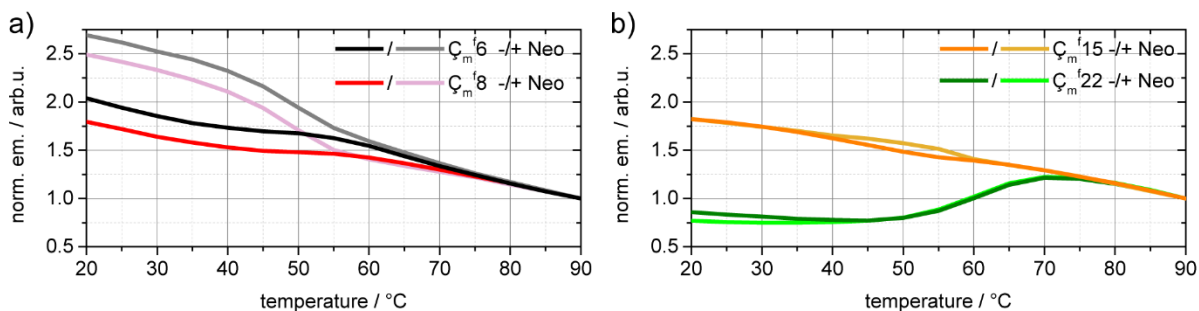


Abbildung 4.41. Fluoreszenzschmelzkurven der ζ_m^f -markierten N1-Proben ohne (-) und mit (+) Neomycin. Nachweiswellenlänge: 460 nm. Die Kurven sind auf die Emissionsintensität bei 90 °C normiert. a) ζ_m^f6 , ζ_m^f8 , b) ζ_m^f15 , ζ_m^f22 .

Durch die beobachteten Änderungen der Fluoreszenzintensität im Schmelzbereich der ζ_m^f -markierten Aptamerproben war es möglich, auch über den Temperaturverlauf der Fluoreszenzintensität einen Schmelzpunkt für jede Probe zu bestimmen. Die entsprechenden Schmelzpunkte befinden sich im Temperaturbereich zwischen 46 °C und 59 °C. Dabei wurden die höchsten Werte für die Proben ζ_m^f15 und ζ_m^f22 gefunden. Diese Beobachtung entspricht der erwarteten vergleichsweise hohen Stabilität im Bereich des Stamms und der terminalen Schleife. Deshalb sind die Schmelzpunkte der Proben ζ_m^f6 und ζ_m^f8 , die im Bereich der internen Schleife markiert sind, deutlich niedriger. Also kann davon ausgegangen werden, dass dieser Teil der Tertiärstruktur während des Schmelzprozesses als Erstes aufgelöst wird. Außerdem führt die Anwesenheit von Neomycin zu einer leichten Erhöhung des Schmelzpunktes von ζ_m^f6 und ζ_m^f8 . Dementsprechend scheint der Bereich der internen Schleife durch die Ligandenbindung stabilisiert zu werden. Andererseits werden die Schmelzpunkte von ζ_m^f15 und ζ_m^f22 durch Neomycin leicht gesenkt bzw. nicht beeinflusst. Dies spricht dafür, dass die Stabilität der terminalen Schleife und des Stamms durch die Ligandenbindung bzw. durch Wechselwirkungen mit dem Liganden nicht wesentlich beeinflusst wird.

4.2.3.4 Zeitaufgelöste Emissionsmessungen

Der Einfluss der Ligandenbindung auf die verschiedenen ζ_m^f -markierten Positionen des N1-Aptamers wurde auch mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmethoden untersucht. Zunächst wurden dazu die Fluoreszenzlebensdauern der verschiedenen Proben, jeweils ohne und mit Ligand, bestimmt (Abbildung 4.42).

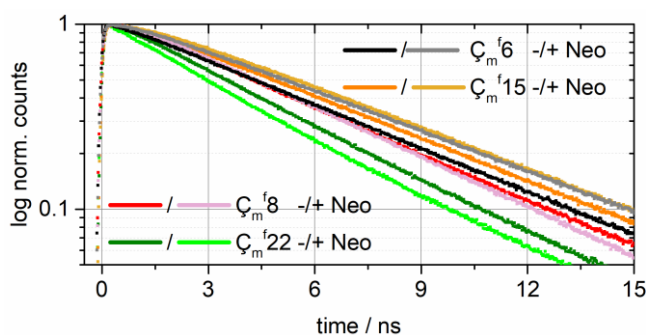


Abbildung 4.42. Normierte Fluoreszenzzerfälle der verschiedenen ζ_m^f -markierten N1-Proben, ohne (-) und mit (+) Neomycin.

Betrachtet man zunächst nur die markierten Proben, ohne Neomycin, ist zu erkennen, dass sich die vier Fluoreszenzzerfälle wenig, aber signifikant unterscheiden. Dementsprechend ist eine Unterscheidung der vier Proben über Fluoreszenzlebensdauermessungen möglich. Durch Ligandenbindung kommt es abhängig von der Position des Fluoreszenzlabels innerhalb des Aptamers zu einer Verlängerung oder Verkürzung des Fluoreszenzzerfalls. Wobei rein qualitativ kein Trend bezüglich des Vorzeichens dieses Effekts auszumachen ist. Auch eine Korrelation mit den entsprechenden statischen Fluoreszenzquantenausbeutemessungen ist nicht ersichtlich.

Zur quantitativen Beschreibung der Fluoreszenzzerfälle sind, ähnlich wie im Fall der Modellsequenzen, drei exponentielle Zerfallskomponenten nötig (Tabelle 4.15). Wobei hier, mit einer Ausnahme ($\zeta_m^{f15} + \text{Neo}$), keine Komponente benötigt wird, die den Signalaufbau beschreibt. Außerdem ist festzustellen, dass die Komponenten τ_1 und τ_2 ähnlich starke Beiträge zum Gesamtzerfall liefern. Deshalb kann hier von einer relativ ausgeprägten Kompensation zwischen den beiden Komponenten ausgegangen werden. Des Weiteren ist der Beitrag der Komponente τ_3 im Vergleich zu τ_1 und τ_2 sehr klein. Allerdings war eine Beschreibung der Zerfälle mit weniger als zwei Komponenten nicht in zufriedenstellender Qualität möglich.^w

Tabelle 4.15. Fluoreszenzlebensdauern der ζ_m^f -markierten NI-Aptamere.

Probe	Neo	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
ζ_m^{f6}	–	6,8 (71%)	4,0 (28%)	0,1 (1%)	1,1	5,4
	+	8,6 (9%)	5,7 (90%)	0,2 (1%)	1,2	5,9
ζ_m^{f8}	–	6,7 (42%)	3,8 (56%)	0,7 (2%)	1,2	5,0
	+	5,4 (56%)	3,5 (42%)	0,5 (2%)	1,1	4,5
ζ_m^{f15}	–	6,5 (46%)	4,7 (53%)	0,2 (1%)	1,3	5,5
	+	5,7 (98%)	2,2	<0,1 (2%)	1,2	5,8
ζ_m^{f22}	–	7,4 (25%)	3,8 (74%)	0,2 (1%)	1,1	4,6
	+	6,5 (38%)	3,2 (61%)	0,3 (1%)	1,3	4,4

Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern ohne Ligand erstrecken sich für die verschiedenen Proben von 4,6 ns bis zu 5,4 ns. Dies entspricht grob den Fluoreszenzlebensdauern der markierten Modellsequenzen. Wie oben schon qualitativ beschrieben, kommt es durch Ligandenbindung sowohl zu einer Verlängerung als auch zu einer Verkürzung der jeweiligen Lebensdauern, wobei auch hier kein Trend festgestellt werden konnte. Allerdings sind die Betragsänderungen mit 5 – 10% zwar signifikant, aber relativ klein.^x

Bemerkenswert sind allerdings die Fluoreszenzlebensdauern von ζ_m^{f22} (–/+ Neo), die deutlich kürzer sind als die entsprechenden Werte der anderen Proben. Dies spricht für eine Basenpaarung an Position 22 des Aptamers, sowohl mit als auch ohne Neomycin, was sich unter anderem mit den beobachteten Feinstrukturen der entsprechenden Fluoreszenzspektren deckt. Da im Fall von ζ_m^{f22} nicht von einer Ligandenbindung ausgegangen werden kann, muss die Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer auf eine direkte Wechselwirkung zwischen ζ_m^f und Neomycin zurückzuführen sein.

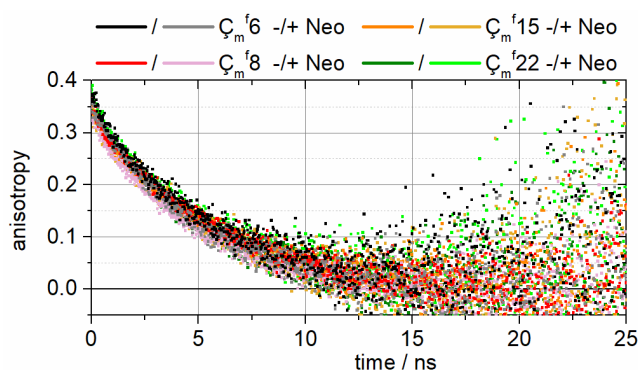


Abbildung 4.43. Vergleich der Fluoreszenzanisotropiezerfälle der vier ζ_m^f -markierten NI-Aptamere. Jeweils ohne (–) und mit (+) Neomycin.

^w Die Anpassung mit zwei Zerfallskomponenten ergab χ^2 -Werte, die im Bereich zwischen 1,4 und 2,3 lagen.

^x Zum Vergleich: Die Doppelstrangbildung der Modellsequenzen führt zu einem Anstieg der mittleren Fluoreszenzlebensdauer um rund 40%.

Zusätzlich zu den Messungen der Fluoreszenzlebensdauern der Proben wurden auch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzanisotropie durchgeführt. Wie in Abbildung 4.43 leicht zu erkennen ist, sind die Anisotropiezerfälle der verschiedenen Proben, im Rahmen der Genauigkeit der Methode, nicht zu unterscheiden. Weder die unterschiedlichen Positionen der ζ_m^f -Markierung noch die An- oder Abwesenheit des Liganden haben einen Einfluss auf den Verlauf der Anisotropie. Dieser Befund deckt sich weitestgehend mit den Ergebnissen der entsprechenden statischen Anisotropiemessungen. Die Ligandenbindung hat also keinen Einfluss auf die Anisotropie, weshalb sich das Volumen des Aptamers durch Ligandenbindung ebenfalls nicht ändern sollte. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass es im Rahmen der Bindung von Neomycin nicht zu größeren Änderungen der Tertiärstruktur des Aptamers kommt. Dies entspricht dem durch NMR- und EPR-Studien postulierten Konformationsauswahl-Bindungsmechanismus (*conformational selection*).^{95,96,100}

4.2.3.5 Messung der Bindungsdynamik

Durch die statischen Fluoreszenzmessungen der ζ_m^f -markierten N1-Aptamerproben konnte gezeigt werden, dass sich die Fluoreszenzquantenausbeuten der Proben abhängig von der Neomycinkonzentration sowie der Labelposition ändern. Die größten, durch Ligandenzugabe induzierten Signaländerungen waren für ζ_m^f6 und ζ_m^f8 festzustellen. Deshalb wurden diese Proben für eine Studie der Bindungsdynamik mittels Stopped-Flow-Messungen ausgewählt.

Wie im Methodenkapitel beschrieben, wurde dazu die fluoreszierende Probe mit verschiedenen Neomycinkonzentrationen gemischt und die resultierende Änderung des Fluoreszenzsignals bei 460 nm in Echtzeit aufgezeichnet. Die entsprechenden korrigierten Transienten sind in Abbildung 4.44 aufgetragen. Ohne Neomycinzugabe (0 Äquivalente, 0 eq) ist hier ein konstantes Emissionssignal zu beobachten. Allerdings führt bei beiden Proben schon eine unterstöchiometrische Ligandenzugabe (0,75 eq bzw. 0,5 eq) zu einem deutlichen und schnellen Anstieg des Signals. Mit zunehmender Neomycinkonzentration wird der Signalanstieg immer schneller. Auch die Amplitude des Anstiegs wächst zunächst mit steigender Konzentration, erreicht aber spätestens mit der Zugabe von vier bis sechs Äquivalenten (4–6 eq) Neomycin ein Maximum bzw. einen Sättigungswert. Bei der Zugabe von sechs bis neun Äquivalenten (6–9 eq) wird dieser Sättigungswert im Fall von ζ_m^f6 in etwa 20 ms erreicht. Im Fall von ζ_m^f8 wird der Sättigungswert bei Zugabe von sechs bis zehn Äquivalenten (6–10 eq) Neomycin in deutlich unter 10 ms erreicht.

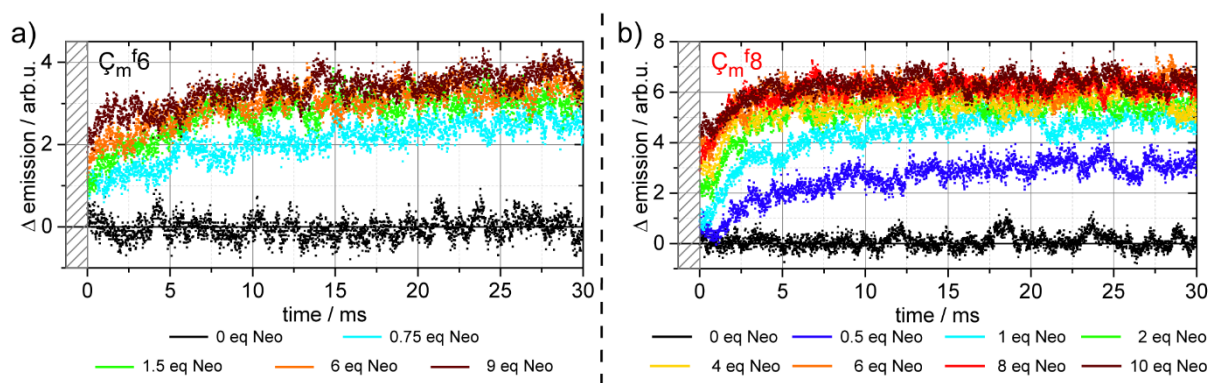


Abbildung 4.44. Transiente Änderung des Fluoreszenzsignals nach der Stopped-Flow-Mischung von a) $2,7 \mu\text{M } \zeta_m^f6$ und b) $4 \mu\text{M } \zeta_m^f8$ jeweils mit unterschiedlich konzentrierten Neomycinelösungen. Die Konzentrationen der Neomycinelösungen sind als Äquivalente (eq) der jeweiligen Aptamerkonzentration angegeben.

Rein qualitativ kann also zunächst festgestellt werden, dass das N1-Aptamer eine sehr schnelle, von der Ligandenkonzentration abhängige Bindungskinetik zeigt. Dabei fällt allerdings auf, dass der Signalanstieg im Fall von ζ_m^f8 deutlich schneller vonstattengeht als im Fall von ζ_m^f6 . Entsprechend muss davon ausgegangen werden, dass die gemessene Bindungskinetik auch abhängig von der ζ_m^f -markierten Position ist.

Um diese Aussagen quantifizieren zu können, wurde jeweils versucht, ein Bindungsmodell an die Messdaten anzupassen. Dazu wurde, wie im Methodenkapitel beschrieben, die Software DynaFit4 verwendet.^{173,174} Die Anpassungen wurden mittels verschiedener Bindungsmodelle getestet und die Qualitäten der verschiedenen Anpassungen anschließend miteinander verglichen. Dadurch sollte es letztlich ermöglicht werden, eine Aussage über den Bindungsmechanismus des N1-Aptamers zu treffen.

Tabelle 4.16. Reaktionsgleichungen der getesteten Bindungsmodelle.

Modell	Reaktionsschema
one-step	$A + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} AL$
two-step (no back reaction)	$A + L \xrightarrow{k_1} AL^* \xrightarrow{k_2} AL$
Michaelis-Menten	$A + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} AL^* \xrightarrow{k_2} AL$
two-step	$A + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} AL^* \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} AL$

$A = \text{Aptamer}$, $L = \text{Ligand}$, $AL^* = \text{Zwischenzustand}$, $AL = \text{finaler Zustand, mit gebundenem Liganden}$.

In Tabelle 4.16 sind die vier getesteten Bindungsmodelle zusammen mit den entsprechenden Reaktionsgleichungen zusammengefasst. Dabei handelt es sich um ein Einschrittmodell (*one-step*) mit Hin- und Rückreaktion und um drei verschiedene Zweischrittmodelle. Das einfachste dieser Zweischrittmodelle beschreibt eine irreversible Reaktionsfolge (*two-step (no back reaction)*), weist also keine Rückreaktionsschritte auf. Das komplizierteste Modell stellt einen Zweischrittmechanismus mit Hin- und Rückreaktion (*two-step*) in jedem Schritt dar. Als Vereinfachung dazu kann der Michaelis-Menten-Mechanismus (*Michaelis-Menten*) angesehen werden. Dieses Modell findet häufig bei der Beschreibung von Protein-Substratbindungsreaktionen Anwendung. In diesem Mechanismus ist nur der erste Reaktionsschritt reversibel. Die entsprechenden Skripte zur Anpassung dieser Modelle an die gemessenen Daten sind im Anhang (Kapitel 7.1.3.3 und Kapitel 7.1.3.4) dieser Arbeit zu finden.

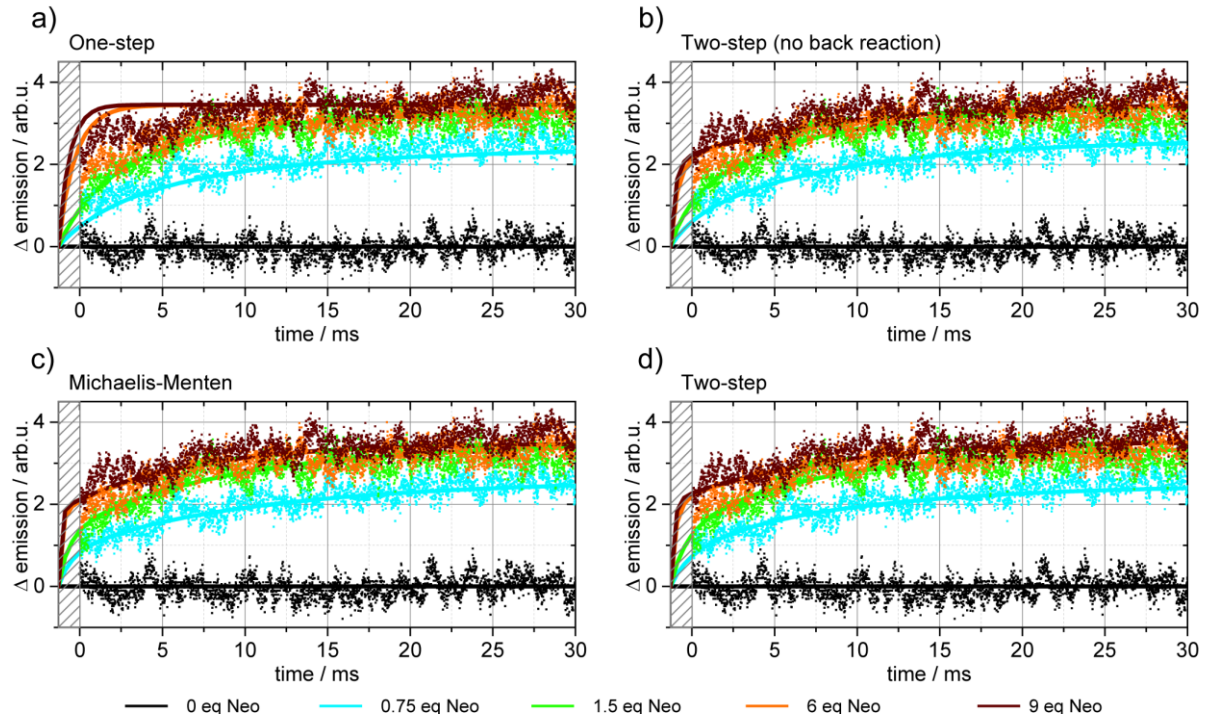


Abbildung 4.45. Transiente Änderung des Fluoreszenzsignals nach der Stopped-Flow-Mischung von $2,7 \mu\text{M}$ Çmf6 mit unterschiedlich konzentrierten Neomycinlösungen im Vergleich zu den Anpassungen der getesteten Reaktionsmodelle. a) Einschrittbindungsmodell, b) Zweischrittbindungsmodell ohne Rückreaktionen, c) Michaelis-Menten-Bindungsmodell, d) Zweischrittbindungsmodell mit Rückreaktionen.

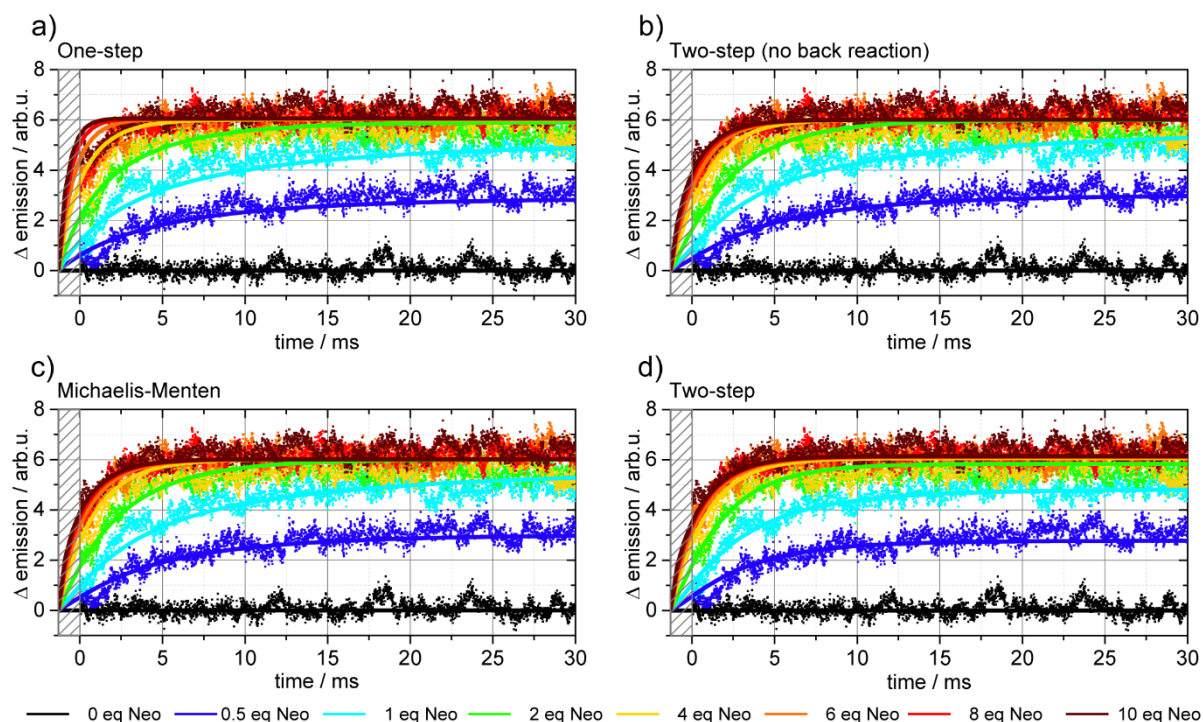


Abbildung 4.46. Transiente Änderung des Fluoreszenzsignals nach der Stopped-Flow-Mischung von $4 \mu\text{M } \zeta_m^f 8$ mit unterschiedlich konzentrierten Neomycinslösungen im Vergleich zu den Anpassungen der getesteten Reaktionsmodelle. a) Einschrittbindungsmodell, b) Zweischrittbindungsmodell ohne Rückreaktionen, c) Michaelis-Menten-Bindungsmodell, d) Zweischrittbindungsmodell mit Rückreaktionen.

In Abbildung 4.45 und Abbildung 4.46 sind die entsprechenden Ergebnisse der Anpassungen graphisch, im Vergleich zu den jeweiligen Messdaten, aufgetragen. Für beide Proben ergibt sich hier ein sehr ähnliches Bild: So lassen sich die jeweiligen Datensätze nicht mittels eines einstufigen Modells beschreiben. Ein einstufiges Modell unter- oder überschätzt systematisch die Geschwindigkeit des Signalanstiegs zu Beginn der Dynamik. Dabei wird die Geschwindigkeit des Anstiegs der Transienten mit niedrigeren Neomycinkonzentrationen eher unterschätzt, während die Geschwindigkeit des Anstiegs der Transienten mit höheren Neomycinkonzentrationen eher überschätzt wird. Die Unterschiede in der Anpassungsqualität zwischen den anderen drei Modellen lassen sich allerdings nicht ohne weiteres anhand Abbildung 4.45 bzw. Abbildung 4.46 ausmachen.

Für eine klare Einschätzung der Anpassungsqualität der Modelle für die jeweilige Messung muss das Akaike-Informationskriterium (AIC) herangezogen werden. Neben diesem Wert sind in Tabelle 4.17 bzw. in Tabelle 4.18 auch noch die mittleren quadratischen Abweichungen der Anpassungen angegeben. Anhand dieser Werte ist klar ersichtlich, dass die beste Anpassung der Daten beider Messungen mittels des zweischrittigen Modells mit Rückreaktionen erreicht wird ($\Delta\text{AIC}=0$), während das einstufige Modell die schlechteste Anpassung liefert. Der Michaelis-Menten-Mechanismus sowie der zweischrittige Mechanismus ohne Rückreaktionen ähneln sich jeweils in den gefitteten Parametern und damit auch in der Qualität der Anpassung. Diese liegt zwischen dem einstufigen und dem zweistufigen Modell.

Tabelle 4.17. Ergebnisse der Anpassung der verschiedenen Bindungsmodelle an die $\zeta_m^f 6$ -Stopped-Flow-Transienten.

Modell	k_1 / $(\mu\text{Ms})^{-1}$	k_{-1} / s^{-1}	k_2 / s^{-1}	k_{-2} / s^{-1}	$r(\text{AL}^*)$ / %	$r(\text{AL})$ / %	RMSD	ΔAIC
one-step	131	3	-	-	-	100	0,0036	10662
two-step (no back reaction)	311	-	113	-	61	39	0,0029	1210
Michaelis-Menten	662	178	141	-	55	45	0,0028	387
two-step	425	48	80	31	52	48	0,0028	0

$r(\text{AL}^*)$ = Response der Komponente AL^* , $r(\text{AL})$ = Response der Komponente AL , AIC = Akaike-Informationskriterium, RMSD = mittlere quadratische Abweichung.

Aus der Anpassung der Messdaten mittels des Zweischrittmodells ergeben sich im Fall von $\zeta_m^f 6$ die folgenden Ratenkonstanten: Der erste Schritt des Ligandenbindungsmechanismus ist eine bimolekulare Reaktion mit einer

Ratenkonstante von $k_1=425 (\mu\text{Ms})^{-1}$. Auf diesen Schritt folgt ein zweiter deutlich langsamerer und monomolekularer Reaktionsschritt mit einer Ratenkonstante von $k_2=80 \text{ s}^{-1}$. Beide Reaktionsschritte weisen Rückreaktionen auf. Die entsprechenden Rückreaktionsraten sind deutlich kleiner als die zugehörigen Ratenkonstanten der Hinreaktion. Außerdem fällt auf, dass die Raten der beiden Rückreaktionen ähnlich groß sind ($k_{-1}=48 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2}=31 \text{ s}^{-1}$). Die beiden Reaktionsschritte sind mit sehr ähnlichen Änderungen (Response) des Fluoreszenzsignals (52% bzw. 48%) verknüpft.

Tabelle 4.18. Ergebnisse der Anpassung der verschiedenen Bindungsmodelle an die ζ_m^f -Stopped-Flow-Transienten.

Modell	k_1 / $(\mu\text{Ms})^{-1}$	k_{-1} / s^{-1}	k_2 / s^{-1}	k_{-2} / s^{-1}	$r(\text{AL}^*)$ / %	$r(\text{AL})$ / %	RMSD	ΔAIC
one-step	92	6	-	-	-	100	0,0046	9194
two-step (no back reaction)	120	-	637	-	44	56	0,0043	5228
Michaelis-Menten	141	100	609	-	44	56	0,0043	4956
two-step	207	113	417	125	22	78	0,0040	0

$r(\text{AL}^*)$ = Response der Komponente AL^* , $r(\text{AL})$ = Response der Komponente AL , AIC = Akaike-Informationskriterium, RMSD = mittlerer quadratischer Abweichung.

Die Anpassung der Messdaten von ζ_m^f mittels des Zweischrittmodells ergibt deutlich andere Ratenkonstanten: So weist der erste Schritt des Ligandenbindungsmechanismus eine Ratenkonstante von $k_1=207 (\mu\text{Ms})^{-1}$ auf. Der zweite Reaktionsschritt (monomolekular) ist schneller und kann mit einer Ratenkonstante von $k_2=417 \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden. Beide Reaktionsschritte sind reversibel, wobei wie bei ζ_m^f die entsprechenden Rückreaktionsraten signifikant kleiner sind als die zugehörigen Ratenkonstanten der Hinreaktion. Die Raten der beiden Rückreaktionen sind auch bei ζ_m^f annähernd gleich groß ($k_{-1}=113 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2}=125 \text{ s}^{-1}$). Des Weiteren kann aus der Anpassung geschlossen werden, dass der erste Reaktionsschritt mit 22% der Änderung (Response) des Fluoreszenzsignals verknüpft ist, während der zweite schnellere Schritt für die restlichen 78% der Signaländerung verantwortlich ist.

4.2.3.6 Bindungsmodell

Durch Kombination der Ergebnisse der statischen und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ist es möglich, einen Bindungsmechanismus für das N1-Aptamer zu postulieren (Abbildung 4.47): Zunächst muss, unter anderem aufgrund der Fluoreszenzanisotropiemessungen, davon ausgegangen werden, dass das Aptamer weitestgehend vorgefaltet (pH 7,4; 20 °C), also wie mit gebundenem Liganden, vorliegt. Das heißt, auch ohne Liganden nimmt das Aptamer die Konformation des ligandengebundenen Zustands ein. Wahrscheinlich steht diese vorgefaltete Struktur aber in einem Gleichgewicht mit der bzw. den ungefalteten Konformationen.

Wie die Stopped-Flow-Experimente zeigen, kann Neomycin in einem ersten Schritt relativ schnell an die vorgefaltete Struktur, also via Konformationsauswahl (*conformational selection*) binden (k_1). Dies scheint mehr oder weniger unspezifisch im Bereich der internen Schleife stattzufinden. Dabei verursacht die unspezifische Bindung zunächst wahrscheinlich keine strukturellen Änderungen des Aptamers. Die beobachteten Signaländerungen der Stopped-Flow-Experimente im ersten Bindungsschritt sind also eher auf direkte Wechselwirkungen zwischen Neomycin und dem ζ_m^f -Label zurückzuführen. Deshalb sind deutliche Unterschiede der Dynamiken zwischen den Proben ζ_m^f 6 und ζ_m^f 8 feststellbar.

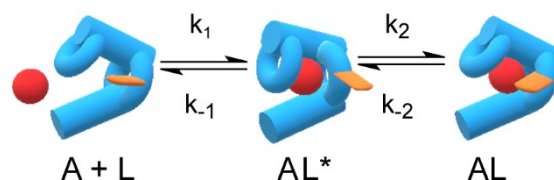


Abbildung 4.47. Cartoon des vorgeschlagenen Bindungsmechanismus. Neomycin ist hier als rote Kugel, ζ_m^f als orangefarbenes Plättchen und das N1-Aptamer als blaue Klammer dargestellt.

Im zweiten Reaktionsschritt kommt es dann schließlich zur Ausbildung von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Aptamer (k_2). Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um die mittels NMR-Spektroskopie gefundenen Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen. Dies führt offenbar zu kleineren

strukturellen Änderungen innerhalb des Aptamers. Die strukturellen Änderungen des Aptamers führen wiederum zu einer veränderten Mikroumgebung (Orientierung, Lösungsmittelzugänglichkeit usw.) des Fluorophors, was die mittels Stopped-Flow beobachtete Signaländerung des zweiten Bindungsschritts erklärt. Allerdings scheint sich die äußere Form bzw. das Volumen des Aptamers dabei nicht wesentlich zu verändern, weshalb auch keine Änderung der Fluoreszenzanisotropie feststellbar ist. Vielmehr scheint es sich bei dem zweiten Schritt um eine interne Stabilisierung der Struktur zu handeln, durch die der Ligand fest an das Aptamer gebunden wird. Dementsprechend ist die Assoziationsrate (k_2) des zweiten Schrittes, sowohl für ζ_m^{f6} als auch für ζ_m^{f8} , mehr als einen Faktor 2,5 höher als die entsprechende Dissoziationsrate (k_{-2}). Folglich wird eine Dissoziation von Ligand und Aptamer nach dem zweiten Bindungsschritt wesentlich unwahrscheinlicher.

4.2.4 Zusammenfassung und Fazit

Im Rahmen dieses Projekts wurde zunächst eine detaillierte spektroskopische Charakterisierung der RNA-Label ζ_m und ζ_m^f durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass intermolekulare Wechselwirkungen direkten Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer sowie auf die Fluoreszenzquantenausbeute beider Marker haben. So konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenzlabel ζ_m^f als lokale Sonde in RNA eingesetzt werden kann, die empfindlich auf Änderungen seiner Mikroumgebung reagiert. Die hier gefundenen Werte und Eigenschaften des ζ_m^f -Labels in Lösung können nun folglich als interner Standard im Vergleich zu ζ_m^f -markierten RNA-Konstrukten eingesetzt werden.

Gleichzeitig konnte der starke Fluoreszenzlöschungseffekt des ζ_m -Spinlabels verdeutlicht und quantifiziert werden. Durch Kombination verschiedenster spektroskopischer Daten sowie durch quantenchemische Rechnungen, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Dreuw (Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg), war es außerdem möglich, den zugrunde liegenden Mechanismus der Fluoreszenzlöschung zu ermitteln. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Fluoreszenz des ζ_m durch eine sehr schnelle interne Konversion (IC), vom D_2 - in den dunklen D_1 -Zustand, gelöscht wird. Der D_1 -Zustand wird im Anschluss, höchstwahrscheinlich, durch eine weitere interne Konversion in den Grundzustand überführt. Alternativ kann es aber auch zu einem ISC vom D_1 -Zustand in höhere Quartettzustände kommen. Dementsprechend kann der D_1 -Zustand als Zwischenzustand des Fluoreszenzlöschungsmechanismus interpretiert werden. Ein solcher Zwischenzustand ist ungewöhnlich, da (E)IC-Mechanismen üblicherweise als schnelle Übergänge vom angeregten Zustand direkt in den Grundzustand beschrieben werden. Darüber hinaus kann der hier vorgestellte Quenchingmechanismus auch als intramolekularer Dexter-Energietransfer vom Chromophor zur Nitroxid des ζ_m interpretiert werden. Alternative Quenchingmechanismen, wie FRET, ISC und ET, konnten gleichzeitig aufgrund der spektroskopischen und theoretischen Daten weitestgehend ausgeschlossen werden. Insgesamt konnte durch die genaue Untersuchung des ζ_m -Quenchingmechanismus nicht nur die Photophysik des Spinlabels ζ_m , sondern auch die Photophysik des Fluorophors ζ_m^f im Detail beschrieben werden.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von RNA-Modellsequenzen auf die gefundenen photophysikalischen Eigenschaften des ζ_m^f -Labels ausführlich untersucht. Dabei konnte zunächst bewiesen werden, dass der Einbau des Markers in RNA-Doppelstränge zu keiner signifikanten Destabilisierung der Stränge führt. Darüber hinaus liefern Messungen der Fluoreszenzanisotropie Hinweise auf den sehr starren Einbau des Fluorophors in RNA-Oligonukleotide. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es mittels der ζ_m^f -Fluoreszenz möglich ist, zwischen markierten Einzel- und Doppelsträngen zu unterscheiden. Die Unterschiede zeigen sich sowohl in der spektralen Form des Signals als auch in der Fluoreszenzquantenausbeute sowie in der Fluoreszenzlebensdauer. Darüber hinaus ist es über die beiden zuletzt genannten Größen möglich, Aussagen zu den direkten Nachbarbasen des Fluorophors im markierten Strang zu machen. So ist im direkten Vergleich eine Unterscheidung zwischen benachbarten Purin- und Pyrimidinbasen möglich. Insgesamt konnte mittels dieser Studie gezeigt werden, dass der Fluorophor ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel geeignet ist. Gleichzeitig können die dabei erhaltenen Daten wieder als interner Standard im Falle von komplizierteren RNA-Studien Anwendung finden.

Unter anderem um diese Anwendung beispielhaft zu zeigen, wurde im nächsten Schritt das neomycinbindende Aptamer an verschiedenen Stellen mit ζ_m^f markiert. Vor allem sollten hierdurch aber zusätzliche Informationen über den Mechanismus der Ligandenbindung dieses Aptamers gewonnen werden. Dabei konnte zunächst, unter anderem durch Messungen der Fluoreszenzanisotropie, bestätigt werden, dass es im Rahmen der Ligandenbindung zu keinen größeren strukturellen Änderungen des Aptamers kommt. Durch statische Emissionsmessungen war es möglich, zwei Labelpositionen zu identifizieren die sich, aufgrund großer Signaländerung bei der Ligandenbindung, für Stopped-Flow-Experimente eignen. Entsprechend war es mittels Stopped-Flow-Messungen möglich, die Bindungsdynamik dieser beiden markierten Aptamerproben zu beobachten. Anhand der so gewonnenen transienten Daten konnte im nächsten Schritt ein Bindungsmodell bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass sich die beobachtete Bindungsdynamik am besten durch ein Zweischrittbindungsmodell beschreiben lässt. Deshalb kann vermutet werden, dass Neomycin zunächst unspezifisch innerhalb oder in der Nähe der Bindetasche des weitgehend vorgeformten Aptamers gebunden wird. Erst im zweiten Schritt kommt es dann zur Ausbildung von spezifischen Bindungen zwischen Ligand und Aptamer. Weiterhin kann vermutet werden, dass es bei diesem zweiten Schritt lediglich zu kleinen Änderungen der Konformation des Aptamers kommt.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass das ζ_m^f -Label, sowohl in Lösung als auch eingebaut in RNA, umfassend untersucht und charakterisiert wurde. Anhand von Studien an Modellsystemen sowie mittels einer Ligandenbindungsstudie des neomycinbindenden Aptamers konnte gezeigt werden, dass sich ζ_m^f vorzüglich als RNA-Fluoreszenzlabel eignet.

4.3 Cryotrapping von Proteinen

Wie schon im Material- und Methodenkapitel beschrieben, handelt es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Cryotrappingexperimenten um statische Absorptionsmessungen von tiefgefrorenen Proben. Die kritischen Punkte dieser Methode sind die Probenpräparation sowie die Auswertung der Messungen. Entsprechend wurde viel Aufwand in die Optimierung dieser Parameter gesteckt. Dazu wurden Messungen an GPR, GPR_{E108Q} sowie an ChR2 durchgeführt. Anhand dieser drei Proben sollen die Möglichkeiten und Grenzen der Methode demonstriert werden. Die Methodenoptimierung sowie die GPR- und GPR_{E108Q}-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Tobias Fischer im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

4.3.1 Optimierung der Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurden viele Details des Cryotrappingmessaufbaus bzw. des Messverfahrens optimiert. Die kritischsten Punkte sind in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.

4.3.1.1 Einfrieren der Probe

Die Qualität einer Kryoabsorptionsmessung ist vor allem vom gefrorenen Zustand der jeweiligen Probe abhängig. So lassen sich qualitativ hohe Absorptionsspektren von wässrigen Proben nur aufzeichnen, wenn es beim schnellen Einfrieren der Probe zu einem sogenannten Glasübergang kommt. Dabei entsteht ein amorphes Glas mit hoher Durchlässigkeit für UV/vis-Strahlung. Kommt es dagegen zur Ausbildung von vielen kleinen Eiskristallen innerhalb der Probe, so streuen diese stark die UV/vis-Strahlung. Entsprechend ist in diesem Fall ein starker Streuuntergrund auf den Absorptionsspektren zu sehen. Im Extremfall ist durch zu starke Streuung keine Absorptionsmessung möglich.

Deshalb wurde für die hier gezeigten Cryotrappingexperimente versucht, möglichst homogene Gläser mit wenigen kristallinen Anteilen herzustellen. Bei wässrigen Proben war dies generell nur möglich, wenn die Proben einen Glycerinanteil von ca. 60% vol aufweisen. Davon abgesehen gibt es verschiedene Abkühlprotokolle, die in der Folge kurz diskutiert werden sollen:

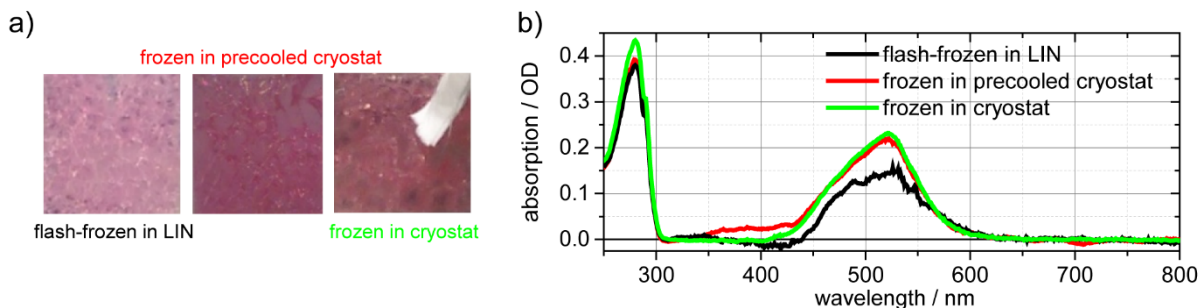


Abbildung 4.48. Vergleich der verschiedenen Einfrieremethoden. a) Beispielhafte Fotografien von GPR-Proben (pH=8,5; 1 mm Küvette) nach den verschiedenen Einfrieremethoden. b) Vergleich von untergrundkorrigierten GPR-(pH=8,5; 1 mm Küvette) Grundzustandsspektren in Abhängigkeit von der Einfrieremethode.

Die schnellste Gefrieremethode ist das sogenannte Schockgefrieren der Probe. Dazu wird die Probenküvette direkt in flüssigen Stickstoff (LIN) getaucht. Dabei kommt es allerdings sehr häufig zu Schäden an der Küvette und dadurch wiederum zum Verlust der Probe. Grund dafür sind die Spannungen, die innerhalb der Küvette durch die schnellen Temperaturänderungen auftreten können. Außerdem kommt es nach dem Schockgefrieren meistens zu Kondensation von Feuchtigkeit aus der Raumluft auf der Küvettenoberfläche. Der so gebildete Raureif muss vor dem Einsetzen der Küvette in den vorgekühlten Kryostaten im Stickstoffgegenstrom entfernt werden. Dabei kommt es erfahrungsgemäß häufig zu leichtem Antauen der Probe in der Küvette. Des Weiteren sind bei dieser Methode häufig mehrere Versuche nötig, um ein optisch durchlässiges Probenglas zu erzeugen.

Alternativ dazu kann der Kryostat zunächst ohne Probe auf die Zieltemperatur, üblicherweise rund 77 K, heruntergekühlt werden. Im Anschluss wird die flüssige Probe schnell im Stickstoffgegenstrom in den Kryostaten eingebracht. Da hier die Wärmeübertragung zwischen LIN und Probe indirekt über kalten gasförmigen Stickstoff (alternativ Helium) abläuft, friert hier die Probe im Vergleich zur Schockgefrieremethode etwas langsamer. Eine Beschädigung der Küvette kann aber auch hier nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings erwies sich

dieses Verfahren insgesamt als etwas materialschonender. Außerdem treten hier nur selten Probleme durch Wasserdampfkondensation bzw. Raureifbildung auf der Küvette auf.

Als dritte Alternative kann die Probe im Kryostaten bei Raumtemperatur vorgelegt und ausgerichtet werden. Erst im Anschluss daran wird der Kryostat inklusive Probe heruntergekühlt. Auch hier erfolgt die Wärmeübertragung über den gasförmigen Stickstoff innerhalb der Probenkammer. Allerdings muss hier zusätzlich auch dieses Gas heruntergekühlt werden, bevor die Probe heruntergekühlt wird. Entsprechend ist diese Methode die zeitaufwendigste bzw. in diesem Fall dauert der Gefrierprozess am längsten. Trotzdem kann es auch hier zu einem Bruch der Küvette kommen. Wasserdampfkondensation bzw. Reifbildung auf der Küvette kann allerdings so gut wie ausgeschlossen werden.

Es zeigte sich, dass die beiden zuletzt genannten Methoden die qualitativ hochwertigeren Probengläser ergeben. Dies ist deutlich anhand der Fotos und der Spektren in Abbildung 4.48 zu erkennen. Bei keiner der drei Methoden bildet sich ein durchgängig klares Probenglas. Vielmehr ähneln die gefrorenen Proben eher gebrochenem Sicherheitsglas. Die Größe der transparenten Teilbereiche hängt von der Gefriermethode ab. Die Schockgefriermethode führt zu relativ kleinen homogenen Glasbereichen bzw. zu vielen Rissen im Glas. Dies verursacht einen deutlich höheren Streuuntergrund im Absorptionsspektrum sowie weitere spektrale Artefakte. Außerdem scheint die thermische Belastung des Küvettenmaterials bei den letztgenannten beiden Methoden etwas geringer zu sein, sodass weniger Küvetten zerstört werden. Dementsprechend wurden diese beiden Methoden, trotz des höheren Zeitaufwands, vorzugsweise verwendet. Die Schockgefriermethode kann dagegen als Alternative für besonders schnelles Cryotrapping oder für Voruntersuchungen verwendet werden.

4.3.1.2 *Präparation der Probenküvette*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben für Tieftemperaturabsorptionsmessungen sowohl in 1 mm Absorptionsküvetten als auch in sogenannten Sandwichküvetten (Schichtdicke typischerweise 50 µm oder 100 µm) hergestellt. Beide Präparationsmethoden eignen sich für Tieftemperaturmessungen. In der Folge sollen kurz die Vor- und Nachteile beider Methoden diskutiert werden.

Die Präparation der Probe in einer 1 mm Absorptionsküvette ist schneller und einfacher. Außerdem ist es hier aufgrund der höheren Schichtdicke möglich, bei gleicher Probenkonzentration höhere optische Dichten zu erreichen. Des Weiteren ist es bei dieser Präparationsform möglich, die Probe nach der Messung zu bergen, um diese für andere Messungen verwenden zu können.

Dagegen ist die Probenpräparation in einer Sandwichküvette deutlich aufwendiger und fehleranfällig. Um hier hohe optische Dichten zu erreichen, müssen die Proben angetrocknet werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Proteinproben nicht komplett eintrocknen und dass keine kritische Salzkonzentration überschritten wird. Des Weiteren können die meisten Proteine nicht beliebig hoch aufkonzentriert werden, ohne dass die Proteine ihre Funktion einbüßen. Außerdem kann es beim Verschließen der Küvette zum Einschluss von Luftblasen kommen. Darüber hinaus ist es so gut wie nicht möglich, die Probe aus einer Sandwichküvette wieder zu bergen.

Vorteilhaft bei der Probenpräparation in einer Sandwichküvette ist allerdings, dass durchschnittlich etwas weniger Stoffmenge benötigt wird. Außerdem scheint die Küvette schneller auf Temperaturänderungen zu reagieren. Darüber hinaus entstehen, wahrscheinlich aufgrund der geringeren Schichtdicke, tendenziell qualitativ hochwertige Probengläser. Außerdem können die Sandwichküvetten selbst bei relativ schlechten Probengläsern weiterhin mit UV/vis-Licht durchstrahlt werden. Entsprechend sollten Temperaturbereiche, in denen z.B. ein Phasenübergang stattfindet, mithilfe dieses Küvettentyps leichter zu untersuchen sein. Außerdem eignet sich diese Präparationsmethode auch für Absorptionsmessungen im Infrarotbereich.

Zur Präparation von Kryoproben wurden sowohl solubilisierete als auch rekonstituierte Proteinproben verwendet. Der Streuuntergrund der rekonstituierten Proben ist schon bei Raumtemperatur deutlich stärker als bei den solubilisierten Proben. Dieser Effekt verstärkt sich noch weiter beim Gefrieren der Proben. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich mit solubilisierten Proben tendenziell hochwertigere Probengläser herstellen lassen.

4.3.1.3 *Belichtungsprotokoll*

Um im Kryoexperiment Informationen über den Photozyklus der untersuchten Retinalproteine zu bekommen, war es nötig, die Proben zu belichten. Erst dadurch können Photointermediate angereichert und anschließend eingefroren werden. Je nach Probe und Fragestellung sind hier natürlich unterschiedliche Belichtungsprotokolle

nötig. Generell kann man zwischen zwei verschiedenen Belichtungsstrategien bzw. Belichtungsprotokollen unterscheiden (Abbildung 4.49). So kann die Probe entweder während des gesamten Abkühlvorgangs belichtet werden oder zunächst im Dunklen eingefroren und dann anschließend bei der gewünschten Temperatur belichtet werden.

Die zuletzt genannte Methode (Abbildung 4.49a) vereinfacht die Differenzenbildung zwischen dem belichteten Light- und dem unbelichteten Darkspektrum. Der Grund dafür ist, dass zwischen beiden Messungen nur wenig Zeit vergeht und die Probe nicht erneut aufgetaut und wieder eingefroren werden muss. Nachteilig bei dieser Methode ist allerdings, dass bei gefrorenen Proben die Belichtungseffizienz, eventuell durch Streuung, sinkt. Entsprechend sind tendenziell höhere Lichtleistungen nötig, um signifikante Mengen eines Photointermediats akkumulieren zu können. Bei intensiven Belichtungen kann es eventuell zu Beschädigungen der Proben kommen. Außerdem sind je nach Temperatur nur einzelne Intermediate akkumulierbar. Darüber hinaus haben die Proteine im gefrorenen Zustand keine Möglichkeit zur Relaxation, weshalb bei niedrigen Temperaturen wahrscheinlich nur die Konformationsänderungen des Retinals beobachtet werden können.

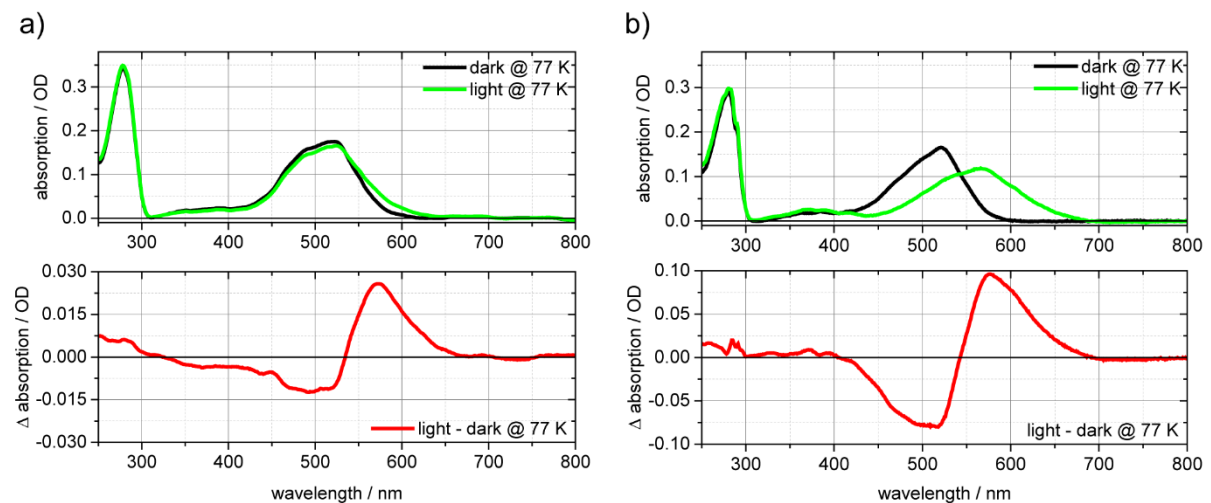


Abbildung 4.49 Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten) von GPR (pH=8,5; 1 mm Küvette) nach Belichtung bei 77 K (a) und nach Belichtung während des Abkühlens (b).^y

Belichtet man die Probe dagegen während des Herunterkühlens (Abbildung 4.49b) ist es möglich, einen größeren Anteil der Probe anzuregen bzw. einen größeren Anteil in einem Photointermediat zu akkumulieren (Abbildung 4.49). Dabei entsteht allerdings eine Mischung aus verschiedenen Intermediaten. Da der Gefrierprozess relativ langsam sein kann, abgesehen von der Schockgefrieremethode, sind hier vergleichsweise lange Belichtungszeiten notwendig. Da dabei aber keine hohen Intensitäten nötig sind, kommt es bei dieser Methode seltener zu einer Degradation der Probe.

^y Wie im Methodenkapitel (Kapitel 3.4.4) beschrieben sind die Spektren im Spektralbereich um 310 nm absichtlich überkorrigiert wurden. Dies war nötig um eine eindeutige Differenzenbildung zwischen dem Dunkelspektrum und den belichteten Spektren gewährleisten zu können.

4.3.2 GPR

Als erster Schritt wurde der GPR-Wildtyp untersucht. Anhand dieser Probe wurden die meisten methodischen Optimierungen vorgenommen. Außerdem wurde getestet, welche Intermediate des GPR-Photozyklus sich direkt durch Einfrieren bzw. durch verschiedene Verlaufsexperimente präparieren bzw. akkumulieren lassen.

4.3.2.1 K-Intermediat

In Abbildung 4.50a ist das korrigierte Absorptionsspektrum einer unbelichteten (*dark*) sowie einer belichteten (530 nm, *light*) Wildtyp-GPR-Probe dargestellt. Um aktinische Effekte zu vermeiden, wurde die Integrationszeit dieser Messung sehr kurz gehalten, was in einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert. Trotzdem ist eine sinnvolle Differenzbildung ohne weiteres möglich. Exemplarisch ist für diese Messung der Effekt einer Glättung durch eine gleitende Mittelwertbildung dargestellt. Wie in Abbildung 4.50b zu sehen ist, geht dadurch keine spektrale Information verloren. Entsprechend kann hier eine Glättung des Spektrums, in engen Grenzen, als legitimes Mittel zur Verbesserung der Datenpräsentation eingesetzt werden. Trotzdem sind alle weiteren hier gezeigten Kryoabsorptionsspektren ungeglättet dargestellt.

Die in Abbildung 4.50 dargestellten Spektren werden jeweils von der Absorptionsbande des Retinals dominiert. Im Grund- bzw. Dunkelzustand erstreckt sich diese Bande im Bereich zwischen 400 nm und 600 nm (*all-trans*-Retinal). Die Belichtung der Probe führt zu einer spektralen Verbreiterung sowie einer signifikanten bathochromen Verschiebung der Absorptionsbande (Absorptionsbereich der verschobenen Bande: 450 nm bis 650 nm).

Aufgrund dieser spektralen Änderungen ergibt sich ein für das K-Intermediat charakteristisches Differenzspektrum. Es besteht aus einer negativen Signaländerung mit einem Maximum bei rund 500 nm sowie einer positiven Signaländerung mit einem Maximum bei rund 580 nm. Die negative Signaländerung kann dabei als Bleichen des Grundzustandes (*Ground-State-Bleaching*, GSB) interpretiert werden. Die Signalzunahme bei 580 nm entspricht dagegen dem K-Intermediat mit *13-cis*-Retinal.

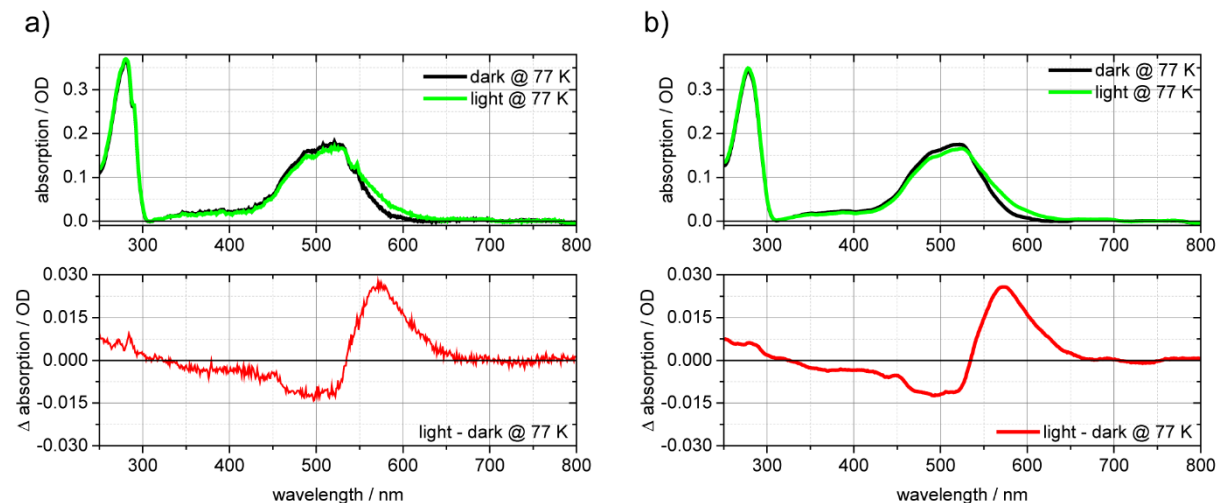


Abbildung 4.50. Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten) von GPR ($pH=8,5$; 1 mm Küvette) nach Belichtung bei 77 K. (a) ohne Glättung, (b) mit Glättung (Fensterbreite 15 Punkte).

4.3.2.2 Sequenzieller Temperaturverlauf

Ausgehend vom oben beschriebenen Differenzspektrum des K-Intermediates war es nun möglich, mittels eines sequenziellen Temperaturverlaufsexperiments die Dynamik des K-Intermediates näher zu untersuchen. Wie im Methodenkapitel (vgl. Kapitel 3.4.3) beschrieben, wird die Probe dabei schrittweise aufgetaut. Zur Messung wird die Probe allerdings nach jedem Schritt wieder auf die Basistemperatur heruntergekühlt.

Wie in Abbildung 4.51 zu erkennen ist, treten bei diesem Experiment im Temperaturbereich bis 160 K nahezu keine spektralen Änderungen auf. Deshalb ist davon auszugehen, dass das K-Intermediat bis mindestens 160 K weitgehend stabil ist. Lediglich im Differenzspektrum ist eine leichte Abnahme der positiven Signalbande im Bereich um 580 nm zu beobachten. Gleichzeitig verändert sich die Amplitude des GSB bei 500 nm jedoch nicht.

Deshalb kann vermutet werden, dass ein kleiner Teil der angeregten Proteine selbst bei 160 K zu späteren Intermediaten weiterreagiert. Allerdings sind diese Intermediate in den Differenzspektren nicht zu erkennen.

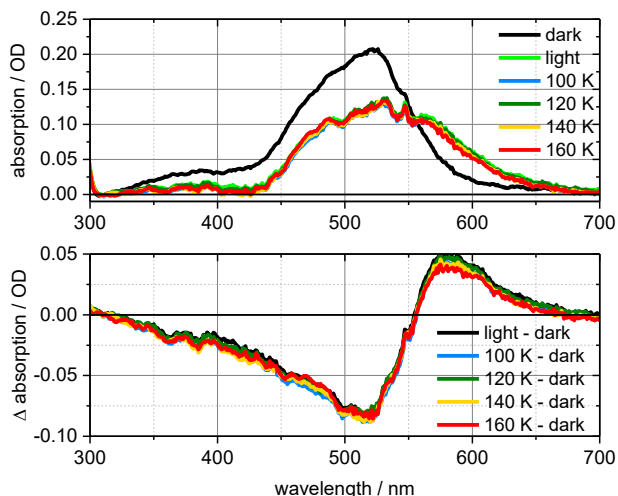


Abbildung 4.51. Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten) eines sequenziellen Temperaturverlaufsexperiments von GPR (pH=8,5; 1 mm Küvette) nach Belichtung während des Abkühlens.

Der Temperaturbereich oberhalb von 160 K konnte in diesem Experiment nicht untersucht werden, da es in dieser Region zu einem Phasenübergang kommt. Durch den Phasenübergang löst sich der glasartige Zustand der Probe innerhalb der Küvette auf. Beim anschließenden Wiedereinfrieren der Probe kommt es zu keinem Glasübergang, sodass die Transparenz der Probe verloren geht.

4.3.2.3 Kontinuierlicher Temperaturverlauf

Um trotzdem den Temperaturbereich oberhalb von 160 K untersuchen zu können, wurde im Anschluss ein kontinuierliches Temperaturverlaufsexperiment vorgenommen. Hierbei wurde auf das wiederholte Einfrieren der Probe verzichtet.

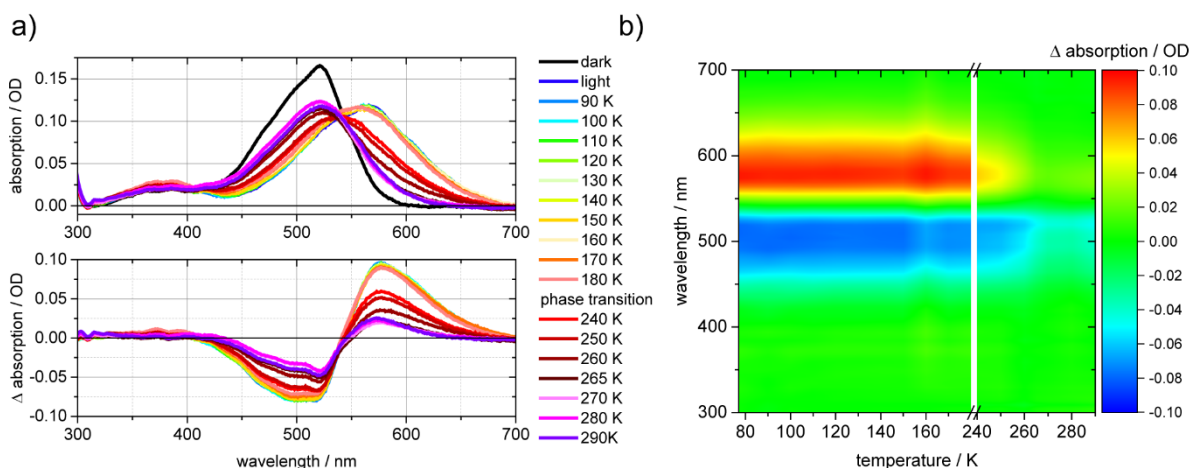


Abbildung 4.52. Kontinuierliches Temperaturverlaufsexperiment von GPR (pH=8,5; Sandwichküvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur. a) Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten), b) Konturdiagrammdarstellung der Differenzspektren.

Wie in Abbildung 4.52 zu erkennen, ist auch in diesem Experiment bis zu einer Temperatur von 180 K nahezu keine spektrale Änderung festzustellen. Oberhalb von 180 K kommt es wieder zu einem Phasenübergang. Dadurch war es bis 240 K nicht möglich, ein Absorptionsspektrum aufzuzeichnen. Oberhalb von 240 K ist dann zu erkennen, dass die Amplituden der beiden Differenzbanden im Bereich des spektroskopisch nicht zugänglichen Phasenübergangs deutlich abgenommen haben. Im Verlauf nehmen die Amplituden der Differenzbanden immer weiter ab. Gleichzeitig schiebt das positive Differenzsignal leicht hypsochrom. Die größte hypsochrome

Verschiebung ist dabei zwischen 250 K und 260 K zu beobachten. Gleichzeitig verschwindet in diesem Temperaturbereich ein kleines positives Differenzsignal im Spektralbereich um 380 nm.

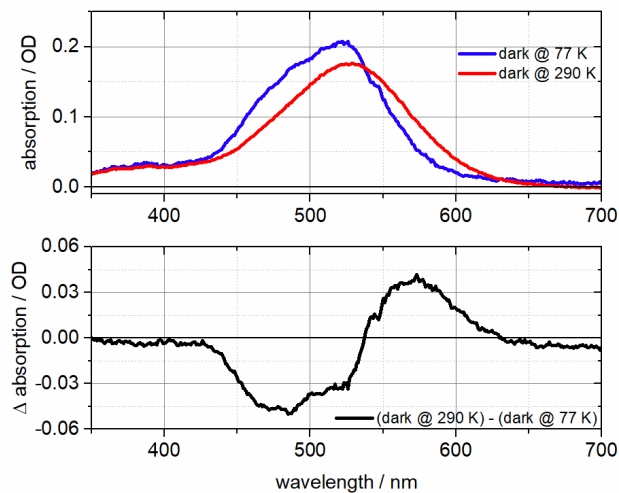


Abbildung 4.53. Vergleich der Dunkelspektren von GPR ($pH=8,5$; 1 mm Küvette) bei 77 K und bei 290 K: Absolutspektren (oben) und Differenzspektrum (unten).

Auffällig ist allerdings, dass selbst bei 290 K noch Differenzsignale zu erkennen sind. Grund dafür ist, dass sich das Dunkelspektrum bei 77 K vom Dunkelspektrum bei Raumtemperatur unterscheidet. Wie in Abbildung 4.53 zu erkennen ist, ist die Hauptabsorptionsbande des GPR bei 77 K leicht hypsochrom zum entsprechenden Spektrum bei Raumtemperatur verschoben. Diese Verschiebung lässt sich über eine unterschiedliche Besetzung von Schwingungszuständen bei den unterschiedlichen Temperaturen erklären. So ist es sehr wahrscheinlich, dass bei Raumtemperatur wesentlich höhere Schwingungszustände besetzt werden können als bei 77 K. Deshalb ist die Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand und den angeregten Zuständen bei Raumtemperatur kleiner. Entsprechend ist eine Anregung auch mit längerwelligem bzw. energieärmerem Licht möglich. Eine alternative Erklärung ist, dass sich die Abstände zwischen den Aminosäuren und des Retinals sowie die Bindungsabstände im Retinal selbst temperaturabhängig ändern. Dadurch kommt es zu dem beschriebenen temperaturabhängigen spektralen Schieben der Absorptionsbande. Außerdem ist davon auszugehen, dass das Retinal bei 77 K die energieärmste Konformation einnimmt, während bei Raumtemperatur auch höherenergetische Konformationen möglich sind. Dies schlägt sich, wie oben für die Schwingungsniveaus diskutiert, ebenfalls in der nötigen Anregungsenergie nieder. Entsprechend lässt sich die temperaturabhängige spektrale Verschiebung auch über die Konformationen des Retinals erklären.

Für die hier diskutierten Temperaturverlaufsmessungen bedeutet dies, dass man, trotz des Differenzsignals bei Raumtemperatur, davon ausgehen kann, dass das Protein am Ende des Experiments wieder vollständig in den Grundzustand relaxiert ist. Entsprechend kann schon das Differenzspektrum bei 270 K als Grundzustandsspektrum interpretiert werden.

Das kontinuierliche Temperaturverlaufsexperiment von GPR zeigt also, dass das K-Intermediat bis mindestens 180 K stabil ist. Dies lässt sich durch die Bewegungseinschränkung des Proteins bei tiefen Temperaturen erklären. Denn um spätere Intermediate im Photozyklus erreichen zu können, muss es zu Umlagerungen in der Proteinkonformation kommen. Mit steigender Temperatur nimmt offenbar die Beweglichkeit zu, sodass oberhalb von 240 K das Signal des K-Intermediates nach und nach verschwindet und der Grundzustand wieder bevölkert wird. Ab 270 K ist davon auszugehen, dass sich das Protein wieder im Grundzustand befindet. Während des gesamten Experiments lassen sich keine signifikanten Signale späterer Photointermediate feststellen. Entweder konnten nicht genug dieser Intermediate akkumuliert werden, um sie über die Absorptionsmessungen nachweisen zu können, oder die Intermediate entstehen bei den vorliegenden Bedingungen überhaupt nicht.

Insgesamt lässt sich in den Differenzspektren nur ein isosbestischer Punkt bei rund 540 nm identifizieren. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass nur zwei Zustände (Grundzustand und K-Intermediat) wesentliche Beiträge zum Absorptionssignal liefern. Gleichzeitig kann daraus geschlossen werden, dass es zu einer schnellen Abreaktion, also zu keiner Anreicherung möglicher Zwischenprodukte bzw. Photointermediate kommt.¹⁹⁸ Dies

gilt insbesondere für das M-Intermediat, welches höchstens unterhalb von 180 K als kleines Differenzsignal bei 380 nm zu erkennen ist.

4.3.2.4 Zeitverlauf bei 250 K

Durch das kontinuierliche Temperaturverlaufsexperiment konnte gezeigt werden, dass sich die Relaxationsprozesse des GPR gut im Temperaturbereich oberhalb von 240 K beobachten lassen. In diesem Bereich ist die Probe nicht mehr gefroren. Trotzdem kommt es durch die relativ niedrigen Temperaturen zu einer deutlichen Verlangsamung der Proteindynamik. Dadurch kann die Dynamik mittels wiederholter statischer Messungen beobachtet werden. Für dieses sogenannte Zeitverlaufsexperiment wurde zunächst ein Dunkelspektrum bei 250 K als Referenz aufgezeichnet. Anschließend wurde die Probe wieder aufgetaut und unter Belichtung (530 nm) erneut auf 250 K heruntergekühlt. Anschließend wurde die Belichtung beendet und minütlich ein Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Die Probe wurde dabei auf 250 K gehalten.

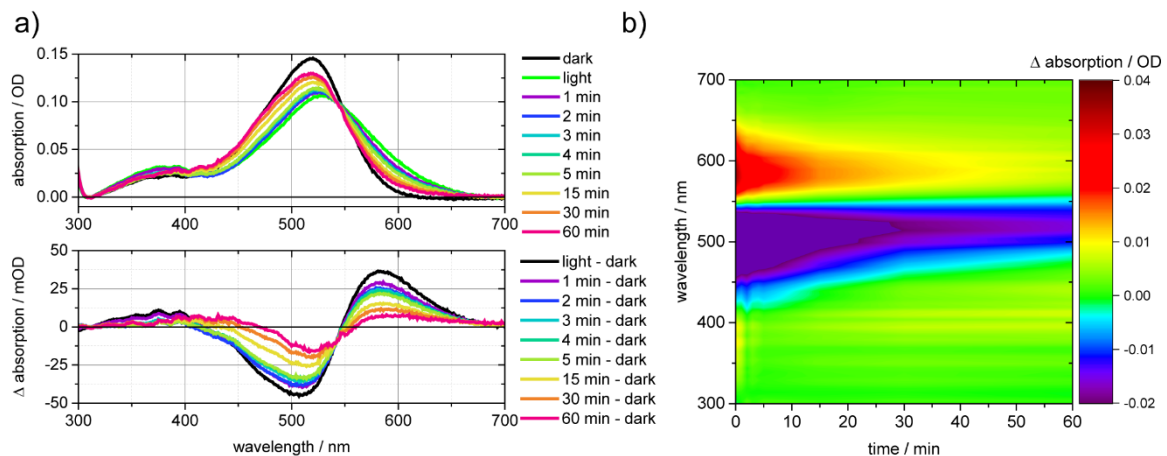


Abbildung 4.54. Zeitverlaufsexperiment bei 250 K von GPR (pH=8,5; Sandwichküvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur. a) Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten), b) Konturdiagrammdarstellung der Differenzspektren.

Die entsprechenden Absolut- und Differenzspektren sind in Abbildung 4.54a zu sehen. Zu Beginn des Zeitverlaufsexperiments sind drei Differenzabsorptionsbanden zu erkennen. So ist neben dem negativen Signal des GSB (500 nm) und dem positiven Signal des K-Intermediates (580 nm) ein weiteres, allerdings sehr schwaches, positives Signal (380 nm) zu beobachten. Dieses lässt sich dem M-Intermediat zuordnen und verschwindet innerhalb der ersten drei Minuten nach Beginn der Messung. Auch die Amplituden der anderen beiden Differenzbanden verringern sich im Laufe der Messung. Trotzdem sind nach 60 Minuten bei 250 K noch immer schwache Differenzsignale des GSB- und K-Intermediates festzustellen. Zusätzlich entsteht eine schwache breite positive Absorptionsänderungsbande mit einem Maximum bei ca. 420 nm. Dieser Vorgang ist auch gut in Abbildung 4.54b zu erkennen. Die 420 nm Bande kann eventuell dem spektral breiten O-Intermediat zugeordnet werden.¹⁹⁹⁻²⁰¹

Um die Beobachtung bzw. die Zuordnung der einzelnen Intermediate über die Zeit dieser Messung zu vereinfachen, wurde das Dunkelspektrum skaliert von den belichteten Messungen abgezogen (Faktor 0,65). Dadurch konnte die durch den GSB entstandene Differenz korrigiert werden, wodurch quasi die Absolutspektren der verschiedenen Intermediate in Abbildung 4.55a zu erkennen sind.

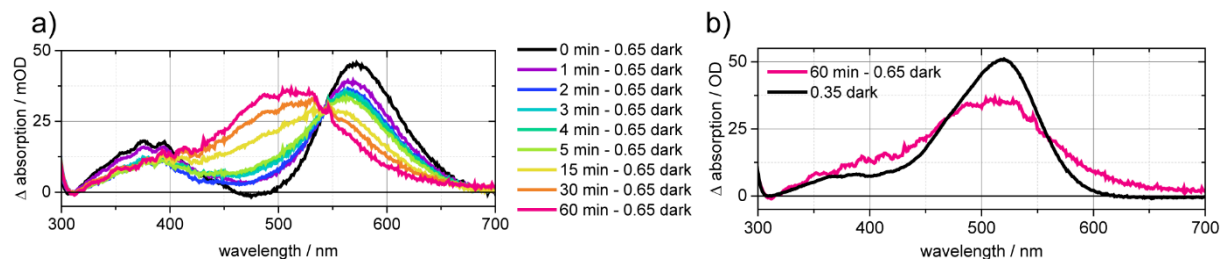


Abbildung 4.55. Zeitverlaufsexperiment bei 250 K von GPR (pH=8,5; Sandwichküvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur. a) GSB-korrigierte Differenzspektren. Der GSB wurde durch skalierte Subtraktion des Dunkelspektrums ausgeglichen. b) GSB-korrigiertes Differenzspektrum nach 60 Minuten Zeitverlauf bei 250 K im Vergleich zu einem skalierten Dunkelspektrum.

In Abbildung 4.55a sind zu Beginn der Messung zwei deutliche Absorptionsbanden zu erkennen. Wobei die schwächere, strukturierte Bande bei ca. 375 nm dem M-Intermediat zugeordnet werden kann. Die größere Bande bei ca. 580 nm kann dagegen hauptsächlich dem K-Intermediat zugeordnet werden. Eventuell gibt es hier allerdings auch Beiträge des spektral ähnlichen N-Intermediates. Nach drei Minuten ist deutlich das Verschwinden der strukturierten Bande des M-Intermediates zu erkennen. Die Bande des K-Intermediates bzw. des N-Intermediates nimmt innerhalb der ersten 15 Minuten der Messung ab und schiebt hypsochrom. Anschließend nimmt die Intensität der Bande wieder zu. Nach 60 Minuten befindet sich das Maximum der Bande bei ca. 510 nm. Das Differenzsignal entspricht jetzt weitestgehend dem Grundzustandsspektrum. Wie in Abbildung 4.55b zu erkennen, ist diese Bande im Vergleich zum Grundzustandsspektrum allerdings verbreitert. Deshalb kann dieses Signal auch als O-Intermediat bzw. als eine Mischung aus Grundzustand und O-Intermediat interpretiert werden. Das O-Intermediat sollte dem Grundzustandsspektrum sehr ähnlich sein.^{199,200} Außerdem ist damit zu rechnen, dass das O-Intermediat erst relativ spät akkumuliert wird, denn der Übergang des O-Intermediates in den Grundzustand gilt als längster bzw. als der am stärksten gehinderte Schritt im GPR-Photozyklus.²⁰¹

4.3.3 GPR_{E108Q}

Im Anschluss an die Untersuchung des GPR-Wildtyps wurde die E108Q-Mutante des GPRs untersucht. Auch hier wurde vor allem das Augenmerk daraufgelegt, welche Intermediate sich durch die verschiedenen Tieftemperaturexperimente präparieren bzw. akkumulieren lassen. Wie schon oben beschrieben wurde, sollte sich bei der E108Q-Mutante besonders das M-Intermediat anreichern lassen. Dieses ließ sich im Wildtyp nicht oder nur sehr schwach anreichern.

4.3.3.1 M-Intermediat

In Abbildung 4.56 sind das Dunkelspektrum sowie das Spektrum der mit 530 nm belichteten GPR_{E108Q}-Probe inklusive des entsprechenden Differenzspektrums dargestellt. Im Unterschied zum GPR-Wildtyp ist im Differenzspektrum keine Differenzbande zu erkennen, die sich dem K-Intermediat zuordnen lässt. Vielmehr ist deutlich eine strukturierte Bande im Bereich von 400 nm² zu beobachten, die sich dem M-Intermediat zuordnen lässt. Außerdem ist ein starkes negatives Signal bei rund 520 nm festzustellen, welches auf den GSB zurückzuführen ist.

Wie ebenfalls in Abbildung 4.56 zu erkennen ist, sind diese Intermediate bei 77 K sehr stabil. Selbst nach 60 Minuten Wartezeit ist es bei einem Zeitverlaufsexperiment bei 77 K nicht zu einer spektralen Änderung gekommen. Deshalb kann festgestellt werden, dass mittels der GPR_{E108Q}-Mutante das M-Intermediat deutlich und stabil präpariert werden kann. Außerdem kann durch einen Vergleich der Intensitäten der 520 nm-Absorptionsbande vor und nach der Anregung grob abgeschätzt werden, wie viel Prozent der Proteine in das M-Intermediat überführt wurden. Bei der hier gezeigten Messung kann von einer Anregungsmenge von rund 70% ausgegangen werden.

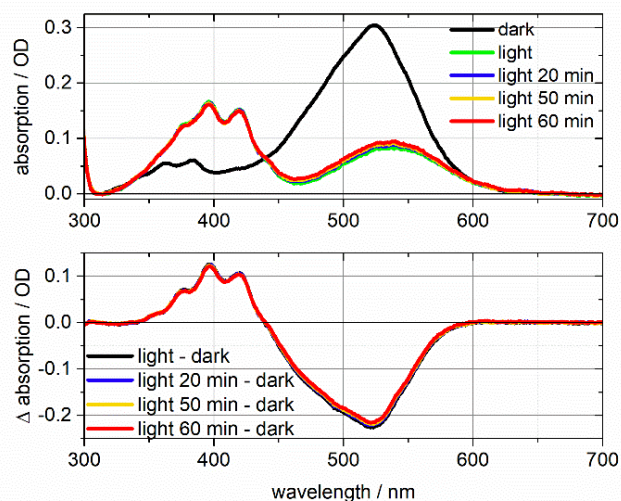


Abbildung 4.56. Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten) eines Zeitverlaufsexperiments bei 77 K von GPR_{E108Q} (pH=8,5; 1 mm Küvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur.

4.3.3.2 Sequenzieller Temperaturverlauf

Auch für die GPR_{E108Q}-Mutante wurde ein sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment durchgeführt. Wie in Abbildung 4.57 zu erkennen ist, ist auch das M-Intermediat im Temperaturbereich bis 160 K sehr stabil. Es ist nur eine leichte Abnahme des entsprechenden Differenzsignals zu beobachten. Gleichzeitig dazu ist auch eine Abnahme des GSB-Differenzsignals zu beobachten. Spektrale Signaturen anderer Intermediate sind allerdings nicht zu erkennen.

² Lokale Maxima bei 376 nm, 396 nm und 420 nm.

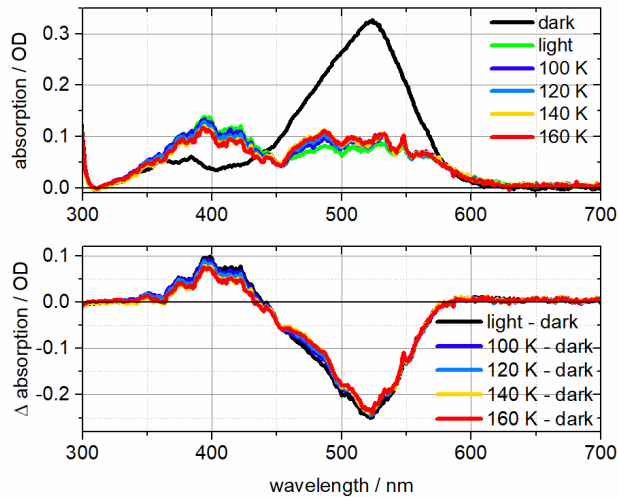


Abbildung 4.57. Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten) eines sequenziellen Temperaturverlaufsexperiments von $GPRE_{108Q}$ ($pH=8,5$; 1 mm Küvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur.

Wie schon beim GPR-Wildtyp kann das sequenzielle Temperaturverlaufsexperiment nur bis einschließlich 160 K durchgeführt werden, da oberhalb von 160 K ein Phasenübergang stattfindet. Dieser verhindert auch im Fall der $GPRE_{108Q}$ -Probe die Aufzeichnung von Absorptionsspektren.

4.3.3.3 Kontinuierlicher Temperaturverlauf

Im nächsten Schritt wurde ein kontinuierliches Temperaturverlaufsexperiment durchgeführt. Die entsprechenden Absolut- und Differenzspektren sind in Abbildung 4.58 zusammengefasst. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Banden des M-Intermediates und des GSB unterhalb von 170 K nur sehr geringe Änderungen aufweisen. Oberhalb des Phasenübergangs zwischen 170 K und 250 K nehmen die Amplitude der GSB-Bande sowie die Amplitude der M-Intermediatbande nahezu kontinuierlich ab. Außerdem weist die Bande bei 400 nm keine Feinstruktur mehr auf. Diese Beobachtung kann durch spektrale Verbreiterung bei höheren Temperaturen erklärt werden. Die Amplitude dieser Signalbande bei 400 nm nimmt mit steigender Temperatur ab, sodass bei 270 K kein Differenzsignal mehr feststellbar ist. Dagegen ist selbst bei 290 K noch eine GSB-Differenzbande sichtbar. Zusätzlich entsteht oberhalb von 270 K ein positives Differenzsignal bei rund 560 nm. Die entsprechende Differenzsignalsignatur, die selbst noch bei 290 K messbar ist, lässt sich über die schon für den GPR-Wildtyp beschriebene, temperaturabhängige spektrale Verschiebung des Grundzustandes erklären. Entsprechend kann auch für $GPRE_{108Q}$ davon ausgegangen werden, dass das Protein schon bei rund 270 K schnell in den Grundzustand relaxiert. Eine Akkumulation späterer Photointermediate war, abgesehen vom M-Intermediat, über den beobachtbaren Temperaturbereich nicht feststellbar.

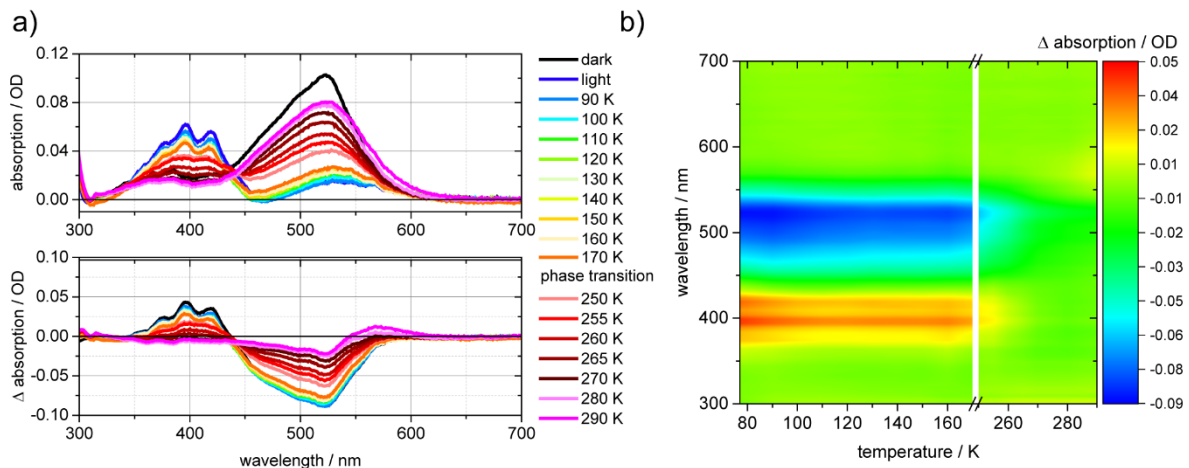


Abbildung 4.58. Kontinuierliches Temperaturverlaufsexperiment von $GPRE_{108Q}$ ($pH=8,5$; Sandwichküvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur. a) Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten), b) Konturdiagrammdarstellung der Differenzspektren.

4.3.3.4 Zeitverlauf bei 250 K

Auch für $GPRE_{108Q}$ wurde ein Zeitverlaufsexperiment bei 250 K durchgeführt. Allerdings musste hier aufgrund eines fehlerhaften Dunkelspektrums zur Differenzbildung das erste Spektrum der belichteten Probe herangezogen werden. Die entsprechenden Absolut- und Differenzspektren sind in Abbildung 4.59 zusammengefasst.

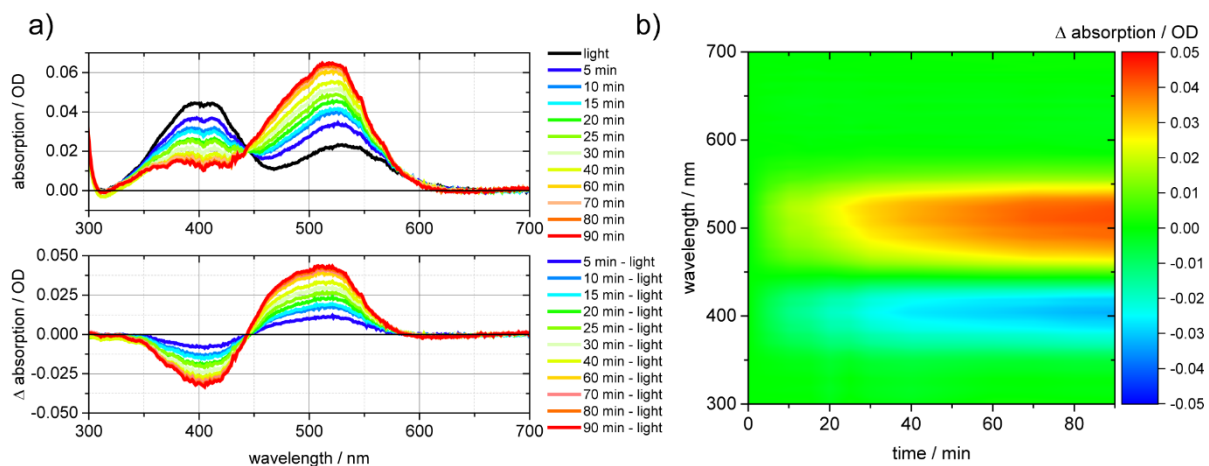


Abbildung 4.59. Zeitverlaufsexperiment bei 250 K von $GPRE_{108Q}$ ($pH=8,5$; 1 mm Küvette) nach Belichtung bei Raumtemperatur. a) Absolut- (oben) und Light-Differenzspektren (unten) b) Konturdiagrammdarstellung der Light-Differenzspektren.

Prinzipiell sind hier zwei Absorptionsbanden bzw. Differenzbanden zu beobachten. Die Bande um 400 nm kann dem M-Intermediat zugeordnet werden. Gleichzeitig kann die Bande um 520 nm dem Grundzustandsspektrum zugeordnet werden. Im Lauf des Experiments nimmt die Absorption des M-Intermediates ab, während das Signal des Grundzustands immer ausgeprägter wird. Nach rund 60 Minuten sind keine wesentlichen Änderungen mehr festzustellen. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass nach dieser Zeit die Probe vollständig in den Grundzustand relaxiert ist. Auch mittels dieses Experiments lassen sich keine späteren Intermediate, mit Ausnahme des M-Intermediates, feststellen.

4.3.3.5 Blue light quenching

Mittels der oben präsentierten Experimente konnte gezeigt werden, dass mithilfe der $GPRE_{108Q}$ -Mutante größere Mengen des M-Intermediates akkumuliert werden können. Dies konnte im Fall des GPR-Wildtyps nicht erreicht werden. Anhand des $GPRE_{108Q}$ -M-Intermediates kann deshalb der, im Theoriekapitel (Kapitel 2.3.1) näher beschriebene, *blue light-quenching*-Effekt (BLQ) untersucht werden. Dadurch sollte die entsprechende Studie von Eckert et al. unterstützt werden.¹²³ Dazu wurde zunächst das M-Intermediat, wie oben beschrieben, akkumuliert

bzw. präpariert. Anschließend wurde das M-Intermediat zusätzlich mit blauem Licht belichtet. Ausgehend davon konnten dann ein Zeitverlaufsexperiment bei 77 K sowie ein sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment durchgeführt werden. Die entsprechenden Absolut- und Differenzspektren dieser Experimente sind in Abbildung 4.60 dargestellt.

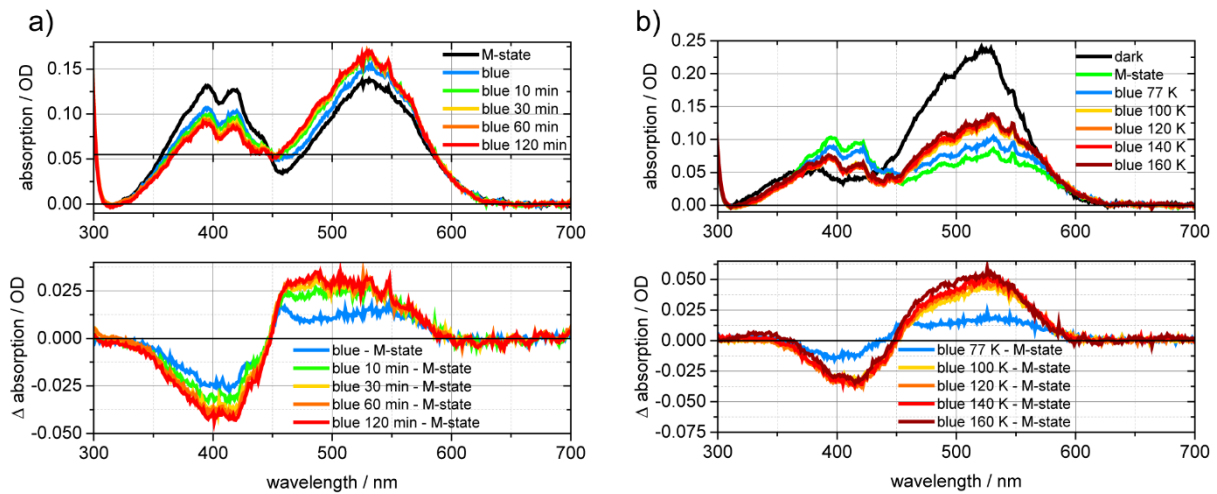


Abbildung 4.60. $GPRE_{108Q}$ ($pH=8,5$; 1 mm Küvette) nach BLQ. a) Zeitverlaufsexperiment bei 77 K. b) Sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment. Jeweils Absolut- (oben) und M-Intermediat-Differenzspektren (unten).

Betrachtet man zunächst das Zeitverlaufsexperiment (Abbildung 4.60a), so ist durch die blaue Belichtung direkt ein deutlicher Rückgang der Absorptionsbande des M-Intermediates bei rund 400 nm zu beobachten. Gleichzeitig nimmt die Intensität der Grundzustandsbande bei 520 nm zu. Dieser Trend setzt sich zunächst fort, wobei die größten Signaländerungen innerhalb der ersten 10 Minuten des Experiments auftreten. Anschließend sind nur noch kleinere Signaländerungen festzustellen, sodass nach rund 60 Minuten das Signalniveau konstant bleibt. Anhand der Absolutspektren lässt sich allerdings erkennen, dass sich immer noch ein signifikanter Teil der Probe im M-Intermediat befindet. Wie oben gezeigt, ist ein solcher Zeitverlauf ohne zusätzliche Belichtung mit blauem Licht nicht festzustellen (Abbildung 4.56). Entsprechend kann durch dieses Experiment deutlich der BLQ-Effekt gezeigt werden.

Ähnliche Befunde lassen sich über das sequenzielle Temperaturverlaufsexperiment (Abbildung 4.60b) machen. Auch hier sind durch die blaue Belichtung bei 77 K ein signifikanter Rückgang des M-Intermediates sowie eine Akkumulation des Grundzustandes zu erkennen. Die größte Signaländerung ist im Temperaturbereich zwischen 77 K und 100 K festzustellen. Oberhalb von 100 K sind nur noch sehr kleine Intensitätsänderungen feststellbar. Auch hier kehrt die Probe nicht komplett in den Grundzustand zurück. Wie anhand des Absolutspektrums bei 160 K zu erkennen ist, befindet sich noch ein signifikanter Teil der Probe im M-Intermediat.

Sowohl im Zeit- als auch im Temperaturverlaufsexperiment ist im ersten Differenzspektrum nach der blauen Belichtung eine relativ schmale Absorptionsbande bei 460 nm zu beobachten. Diese Bande ist bei der Relaxation aus dem M-Intermediat ohne Bestrahlung mit blauem Licht nicht zu erkennen. Deshalb kann diese Bande der von Eckert et al. beschriebenen Zwischenstufe (M' -Intermediat) innerhalb des BLQ-Mechanismus zugeordnet werden. Die Bande ist also ein Hinweis darauf, dass es sich beim BLQ um einen mindestens zweistufigen Prozess handelt. Darüber hinaus sind allerdings keine anderen spektralen Signaturen mittels der beiden Verlaufsexperimente zu erkennen. Deshalb gibt es keine Hinweise auf weitere Intermediate. Allerdings lassen sich weitere Intermediate durch diesen Befund auch nicht vollständig ausschließen, da es eventuell nicht zu einer signifikanten Akkumulation dieser Zwischenstufen kommen kann, weil diese gegebenenfalls schnell in den Grundzustand relaxieren.

Ausgehend von diesen Befunden können folgende Hypothesen bezüglich des BLQ-Mechanismus aufgestellt werden, die im Einklang zu den Befunden von Eckert et al.¹²³ sind: Durch blaue Belichtung des Proteins scheint es zu einer Isomerisierung des Retinals von 13-*cis* zu all-*trans* zu kommen. Die direkt nach der Belichtung zu beobachtende 460 nm-Differenzbande könnte diesem Prozess zugeordnet werden. Um vom M-Intermediat in den Grundzustand zurückkehren zu können, muss es nach der Isomerisierung des Retinals außerdem zur Reprotonierung der Schiff'schen-Base kommen. Wie anhand der Verlaufsexperimente zu sehen ist, scheint dies

schon bei 77 K möglich zu sein. Deshalb kann mit der Reprotonierung keine große strukturelle Änderung des Proteins verbunden sein. Der Protonendonator muss sich also in räumlicher Nähe der Schiff'schen-Base befinden. Dementsprechend bietet sich, aufgrund seiner räumlichen Nähe, der primäre Protonenakzeptor D97 als Protonendonator beim BLQ an.¹²³

4.3.4 ChR2

In diesem Unterkapitel soll ein weiteres kurzes Anwendungsbeispiel der Tieftemperaturabsorptionsspektroskopie gegeben werden. Hierbei soll vor allem gezeigt werden, wie die optischen Tieftemperaturdaten mit anderen spektroskopischen Methoden kombiniert werden können. Dadurch ist es möglich, letztlich ein spektroskopisches Gesamtbild des untersuchten Systems zu bekommen.

Wie im Theoriekapitel beschrieben, wird vermutet, dass es durch kontinuierliche Beleuchtung des ChR2 zu einer Verzweigung des Photozyklus kommt (Kapitel 2.3.2). Es wird außerdem vermutet, dass sich dadurch ein offenes P_x -Intermediat bildet.^{108,117} In enger Kooperation mit dem Arbeitskreis Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) sollten mittels Tieftemperaturabsorptionmessungen Hinweise für diese Hypothesen gefunden werden. Entsprechend wurde zunächst ein sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment mit ChR2 durchgeführt. Wie in Abbildung 4.61a und b zu erkennen ist, war bei dieser Messung nur ein schlechtes S/N-Verhältnis zu erreichen. Entsprechend mussten die Daten mit einem gleitenden Mittelwert (Fensterbreite 10 Punkte) geglättet werden. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 4.61c und d dargestellt. Es ist leicht zu erkennen, dass sich durch die Glättung die temperaturabhängigen spektralen Änderungen wesentlich besser verfolgen lassen. Gleichzeitig kann festgestellt werden, dass es durch die Glättung zu keiner offensichtlichen Veränderung der spektralen Eigenschaften kam. Deshalb kann dieser Korrekturschritt als legitim angesehen werden.

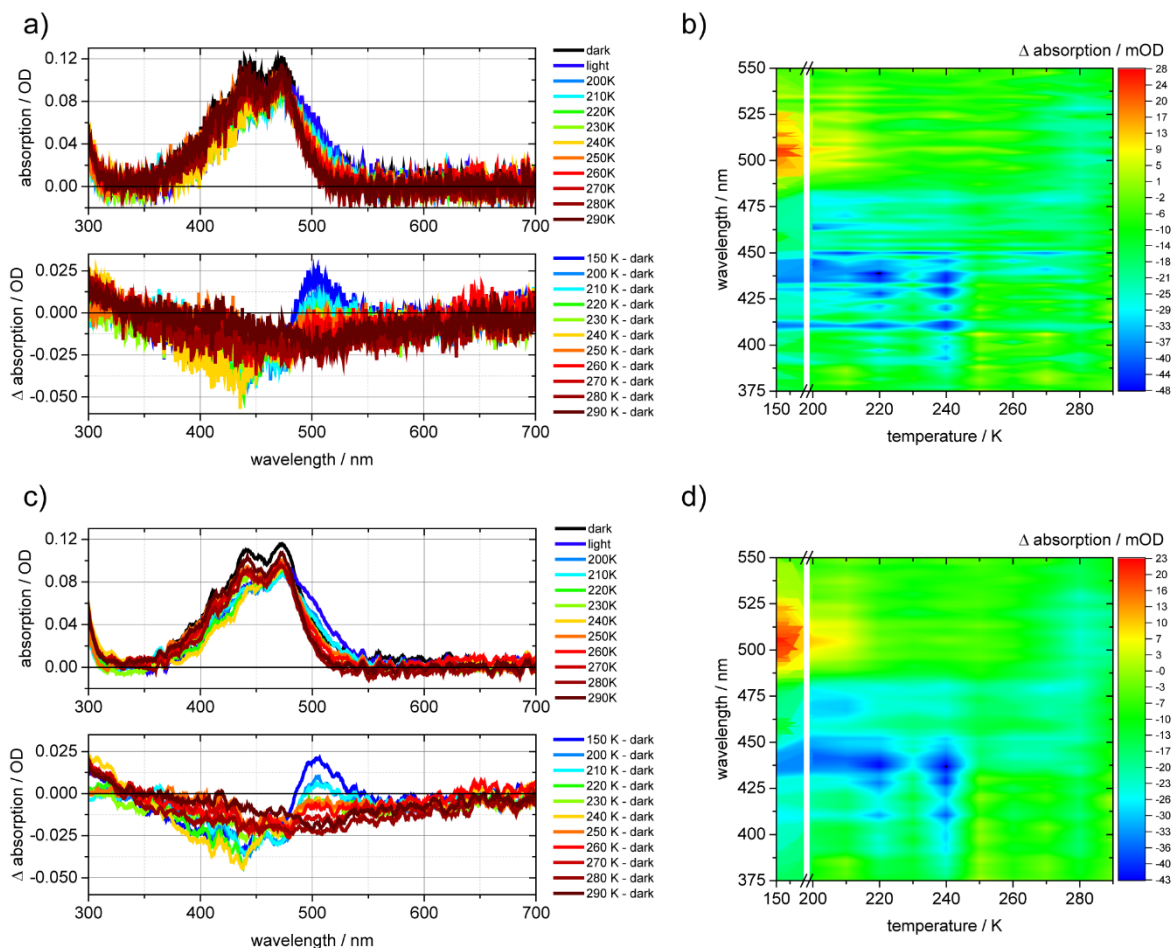


Abbildung 4.61. Sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment von ChR2 (pH=7,4; Sandwichkuvette) nach Belichtung bei 150 K. a) Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten), b) Konturdiagrammdarstellung der Differenzspektren, c) geglättete (Fensterbreite 10 Punkte) Absolut- (oben) und Differenzspektren (unten), d) Konturdiagrammdarstellung der geglätteten (Fensterbreite 10 Punkte) Differenzspektren.

In Abbildung 4.61 ist zu erkennen, dass der Dunkel- bzw. Grundzustand des ChR2 im Bereich zwischen rund 360 nm und 525 nm absorbiert. Das Absorptionsspektrum weist außerdem eine charakteristische Feinstruktur mit drei lokalen Maxima (ca. 410 nm, 440 nm und 472 nm) auf und unterscheidet sich dadurch deutlich von den oben gezeigten Spektren des GPR. Durch die Belichtung verschwindet diese Feinstruktur und das gesamte Spektrum wird leicht bathochrom verschoben. Mit steigender Temperatur bildet sich die Feinstruktur nach und nach wieder

aus und das belichtete Spektrum wird hypsochrom, also in Richtung des Grundzustandes, verschoben. Der Temperaturbereich zwischen 150 K und 200 K konnte aufgrund eines Phasenübergangs nicht beobachtet werden.

In den entsprechenden Differenzspektren äußert sich das in einer breiten negativen Bande zwischen 360 nm und 483 nm. Bei 483 nm ist eine Art isosbestischer Punkt festzustellen. Zwischen 483 nm und 560 nm erstreckt sich eine positive unstrukturierte Bande.

Mit steigender Temperatur nimmt die Intensität der positiven Bande ab. Ab einer Temperatur von rund 220 K ist kein positives Differenzsignal mehr feststellbar. Entsprechend der Form des Dunkelspektrums ist auch die negative Differenzbande strukturiert und zeigt Schultern bei 440 nm und 472 nm (Abbildung 4.61b, d). Auch die Amplitude dieses negativen Signals sinkt mit steigender Temperatur. Ab 270 K sind keine signifikanten Änderungen mehr feststellbar. Trotzdem ist weiterhin ein relativ breites kleines negatives Signal zu erkennen. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Artefakt aus der Korrektur des Strehintergrundes oder um die schon für GPR beschriebene temperaturabhängige spektrale Verschiebung.

Ausgehend von den spektralen Eigenschaften und den temperaturabhängigen Änderungen kann die negative Bande dem GSB (ChR2⁴⁷⁰) zugeordnet werden. Entsprechend muss es sich bei dem positiven Signal um das P₁⁵⁰⁰-Intermediat (*K-like*) handeln. Dagegen war es offenbar nicht möglich, das P₂³⁹⁰-Intermediat (*M-like*) zu akkumulieren. P₃⁵²⁰ und P₄⁴⁸⁰ sind ebenfalls nicht direkt zu sehen. Möglicherweise werden die entsprechenden Banden allerdings durch das breite negative Signal überlagert. P_x sollte bei dem verwendeten Belichtungsprotokoll ebenfalls nicht akkumuliert werden.

4.3.4.1 Vergleich verschiedener Belichtungsprotokolle

Parallel zu den hier diskutierten Tieftemperaturabsorptionsmessungen wurden im Arbeitskreis Glaubitz DNP-verstärkte Festkörper-NMR-Messungen an ChR2-Proben durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Belichtungsprotokolle zum Einsatz. Je nach Belichtungsprotokoll war es möglich, unterschiedliche Photointermediate zu akkumulieren (P₁⁵⁰⁰, P₄⁴⁸⁰ und P_x). Um dies zu prüfen und um bei der Zuordnung der Signale zu unterstützen, wurden zusätzlich Tieftemperaturabsorptionsmessungen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Die beiden Belichtungsprotokolle werden *thermal relaxation* und *thermal trapping* genannt (Abbildung 4.62a):

- Das *thermal relaxation* Experiment entspricht einem sequenziellen Temperaturverlaufsexperiment. Die Probe wird bei 77 K eingefroren und es wird ein Grundzustandsspektrum aufgezeichnet. Anschließend wird dann bei gleicher Temperatur die Probe belichtet, wodurch das P₁-Intermediat (*K-like*) akkumuliert werden sollte. Anschließend wird die Temperatur, ohne weitere Zwischenschritte, auf 245 K angehoben. Nach zehnmütigem Äquilibrieren bei 245 K wird die Probe wieder auf 77 K gekühlt, um anschließend ein Spektrum des belichteten Zustands aufzeichnen zu können.
- Im Fall des *thermal trapping* wird die Probe zunächst auf 77 K heruntergekühlt und es wird ein Spektrum des Grundzustandes aufgezeichnet. Im Anschluss wird die Temperatur der Probe auf 245 K angehoben. Bei dieser Temperatur erfolgt für zehn Minuten eine Belichtung der Probe. Im Anschluss wird die Probe wieder auf 77 K heruntergekühlt, um ein Spektrum des belichteten Zustandes aufzuzeichnen.

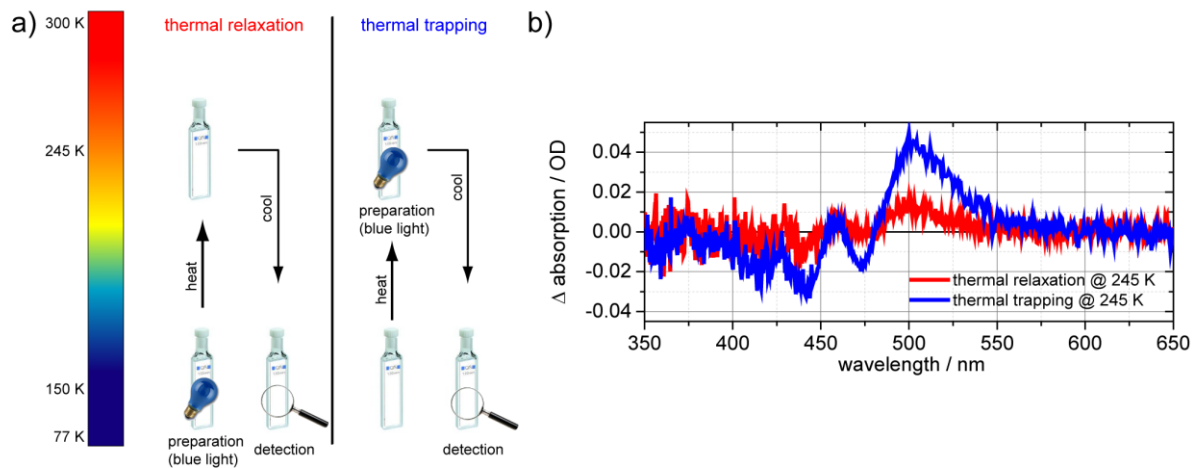


Abbildung 4.62. a) Schematische Darstellung der beiden Belichtungsprotokolle (*thermal relaxation*, *thermal trapping*). b) Differenzspektren (*light-dark*) von Chr2 (pH=7,4; Sandwichküvette) in Abhängigkeit vom Belichtungsprotokoll.

In Abbildung 4.62b ist ein direkter Vergleich der Spektren der bei 245 K belichteten Probe in Abhängigkeit vom verwendeten Belichtungsprotokoll gezeigt. Im Fall des *thermal-relaxation*-Experiments ist bei 245 K kaum mehr eine Differenz zum dunklen Grundzustand zu erkennen. Im Gegensatz dazu liefert das *thermal-trapping*-Experiment ein viel deutlicheres Differenzspektrum. Der Grundzustand ist dementsprechend deutlich depopuliert, während das P_1^{500} -Intermediat populiert ist. Allerdings sind keine anderen Photointermediate direkt nachweisbar. Trotzdem bestätigen die hier gezeigten Tieftemperaturabsorptionsmessungen, dass die verschiedenen Belichtungsprotokolle zu unterschiedlich starker Population der Intermediate führen. Dies bestätigt die Befunde der DNP-verstärkten Festkörper-NMR-Messungen.

4.3.5 Fazit und Ausblick

Hauptziel dieses Projekts war die Methodenoptimierung und der anschließende Praxistest der Tieftemperaturabsorptionsspektroskopie sowie des Cryotrappings von Retinalproteinen. Dazu wurde zunächst eine entsprechende Anlage aufgebaut und optimiert. Dabei zeigte sich, dass die kritischen Punkte des Cryotrappings die Probenpräparation, die Einfrieremethode sowie das Belichtungsprotokoll sind.

Bezüglich der Probenpräparation konnte zunächst festgestellt werden, dass sich solubilisierete Proben, aufgrund des geringeren Streuuntergrunds, eher für Cryotrappingexperimente eignen. Solubilisierete Proben können deshalb, auch bei tiefen Temperaturen, in Standardabsorptionsküvetten (1 mm Schichtdicke) untersucht werden. Voraussetzung ist lediglich ein Glycerinanteil von ca. 60% vol, um einen Glasübergang der Probe beim Abkühlen zu ermöglichen. Entsprechend ist die Präparation in diesem Fall vergleichsweise einfach.

Im Fall von rekonstituierten Proben haben sich dagegen Sandwichküvetten mit einer Schichtdicke von 50 μm oder weniger als vorteilhaft erwiesen. Da rekonstituierte Proben tendenziell eine stärkere Streuung des Messlichts aufweisen, müssen hier deutlich geringere Schichtdicken verwendet werden, um akzeptable S/N-Verhältnisse erhalten zu können. Aufgrund der geringen Schichtdicken ist es allerdings schwierig, höhere optische Dichten der Probenbanden zu erhalten. Deshalb ist es hier nötig, die Proben anzutrocknen, um höhere Konzentrationen zu erreichen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch Herunterkühlen der Probe im vorgekühlten Kryostaten die besten Glasübergänge erzeugen lassen. Bei den anderen hier getesteten Methoden bilden sich etwas mehr Risse in den Gläsern, was die Streueigenschaften der Probe verschlechtert.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei 77 K eine optische Anregung einiger Proben deutlich erschwert ist. Um größere Mengen Probe aus dem Grundzustand in angeregte Zustände bzw. in Intermediate des entsprechenden Photozyklus zu bringen, bietet es sich deshalb an, die Probe bei Raumtemperatur und beim Herunterkühlen kontinuierlich zu belichten.

Trotz allem weisen die entsprechenden Differenzspektren teilweise sehr schlechte S/N-Verhältnisse auf. Anhand mehrerer Beispiele konnte aber gezeigt werden, dass sich die Datenqualität durch eine gleitende Mittelwertbildung (Fensterbreite 10–15 Punkte) deutlich verbessern lässt, ohne dabei spektrale Informationen zu verlieren oder die Aussage der Daten zu verändern.

All diese Methodenoptimierungen wurden anhand von GPR vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich über simples Einfrieren und Belichten der Probe lediglich das K-Intermediat des Photozyklus akkumulieren lässt. Um spätere Intermediate ebenfalls akkumulieren zu können, wurden verschiedene Verlaufsexperimente getestet. So war es möglich, mittels eines Temperaturverlaufsexperiments bei 250 K das M-Intermediat sowie eventuell auch das N- und das O-Intermediat zu akkumulieren. Außerdem konnte eine temperaturabhängige, spektrale Verschiebung des Grundzustandsspektrums beobachtet werden.

Im Fall von GPR_{E108Q} konnte dagegen ausschließlich das M-Intermediat präpariert werden. Auch mittels verschiedener Verlaufsexperimente war es hier nicht möglich, andere Intermediate nachzuweisen. Allerdings konnte auch für GPR_{E108Q} eine temperaturabhängige, spektrale Verschiebung des Grundzustandsspektrums beobachtet werden. Ausgehend von dem akkumulierten M-Intermediat des GPR_{E108Q} war es allerdings möglich, den *blue light-quenching*-Effekt zu untersuchen. So konnte durch blaue Belichtung der gefrorenen Probe ein deutlicher Abbau des M-Intermediates beobachtet werden. Dabei konnte eine zusätzliche Differenzbande bei rund 460 nm beobachtet werden. Dies kann als Hinweis auf einen Zwischenschritt (M'-Intermediat) hin zum Grundzustand interpretiert werden, weshalb man einen mindestens zweischrittigen Quenchingmechanismus vermuten kann. Dies unterstützt die Befunde von Eckert et al.¹²³

Auch bei den Cryotrappingexperimenten mit ChR2 war es möglich, das K-ähnliche P₁⁵⁰⁰-Intermediat zu akkumulieren. Spätere Photointermediate konnten dagegen nicht nachgewiesen werden. Dafür konnte hier allerdings deutlich gezeigt werden, dass unterschiedliche Belichtungsprotokolle zu unterschiedlicher Population der Intermediate führen.

Zusammengefasst war es mit den hier gezeigten Experimenten möglich, die Tieftemperaturabsorptionsspektroskopie als Methode weiter zu etablieren. Dabei konnten Möglichkeiten und Grenzen der Methode erkundet und aufgezeigt werden.

5 Resümee und Ausblick

In diesem Kapitel sollen die zuvor präsentierten Ergebnisse der drei Teilprojekte dieser Arbeit nochmals kurz zusammengefasst werden. Insbesondere soll hier jeweils ein kurzer Ausblick für die entsprechenden Projekte gegeben und diskutiert werden.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit optischer Spektroskopie von RNA-Molekülen. Insbesondere wurde versucht, mittels verschiedener Ansätze bzw. mittels verschiedener spektroskopischer Methoden möglichst spezifische Informationen über Ligandenbindungs- sowie Duplexbildungsprozesse zu erhalten.

5.1 FTIR-Spektroskopie an RNA

Die erste in diesem Zusammenhang diskutierte Methode war die FTIR-Spektroskopie. Hierbei war es zunächst grundlegend nötig, technische Erfahrungen mit dem neu angeschafften FTIR-Spektrometer Bruker Vertex 80 zu bekommen. Darüber hinaus mussten die Probenpräparation, die Spektrometereinstellungen sowie die Auswertemethode für die Untersuchung von RNA-Proben optimiert werden. Dabei war es möglich, nach und nach eine kleine Spektrenbibliothek (Nukleosidmonophosphate und kurze Modellsequenzen) als internen Standard aufzubauen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass kleinere RNA-Oligonukleotide (< ca. 20 Nukleobasen) gut mittels FTIR-Methoden untersucht werden können. Hier waren relativ klare Signalzuordnungen möglich, sodass auch strukturelle Informationen (Basenpaarungen) erhalten werden konnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch im Fall von größeren Oligonukleotiden Bindungsstudien mittels FTIR-Methoden möglich sind.

Allgemein war es anhand der hier gezeigten Beispiele möglich, viel für zukünftige Projekte und Fragestellungen zu lernen. So sollten die zu untersuchenden RNA-Systeme nicht zu groß sein, um noch spezifische Signaländerungen beobachten zu können. Da die Differenzenbildung zwischen mehreren Probenpräparationen problematisch werden kann, bieten sich z.B. photoschaltbare oder photogeschützte Systeme an. Dies sollte die Differenzenbildung deutlich vereinfachen bzw. es ermöglichen, direkt Differenzsignale aufzuzeichnen. Außerdem würden solche Proben auch zeitaufgelöste FTIR-Untersuchungen zulassen.

Auch instrumentell könnten zeitaufgelöste Studien an RNA-Proben verwirklicht werden. Durch eine Kombination des FTIR-Spektrometers mit der schon vorhandenen Stopped-Flow-Anlage sollte es beispielsweise möglich sein, Ligandenbindungsdynamiken von Aptameren im ms-Bereich zu untersuchen. Bei größeren RNA-Systemen könnte man daraus zwar auch keine spezifischen Strukturinformationen beziehen, aber die Bindungsdynamiken sollten sich auch anhand von unspezifischen Signaländerungen beurteilen lassen. Natürlich sollte es so auch möglich sein, den Einfluss des pH-Werts oder der Salzkonzentrationen auf die Bindungsdynamik zu messen.

Ligandenbindungsprozesse, pH-Wert- und Salzkonzentrationsabhängigkeiten von RNA-Proben könnten außerdem mittels einer ATR-Zelle mit einem Dialyseaufsatz untersucht werden. Das Dialysesystem soll dabei den Austausch der Pufferbedingungen (Ligandkonzentration, Salzkonzentration, pH-Wert) ermöglichen, ohne die Probenkonzentration auf der ATR-Oberfläche zu verändern.

5.2 ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel

Die zweite hier vorgestellte und diskutierte Methode zur Untersuchung von RNA-Molekülen war die Fluoreszenzspektroskopie. Im Gegensatz zur FTIR-Spektroskopie war dazu allerdings eine Modifizierung der RNA durch ein Fluoreszenzlabel nötig. In der vorliegenden Arbeit wurde für diesen Zweck das RNA-Fluoreszenzlabel ζ_m^f verwendet. Da bislang noch keine wesentlichen Untersuchungen zu den optischen Eigenschaften dieses Labels vorlagen, wurde es zunächst ausführlich außerhalb und innerhalb von RNA-Strängen untersucht und charakterisiert.

Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass ζ_m^f sich als lokale Sonde eignet, da es empfindlich auf Änderungen der Mikroumgebung in Lösung reagiert. Unter anderem durch direkten Vergleich der optischen Eigenschaften von ζ_m^f mit den entsprechenden Eigenschaften des Spinlabels ζ_m war es möglich, den starken Fluoreszenzlöschungseffekt des ζ_m aufzuklären. So kann bei der aktuellen Datenlage davon ausgegangen werden, dass die Fluoreszenz des ζ_m durch eine sehr schnelle interne Konversion (IC) in einen dunklen Dublettzustand (D_1) gelöscht wird. Dieser Mechanismus kann alternativ auch als ein intramolekularer Dexter-Energietransfer interpretiert werden.

Allerdings war ein direkter spektroskopischer Nachweis des D_1 -Zustands mittels UV/vis-Methoden nicht möglich. Deshalb könnte eventuell eine infrarot-, Raman- oder auch EPR-spektroskopische Studie weitere Aufschlüsse über diesen Schlüsselzustand in der D_1 -Dynamik des ζ_m liefern.

Unabhängig vom direkten spektroskopischen Nachweis des D_1 -Zustands konnte viel über die Photophysik von ζ_m und ζ_m^f gelernt werden. Dies ist einerseits wichtig, um Veränderungen der photophysikalischen Eigenschaften durch Interaktionen mit RNA interpretieren zu können. Andererseits helfen die Erkenntnisse generell, die Eigenschaften der Stoffklasse der FNRO besser verstehen zu können. Dies ist wiederum hilfreich bei der Entwicklung und Verbesserung von entsprechenden Fluorophoren bzw. Nitroxidspinlabeln.

So kann beispielsweise vermutet werden, dass es bei einem größeren Abstand zwischen Fluorophor und Nitroxid nicht mehr zu einer effektiven Fluoreszenzlöschung kommen kann, da die Effektivität des Dexter-Energietransfers stark abstandsabhängig ist. Deshalb ist es durch eine leichte Vergrößerung bzw. Veränderung des Labels wahrscheinlich möglich, ein stark fluoreszierendes Spin-Label herzustellen. Ein solches echtes bifunktionales Label hätte offensichtlich deutliche Vorteile gegenüber ζ_m und ζ_m^f . Mit ein und derselben Probe wäre es dann möglich, EPR- und Fluoreszenzspektroskopie zu betreiben, ohne dass chemische Modifikationen an dem Label vorgenommen werden müssten. Gleichzeitig ist zu vermuten, dass dieses hypothetische bifunktionale Label nur unwesentlich größer sein muss als ζ_m^f und ζ_m . Entsprechend sollte die Rigidität der Label bei minimaler Störung der RNA-Stabilität erhalten bleiben.

Unabhängig davon konnte mittels der hier präsentierten Studie gezeigt werden, dass ζ_m zwar ein sehr schwacher Fluorophor ist, dass aber dennoch Änderungen des Fluoreszenzsignals aufgrund der hohen Sensibilität der Fluoreszenzmethoden nachgewiesen werden können. In diesem Zuge konnte auch gezeigt werden, dass auch das schwache ζ_m -Fluoreszenzsignal empfindlich auf Änderungen der Mikroumgebung des Labels reagiert. Entsprechend sollten auch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an ζ_m -markierten RNA-Strängen möglich sein, wobei allerdings mit einer deutlich schlechteren Datenqualität aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute gerechnet werden muss.

Darüber hinaus könnte es schwierig werden, die gleichen Proben für EPR- und Fluoreszenzspektroskopie zu verwenden. Grund dafür ist, dass insbesondere Proben für PELDOR-Experimente doppelt markiert sind. Dies ist aber im Fall von Fluoreszenzlabeln problematisch, da es hier zu einer Überlagerung von zwei Signalen kommen muss. Auch bezüglich der Positionen der RNA-Label ist für PELDOR eine andere Markierungsstrategie notwendig als für Fluoreszenzexperimente. Deshalb muss in jedem Fall ein intelligentes Probendesign angewendet werden, um Synergieeffekte für fluoreszierende Spinlabel nutzen zu können. So sind zum Beispiel einfach markierte Einzelstränge denkbar. Für Fluoreszenzexperimente würde man diese mit unmarkierten Gegensträngen hybridisieren. Für PELDOR-Messungen dagegen könnte man einen zweiten markierten Strang heranziehen.

Neben der oben beschriebenen ausführlichen Untersuchung der Photophysik der beiden RNA-Label in Lösung wurde auch der Einfluss von RNA auf die Photophysik von ζ_m^f untersucht. Dabei konnte durch Einbau des Labels in RNA-Modellsequenzen gezeigt werden, dass sich dessen Fluoreszenzsignal abhängig von den direkten Nachbarbasen sowie abhängig vom Hybridisierungszustand signifikant ändert. Gleichzeitig konnte keine deutliche Veränderung der Stabilität der Modellstränge festgestellt werden. So konnte also gezeigt werden, dass sich ζ_m^f sehr gut als lokale Sonde in RNA eignet. Im Speziellen wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass der Fluorophor für Ligandenbindungsstudien herangezogen werden kann.

Diese Hypothese konnte im nächsten Schritt bewiesen werden, in dem das neomycinbindende Aptamer an mehreren verschiedenen Stellen mit ζ_m^f markiert wurde. Auch wenn zur Struktur und zur Ligandenbindung des neomycinbindenden Aptamers bereits viel bekannt war, war es mittels statischer und zeitaufgelöster Fluoreszenzmethoden möglich, zusätzliche Informationen zu gewinnen. So konnte zunächst mittels Fluoreszenzanisotropiemessungen die Vorformung des Aptamers bestätigt werden. Außerdem war es mittels Stopped-Flow-Messungen möglich, die Bindungsdynamik des Aptamers zu beobachten. Anhand dieser transienten Daten konnte ein Zweischnittbindungsmodell abgeleitet werden. Dabei bindet Neomycin zunächst unspezifisch an das weitgehend vorgeformte Aptamer. Anschließend kommt es durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu einer spezifischen Bindung des Liganden am Aptamer.

Um in Zukunft die Ligandenbindung des N1-Aptamers mittels ζ_m^f weiter untersuchen zu können, bieten sich verschiedene Experimente an. So könnten temperaturabhängige statische und zeitaufgelöste Messungen eventuell weitere Rückschlüsse auf die Vorformung des Aptamers (*conformational selection*) ermöglichen. Eine temperaturabhängige Signaländerung würde für eine Temperaturabhängigkeit der Aptamerstruktur sprechen. Außerdem sind Studien der Bindungsdynamik in Abhängigkeit von der Spermidin- und Magnesiumkonzentration

denkbar. Hierdurch könnte es möglich sein, zusätzliche Informationen bezüglich der unspezifischen Ligandenbindung zu bekommen, da sowohl Spermidin als auch Magnesium mit Neomycin um entsprechende Bindestellen konkurrieren sollten.

Des Weiteren bieten sich natürlich FRET-Experimente an, mit denen sich eventuell Abstands- und Orientierungsinformationen im Fall von doppelt markierten Proben gewinnen lassen.^{202,203} Dies würde einen direkten Vergleich mit entsprechenden PELDOR-Daten zulassen. Um einen möglichst guten Vergleich zwischen PELDOR und FRET erreichen zu können, würde sich ein Homo-FRET-Experiment²⁰⁴ zwischen zwei ζ_m^f -Labeln anbieten. Der Energietransfer wäre in diesem Fall über eine Änderung der Polarisation der Emission feststellbar. Da allerdings der spektrale Überlapp zwischen dem ζ_m^f -Absorptions- und dem ζ_m^f -Emissionsspektrum nur sehr klein ist, kann nur mit einem geringen Effekt durch Homo-FRET gerechnet werden. Deshalb erscheint ein Hetero-FRET-Experiment mit ζ_m^f als Energiedonor zunächst erfolgversprechender.

Als sinnvoller, allerdings nicht fluoreszenter (dunkler) FRET-Akzeptor bietet sich dabei tC_{nitro} an (Abbildung 5.1a).^{29,202,205} Dieses RNA-Label ist ζ_m^f strukturell relativ ähnlich und kann als Cytosinanalogen ebenfalls in Nukleinsäuren eingebaut werden. Das Absorptionsspektrum von tC_{nitro} weist einen großen spektralen Überlapp zum Emissionsspektrum des ζ_m^f auf. Gleichzeitig ist aber auch der Überlapp der beiden Absorptionsspektren sehr ausgeprägt (Abbildung 5.1b). Dies sollte aber in diesem speziellen Fall kein Problem für FRET-Experimente darstellen, da tC_{nitro} nicht fluoreszent ist. Prinzipiell sind drei Szenarien denkbar: a) Wenn innerhalb eines Moleküles nur tC_{nitro} angeregt wird, sollte so gut wie keine Fluoreszenz messbar sein. b) Wenn tC_{nitro} und ζ_m^f innerhalb eines Moleküls angeregt werden, sollte die ζ_m^f -Emission zu sehen sein, da das angeregte tC_{nitro} als Akzeptor ausfällt. c) Wenn innerhalb eines Moleküls nur ζ_m^f angeregt wird, sollte es zu einem FRET zum tC_{nitro} im Grundzustand kommen. Dies wiederum sollte zu einer Verringerung der ζ_m^f -Emission führen. Der relative Einfluss von Fall c) sollte messbar sein, selbst wenn zeitgleich die Fälle a) und b) zutreffen. Voraussetzung für FRET allgemein ist allerdings, dass die beiden RNA-Label die richtige Orientierung und den richtigen Abstand zueinander aufweisen.

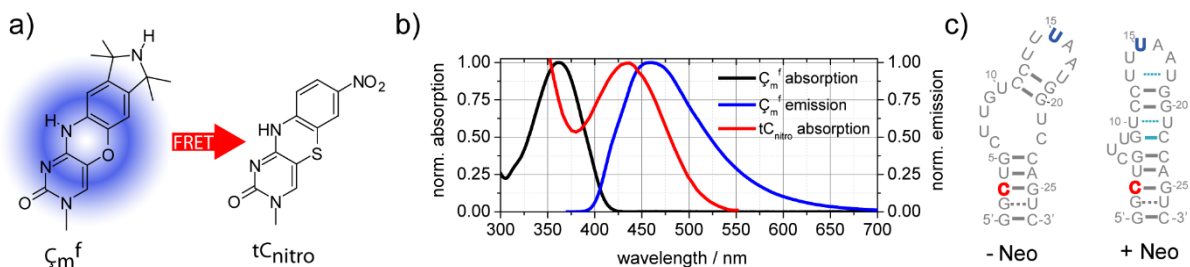


Abbildung 5.1. a) Strukturen der beiden möglichen FRET-Partner: ζ_m^f (Donor) und tC_{nitro} (Akzeptor). b) Absorptions- und Fluoreszenzspektren von ζ_m^f und tC_{nitro} . Das tC_{nitro} -Absorptionsspektrum wurde von Börjesson et al. übernommen.²⁹ c) Sekundärstruktur des N1-Aptamers ohne und mit Ligand. Farblich markiert sind mögliche Labelpositionen für FRET-Experimente: ζ_m^f (blau) und tC_{nitro} (rot).

tC_{nitro} wurde schon von Börjesson et al. Erfolgreich für FRET-Experimente eingesetzt.²⁰² Hierbei wurden der Fluorophor tC^o als FRET-Donor und tC_{nitro} als FRET-Akzeptor verwendet.³⁸ Börjesson et al. konnten anhand von verschiedenen mehrfach markierten DNA-Doppelsträngen deutlich die Abstands- und Orientierungsabhängigkeit der FRET-Effizienz zwischen den beiden Labeln aufzeigen.²⁰² Bevor FRET-Messungen am N1-Aptamer durchgeführt werden können, ist es sinnvoll, eine ähnliche Studie für das FRET-Paar ζ_m^f und tC_{nitro} in RNA-Doppelsträngen durchzuführen. Dadurch können im Optimalfall Vergleichswerte für die FRET-Effizienz bzw. deren Abstands- und Orientierungsabhängigkeit ermittelt werden, die dann die Interpretation der Ergebnisse im Fall des N1-Aptamers unterstützen können. Außerdem sind Vergleiche zu ähnlichen Fluoreszenz- und PELDOR-Studien möglich.^{50,52,202,203,206–210} Darüber hinaus bietet es sich an, für diese RNA-Doppelstränge wieder die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modellsequenzen zugrunde zu legen. Anhand dieser Stränge sollten sich sechs verschiedene ζ_m^f - tC_{nitro} -Abstände, zwischen 1 und 9 Nukleobasen, realisieren lassen.

Auch im Fall des N1-Aptamers ist es wahrscheinlich nötig, die FRET-Effizienz zwischen beiden RNA-Labeln an verschiedenen Positionen innerhalb des Aptamers zu überprüfen. Besonders interessant sollten dabei allerdings die Labelpositionen 3 und 15 sein, da für diese Positionen schon PELDOR-Messungen existieren (Abbildung 5.1c). Da tC_{nitro} selbst nicht fluoresziert, also ein dunkler FRET-Akzeptor ist, ist es wahrscheinlich außerdem nötig, jeweils eine entsprechende, nur ζ_m^f -markierte Probe zu untersuchen. Dadurch können beispielsweise Quenchingeffekte durch die RNA-Wechselwirkungen berücksichtigt werden. Durch Vergleich der

Quantenausbeuten der Proben mit und ohne FRET-Akzeptor sollten sich dann recht eindeutig die FRET-Effizienzen errechnen lassen.

Die hier vorliegende Arbeit kann also für FRET-Experimente im Speziellen sowie für weitere Folgeprojekte mit ζ_m^f im Allgemeinen wichtige Vergleichswerte liefern. Grund dafür ist, dass im Rahmen dieser Arbeit eine vollständige spektroskopische Charakterisierung des bis dato noch relativ unbekanntes RNA-Fluoreszenzlabels ζ_m^f durchgeführt wurde. Dabei wurde der Fluorophor sowohl in Lösung als auch in verschiedenen RNA-Systemen untersucht. Dadurch war es möglich, ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel weiter zu etablieren.

Im Laufe dieser Charakterisierung wurde es außerdem nötig, verschiedene spektroskopische Methoden neu in der Arbeitsgruppe Wachtveitl zu etablieren. So wurde ein Phosphoreszenzspektrometer im Eigenbau entwickelt und im Rahmen der Aufklärung des ζ_m -Fluoreszenzquenchingmechanismus getestet (vgl. Kapitel 3.3.4). Außerdem wurde die absolute Messung der Fluoreszenzquantenausbeute mittels einer Ulbrichtkugel ausgiebig getestet und optimiert. Hierbei wurden die Vor- und Nachteile sowie die Grenzen dieser Methode erkundet, wodurch ein internes Standardmessverfahren abgeleitet werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.3). Gleiches gilt für die statischen und zeitaufgelösten Messungen der Fluoreszenzanisotropie. Durch vergleichsweise geringe Modifikationen an bestehenden Aufbauten war es hier möglich, einen großen methodischen Zugewinn zu erreichen (vgl. Kapitel 3.2.4 und Kapitel 3.3.3). Außerdem war es nötig, die Stopped-Flow-Methode erneut zu etablieren, da durch die Faserkopplung der Stopped-Flow-Anlage mit einem Fluoreszenzspektrometer die Eigenschaften und die Bedienung des Experiments deutlich verändert wurden (vgl. Kapitel 3.3.5 und Kapitel 7.1.3.2). Entsprechend konnte die Bandbreite der verfügbaren spektroskopischen Methoden in der Arbeitsgruppe sowohl proben- als auch anlagenseitig vergrößert werden.

5.3 Cryotrapping von Proteinen

Das dritte in dieser Arbeit präsentierte Teilprojekt drehte sich nicht um die optische Spektroskopie von RNA, sondern um Tieftemperaturabsorptionsspektroskopie sowie Cryotrappingexperimente mit Retinalproteinen. Doch wie auch im Fall der ersten beiden Teilprojekte stand hier die Entwicklung und Optimierung der Methode im Vordergrund. Dazu wurde im ersten Schritt ein entsprechendes Spektrometer bzw. ein entsprechender Messplatz aufgebaut und anhand von GPR und ChR2 getestet. Dabei konnten nach und nach die kritischen Parameter der Methode identifiziert und optimiert werden. Im Speziellen sind hier die Probenpräparation, die Einfriermethode sowie das Belichtungsprotokoll zu nennen. Im Rahmen der Optimierung dieser methodischen Details zeigte sich allerdings, dass es schwierig ist, ein Standardmessverfahren für alle Proben und spektroskopischen Fragestellungen zu identifizieren. Vielmehr ist es nötig, diese Parameter jeweils an die Probe und die Fragestellung anzupassen. Entsprechend wurden hier die verschiedenen Vor- und Nachteile diskutiert und somit die Möglichkeiten und Grenzen der Methode aufgezeigt.

So konnte im Fall von GPR das K-Intermediat des Photozyklus akkumuliert werden. Durch Temperaturverlaufsexperimente bei 250 K konnten außerdem auch spätere Intermediate (N und O) beobachtet werden. Ein direktes Cryotrapping dieser Zustände war allerdings nicht möglich. Außerdem konnte das M-Intermediat des Photozyklus durch den Einsatz der GPR_{108Q} Mutante präpariert werden. Ausgehend vom M-Intermediat der GPR_{E108Q} Mutante wurde anschließend der BLQ-Effekt beobachtet. Blaue Belichtung der gefrorenen Probe führte zu einem deutlichen Abbau des M-Intermediates und dem Aufbau einer zusätzlichen Differenzbande bei rund 460 nm. Deshalb kann beim BLQ ein Zwischenschritt hin zum Grundzustand vermutet werden, was wiederum für einen mindestens zweischrittigen Quenchingmechanismus spricht.

Auch im Fall von ChR2 war es nur möglich, das K-ähnliche P₁⁵⁰⁰-Intermediat zu präparieren. Spätere Photointermediate konnten nicht beobachtet werden. Dafür konnte hier deutlich gezeigt werden, dass unterschiedliche Belichtungsprotokolle zu unterschiedlicher Population der Intermediate führen.

Zusammengefasst wurde im Rahmen dieses Teilprojekts die Tieftemperaturabsorptionsspektroskopie als Methode etabliert. Dabei wurden umfangreiche Tests durchgeführt und neue Messmethoden sowie Experimente entwickelt. Es war dadurch möglich, die Verfügbarkeit von Tieftemperaturabsorptionsspektren zu erhöhen. Gleichzeitig wurden neue experimentelle Möglichkeiten erkundet, sodass die Methode nun für kommende Messaufgaben und Projekte bereitsteht.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Norrish, R.; Porter, G. Chemical Reactions Produced by Very High Light Intensities. *Nature* **1949**, *164*, 658.
- (2) Thrush, B. A. The Genesis of Flash Photolysis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 453–454.
- (3) Maiman, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature* **1960**, *187*, 493–494.
- (4) Zewail, A. H. Femtochemistry. Past, Present, and Future. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 2219–2231.
- (5) Crick, F. On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, 138–166.
- (6) Gilbert, W. Origin of Life: The RNA World. *Nature* **1986**, *319*, 618.
- (7) Robertson, M. P.; Joyce, G. F. The Origins of the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*:a003608, 1–22.
- (8) Altman, S. Enzymatic Cleavage of RNA by RNA (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29*, 749–758.
- (9) Cech, T. R. Self-Splicing and Enzymatic Activity of an Intervening Sequence RNA from Tetrahymena (Nobel Lecture). *Biosci. Rep.* **1990**, *10*, 239–261.
- (10) Garst, A. D.; Edwards, A. L.; Batey, R. T. Riboswitches: Structures and Mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*:a003533, 1–13.
- (11) Serganov, A.; Nudler, E. A Decade of Riboswitches. *Cell* **2013**, *152*, 17–24.
- (12) Chen, X.; Li, N.; Ellington, A. D. Ribozyme Catalysis of Metabolism in the RNA World. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 633–655.
- (13) Breaker, R. R. Riboswitches: From Ancient Gene-Control Systems to Modern Drug Targets. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 771–773.
- (14) Breaker, R. R. Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*:a003566, 1–15.
- (15) Weigand, J. E.; Sanchez, M.; Gunnesch, E.-B. E.-B.; Zeiher, S.; Schroeder, R.; Suess, B. Screening for Engineered Neomycin Riboswitches That Control Translation Initiation. *RNA* **2008**, *14*, 89–97.
- (16) Mironov, A. S.; Gusarov, I.; Rafikov, R.; Lopez, L. E.; Shatalin, K.; Kreneva, R. A.; Perumov, D. A.; Nudler, E. Sensing Small Molecules by Nascent RNA: A Mechanism to Control Transcription in Bacteria. *Cell* **2002**, *111*, 747–756.
- (17) Nahvi, A.; Sudarsan, N.; Ebert, M. S.; Zou, X.; Brown, K. L.; Breaker, R. R. Genetic Control by a Metabolite Binding mRNA. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1043–1049.
- (18) Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R. Thiamine Derivatives Bind Messenger RNAs Directly to Regulate Bacterial Gene Expression. *Nature* **2002**, *419*, 952–956.
- (19) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- (20) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- (21) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. Selection in Vitro of an RNA Enzyme That Specifically Cleaves Single-Stranded DNA. *Nature* **1990**, *344*, 467–468.
- (22) Grünwald, C.; Kwon, T.; Piton, N.; Förster, U.; Wachtveitl, J.; Engels, J. W. RNA as Scaffold for Pyrene Excited Complexes. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 19–26.
- (23) Sowa, G. Z.; Qin, P. Z. Site-Directed Spin Labeling Studies on Nucleic Acid Structure and Dynamics. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **2008**, *82*, 147–197.
- (24) Jeschke, G.; Polyhach, Y. Distance Measurements on Spin-Labelled Biomacromolecules by Pulsed

- Electron Paramagnetic Resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1895–1910.
- (25) Förster, U.; Gildenhoff, N.; Grünewald, C.; Engels, J. W.; Wachtveitl, J. Photophysics of 1-Ethynylpyrene-Modified RNA Base Adenine. *J. Lumin.* **2009**, *129*, 1454–1458.
- (26) Förster, U.; Grünewald, C.; Engels, J. W.; Wachtveitl, J. Ultrafast Dynamics of 1-Ethynylpyrene-Modified RNA: A Photophysical Probe of Intercalation. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 11638–11645.
- (27) Förster, U.; Lommel, K.; Sauter, D.; Grünewald, C.; Engels, J. W.; Wachtveitl, J. 2-(1-Ethynylpyrene)-Adenosine as a Folding Probe for RNA—pyrene in or Out. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 664–672.
- (28) Preus, S.; Kilsa, K.; Wilhelmsson, L. M.; Albinsson, B. Photophysical and Structural Properties of the Fluorescent Nucleobase Analogues of the Tricyclic Cytosine (TC) Family. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 8881–8892.
- (29) Preus, S.; Börjesson, K.; Kilså, K.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. Characterization of Nucleobase Analogue FRET Acceptor TC Nitro. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1050–1056.
- (30) Wilhelmsson, L. M. Fluorescent Nucleic Acid Base Analogues. *Q. Rev. Biophys.* **2010**, *43*, 159–183.
- (31) Juskowiak, B. Nucleic Acid-Based Fluorescent Probes and Their Analytical Potential. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 3157–3176.
- (32) Trojanowski, P.; Plötner, J.; Grünewald, C.; Graupner, F. F.; Slavov, C.; Reuss, A. J.; Braun, M.; Engels, J. W.; Wachtveitl, J. Photo-Physical Properties of 2-(1-Ethynylpyrene)-Adenosine: Influence of Hydrogen Bonding on Excited State Properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 13875–13888.
- (33) Shelke, S. A.; Sandholt, G. B.; Sigurdsson, S. T. Nitroxide-Labeled Pyrimidines for Non-Covalent Spin-Labeling of Abasic Sites in DNA and RNA Duplexes. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7366–7374.
- (34) Fielding, A. J.; Concilio, M. G.; Heaven, G.; Hollas, M. A. New Developments in Spin Labels for Pulsed Dipolar EPR. *Molecules* **2014**, *19*, 16998–17025.
- (35) Shelke, S. A.; Sigurdsson, S. T. Site-Directed Spin Labeling for EPR Studies of Nucleic Acids. In *Modified Nucleic Acids*; Nakatani, K., Tor, Y., Eds.; 2016; pp 159–187.
- (36) Reuss, A. J.; Grünewald, C.; Braun, M.; Engels, J. W. The Three Possible 2-(Pyrenylethynyl) Adenosines : Rotameric Energy Barriers Govern the Photodynamics of These Structural Isomers. *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 1369–1376.
- (37) Reuss, A. J.; Grünewald, C.; Gustmann, H.; Engels, J. W.; Wachtveitl, J. Three-State Fluorescence of a 2-functionalized Pyrene-Based RNA Label. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 3032–3041.
- (38) Füchtbauer, A. F.; Preus, S.; Börjesson, K.; McPhee, S. A.; Lilley, D. M. J.; Wilhelmsson, L. M. Fluorescent RNA Cytosine Analogue – an Internal Probe for Detailed Structure and Dynamics Investigations. *Sci. Rep.* **2017**, *7*:2393, 1–8.
- (39) Rist, M. J.; Marino, J. P. Fluorescent Nucleotide Base Analogs as Probes of Nucleic Acid Structure, Dynamics and Interactions. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 775–793.
- (40) Matarazzo, A.; Hudson, R. H. E. Fluorescent Adenosine Analogs: A Comprehensive Survey. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1627–1657.
- (41) Rovira, A. R.; Fin, A.; Tor, Y. Chemical Mutagenesis of an Emissive RNA Alphabet. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14602–14605.
- (42) Rovira, A. R.; Fin, A.; Tor, Y. Expanding a Fluorescent RNA Alphabet: Synthesis, Photophysics and Utility of Isothiazole-Derived Purine Nucleoside Surrogates. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2983–2993.
- (43) Sandin, P.; Wilhelmsson, L. M.; Lincoln, P.; Powers, V. E. C.; Brown, T.; Albinsson, B. Fluorescent Properties of DNA Base Analogue TC upon Incorporation into DNA - Negligible Influence of Neighbouring Bases on Fluorescence Quantum Yield. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5019–5025.
- (44) Shin, D.; Sinkeldam, R. W.; Tor, Y. Emissive RNA Alphabet. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14912–14915.
- (45) Wojciechowski, F.; Hudson, R. H. E. Fluorescence and Hybridization Properties of Peptide Nucleic Acid Containing a Substituted Phenylpyrrolocytosine Designed to Engage Guanine with an Additional H-Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12574–12575.

-
- (46) Wilhelmsson, L. M.; Tor, Y. Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design and Applications. *Chem Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- (47) Trojanowski, P.; Plötner, J.; Grünwald, C.; Graupner, F. F.; Slavov, C.; Reuss, A. J.; Braun, M.; Engels, J. W.; Wachtveitl, J. Photo-Physical Properties of 2-(1-Ethynylpyrene)-Adenosine: Influence of Hydrogen Bonding on Excited State Properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 13875–13888.
- (48) Barhate, N.; Cekan, P.; Massey, A. P. P.; Sigurdsson, S. T. T. A Nucleoside That Contains a Rigid Nitroxide Spin Label: A Fluorophore in Disguise. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 2655–2658.
- (49) Cekan, P.; Smith, A. L.; Barhate, N.; Robinson, B. H.; Sigurdsson, S. T. Rigid Spin-Labeled Nucleoside Ç : A Nonperturbing EPR Probe of Nucleic Acid Conformation. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5946–5954.
- (50) Schiemann, O.; Cekan, P.; Margraf, D.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Relative Orientation of Rigid Nitroxides by PELDOR: Beyond Distance Measurements in Nucleic Acids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 3292–3295.
- (51) Edwards, T. E.; Cekan, P.; Reginsson, G. W.; Shelke, S. a; Ferré-D’Amaré, A. R.; Schiemann, O.; Sigurdsson, S. T. Crystal Structure of a DNA Containing the Planar, Phenoxazine-Derived Bi-Functional Spectroscopic Probe Ç. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 4419–4426.
- (52) Marko, A.; Denysenkov, V.; Margraf, D.; Cekan, P.; Schiemann, O.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F. Conformational Flexibility of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13375–13379.
- (53) Prisner, T. F.; Marko, A.; Sigurdsson, S. T. Conformational Dynamics of Nucleic Acid Molecules Studied by PELDOR Spectroscopy with Rigid Spin Labels. *J. Magn. Reson.* **2015**, *252*, 187–198.
- (54) Grytz, C. M.; Marko, A.; Cekan, P.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F. Flexibility and Conformation of the Cocaine Aptamer Studied by PELDOR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 2993–3002.
- (55) Kamble, N. R.; Gränz, M.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Noncovalent and Site-Directed Spin Labeling of Duplex RNA. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 14442–14445.
- (56) Likhtenshtein, G. I.; Yamauchi, J.; Nakatsuji, S.; Smirnov, A. I.; Tamura, R. *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008.
- (57) Likhtenstein, G. I.; Ishii, K.; Nakatsuji, S. Dual Chromophore-Nitroxides: Novel Molecular Probes Photochemical and Photophysical Models and Magnetic Materials. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 871–881.
- (58) Stryer, L.; Griffith, O. H. A Spin-Labeled Hapten. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1785–1791.
- (59) Green, J. A.; Singer, L. A.; Parks, J. H. Fluorescence Quenching by the Stable Free Radical Di-*t*-Butylnitroxide. *J. Chem. Phys.* **1973**, *58*, 2690–2695.
- (60) Kuzmin, V. A.; Tatikolov, A. S. Formation of Triplets of Aromatic Hydrocarbons on Quenching of Excited Singlet States by Nitroxyl Radicals. *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *51*, 45–47.
- (61) Blough, N. V.; Simpson, D. J. Chemically Mediated Fluorescence Yield Switching in Nitroxide-Fluorophore Adducts: Optical Sensors of Radical/Redox Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1915–1917.
- (62) Green, S. A.; Simpson, D. J.; Zhou, G.; Ho, P. S.; Blough, N. V. Intramolecular Quenching of Excited Singlet States by Stable Nitroxyl Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7337–7346.
- (63) Matko, J.; Ohki, K.; Edidin, M. Luminescence Quenching by Nitroxide Spin Labels in Aqueous Solution: Studies on the Mechanism of Quenching. *Biochemistry* **1992**, *31*, 703–711.
- (64) Suzuki, T.; Obi, K. Evidence for Enhanced Intersystem Crossing on Pyrene Fluorescence Quenching with Stable Free Radicals. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 130–134.
- (65) Herbelin, S. E.; Blough, N. V. Intramolecular Quenching of Excited Singlet States in a Series of Fluorescamine- Derivatized Nitroxides. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8170–8176.
- (66) Fayed, T. A.; Grampp, G.; Landgraf, S. Fluorescence Quenching of Aromatic Hydrocarbons by Nitroxide Radicals: A Mechanistic Study. *Int. J. Photoenergy* **1999**, *1*, 173–176.

- (67) Ishii, K.; Hirose, Y.; Fujitsuka, H.; Ito, O.; Kobayashi, N. Time-Resolved EPR, Fluorescence, and Transient Absorption Studies on Phthalocyaninatosilicon Covalently Linked to One or Two TEMPO Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 702–708.
- (68) Likhtenshtein, G. I. Factors Affecting Light Energy Conversion in Dual Fluorophore-Nitroxide Molecules in Solution and a Protein. *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 2125–2139.
- (69) Giacobbe, E. M.; Qixi, M.; Colvin, M. T.; Cohen, B.; Ramanan, C.; Yeganeh, S.; Marks, T. J.; Ratner, M. A.; Wasielewski, M. R. Ultrafast Intersystem Crossing and Spin Dynamics of Photoexcited Perylene-3,4:9,10-Bis(Dicarboximide) Covalently Linked to a Nitroxide Radical at Fixed Distances. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3700–3712.
- (70) Colvin, M. T.; Giacobbe, E. M.; Cohen, B.; Miura, T.; Scott, A. M.; Wasielewski, M. R. Competitive Electron Transfer and Enhanced Intersystem Crossing in Photoexcited Covalent TEMPO-Perylene-3,4:9,10-Bis(Dicarboximide) Dyads: Unusual Spin Polarization Resulting from the Radical-Triplet Interaction. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 1741–1748.
- (71) Tansakul, C.; Lilie, E.; Walter, E. D.; Rivera, F.; Wolcott, A.; Zhang, J. Z.; Millhauser, G. L.; Braslau, R. Distance-Dependent Fluorescence Quenching and Binding of CdSe Quantum Dots by Functionalized Nitroxide Radicals. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7793–7805.
- (72) Colvin, M. T.; Smeigh, A. L.; Giacobbe, E. M.; Conron, S. M. M.; Ricks, A. B.; Wasielewski, M. R. Ultrafast Intersystem Crossing and Spin Dynamics of Zinc Meso-Tetraphenylporphyrin Covalently Bound to Stable Radicals. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 7538–7549.
- (73) Aliaga, C.; Fuentealba, P.; Rezende, M. C.; Cárdenas, C. Mechanism of Fluorophore Quenching in a Pre-Fluorescent Nitroxide Probe: A Theoretical Illustration. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *593*, 89–92.
- (74) Żamojć, K.; Wicz, W.; Zaborowski, B.; Jacewicz, D.; Chmurzyński, L. Analysis of Fluorescence Quenching of Coumarin Derivatives by 4-Hydroxy-TEMPO in Aqueous Solution. *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 713–718.
- (75) Chattopadhyay, S. K.; Das, P. K.; Hug, G. L. Photoprocesses in Diphenylpolyenes. 2. Excited-State Interactions with Stable Free Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6205–6210.
- (76) Scaiano, J. C.; Laferrière, M.; Galian, R. E.; Maurel, V.; Billone, P. Non-Linear Effects in the Quenching of Fluorescent Semiconductor Nanoparticles by Paramagnetic Species. *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* **2006**, *203*, 1337–1343.
- (77) Kuzmin, V. A.; Tatikolov, A. S.; Borisevich, Y. E. Charge Transfer Complexing in the Course of Triplet State Quenching of Carbocyanine Dyes by Nitroxyl Radical. *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *53*, 52–55.
- (78) Vogel, V. R.; Rubtsova, E. T.; Likhtenshtein, G. I.; Hideg, K. Factors Affecting Photoinduced Electron Transfer in a Donor-Acceptor Pair (DA) Incorporated into Bovine Serum Albumin. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1994**, *83*, 229–236.
- (79) Green, S.; Fox, M. A. Intramolecular Photoinduced Electron Transfer from Nitroxyl Radicals. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14752–14757.
- (80) Cekan, P.; Jonsson, E. O.; Sigurdsson, S. T. Folding of the Cocaine Aptamer Studied by EPR and Fluorescence Spectroscopies Using the Bifunctional Spectroscopic Probe Ç. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3990–3995.
- (81) Cekan, P.; Sigurdsson, S. T. Conformation and Dynamics of Nucleotides in Bulges and Symmetric Internal Loops in Duplex DNA Studied by EPR and Fluorescence Spectroscopies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *420*, 656–661.
- (82) Cekan, P.; Sigurdsson, S. T. Single Base Interrogation by a Fluorescent Nucleotide: Each of the Four DNA Bases Identified by Fluorescence Spectroscopy. *Chem. Commun.* **2008**, *0*, 3393–3395.
- (83) Gardarsson, H.; Sigurdsson, S. T. Large Flanking Sequence Effects in Single Nucleotide Mismatch Detection Using Fluorescent Nucleoside Çf. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6121–6126.
- (84) Gardarsson, H.; Kale, A. S.; Sigurdsson, S. T. Structure-Function Relationships of Phenoxazine Nucleosides for Identification of Mismatches in Duplex DNA by Fluorescence Spectroscopy. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 567–575.

-
- (85) Höbartner, C.; Sicoli, G.; Wachowius, F.; Gophane, D. B.; Sigurdsson, S. T. Synthesis and Characterization of RNA Containing a Rigid and Nonperturbing Cytidine-Derived Spin Label. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7749–7754.
- (86) Tkach, I.; Pornsuwan, S.; Höbartner, C.; Wachowius, F.; Sigurdsson, S. T.; Baranova, T. Y.; Diederichsen, U.; Sicoli, G.; Bennati, M. Orientation Selection in Distance Measurements between Nitroxide Spin Labels at 94 GHz EPR with Variable Dual Frequency Irradiation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 3433–3437.
- (87) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Stryer Biochemie*, 7th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2014.
- (88) Clark, D. P.; Pazdernik, N. J. *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen Und Anwendungen*, 1st ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2009.
- (89) Weigand, J. E.; Suess, B. Aptamers and Riboswitches: Perspectives in Biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85*, 229–236.
- (90) Batey, R. T. Riboswitches: Still a Lot of Undiscovered Country. *RNA* **2015**, *21*, 560–563.
- (91) Berens, C.; Groher, F.; Suess, B. RNA Aptamers as Genetic Control Devices: The Potential of Riboswitches as Synthetic Elements for Regulating Gene Expression. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 246–257.
- (92) Watson, J.; Baker, T.; Bell, S.; Gann, A.; Levine, M.; Losick, R.; Harrison, S. *Molecular Biology of the Gene*, 7th ed.; Pearson Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2013.
- (93) Weigand, J. E.; Suess, B. Synthetische Riboswitche. *BIOspectrum* **2009**, *1*, 42–44.
- (94) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX—A (r)Evolutionary Method to Generate High-Affinity Nucleic Acid Ligands. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403.
- (95) Duchardt-Ferner, E.; Gottstein-Schmidtke, S. R.; Weigand, J. E.; Ohlenschläger, O.; Wurm, J.-P.; Hammann, C.; Suess, B.; Wöhnert, J. What a Difference an OH Makes : Conformational Dynamics as the Basis for the Ligand Specificity of the Neomycin-Sensing Riboswitch. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1527–1530.
- (96) Duchardt-Ferner, E.; Weigand, J. E.; Ohlenschläger, O.; Schmidtke, S. R.; Suess, B.; Wöhnert, J. Highly Modular Structure and Ligand Binding by Conformational Capture in a Minimalistic Riboswitch. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6216–6219.
- (97) Wallis, M. G.; von Ahsen, U.; Schroeder, R.; Famulok, M. A Novel RNA Motif for Neomycin Recognition. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 543–552.
- (98) Schmidtke, S. R.; Duchardt-Ferner, E.; Weigand, J. E.; Suess, B.; Wöhnert, J. NMR Resonance Assignments of an Engineered Neomycin-Sensing Riboswitch RNA Bound to Ribostamycin and Tobramycin. *Biomol. NMR Assign.* **2010**, *4*, 115–118.
- (99) Weigand, J. E.; Schmidtke, S. R.; Will, T. J.; Duchardt-Ferner, E.; Hammann, C.; Wöhnert, J.; Suess, B.; Wöhnert, J.; Suess, B. Mechanistic Insights into an Engineered Riboswitch: A Switching Element Which Confers Riboswitch Activity. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3363–3372.
- (100) Krstić, I.; Frolow, O.; Sezer, D.; Endeward, B.; Weigand, J. E.; Suess, B.; Engels, J. W.; Prisner, T. F. PELDOR Spectroscopy Reveals Preorganization of the Neomycin-Responsive Riboswitch Tertiary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1454–1455.
- (101) Mandal, M.; Boese, B.; Barrick, J. E.; Winkler, W. C.; Breaker, R. R. Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus Subtilis* and Other Bacteria. *Cell* **2003**, *113*, 577–586.
- (102) Batey, R. T.; Gilbert, S. D.; Montange, R. K. Structure of a Natural Guanine- Responsive Riboswitch Complexed with the Metabolite Hypoxanthine. *Nature* **2004**, *432*, 411–415.
- (103) Kim, J. N.; Breaker, R. R. Purine Sensing by Riboswitches. *Biol. Cell* **2008**, *100*, 1–11.
- (104) Mandal, M.; Breaker, R. R. Adenine Riboswitches and Gene Activation by Disruption of a Transcription Terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 29–35.
- (105) Serganov, A.; Yuan, Y. R.; Pikovskaya, O.; Polonskaia, A.; Malinina, L.; Phan, A. T.; Höbartner, C.; Micura, R.; Breaker, R. R.; Patel, D. J. Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing MRNAs. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1729–1741.

- (106) Warhaut, S.; Mertinkus, K. R.; Höllthaler, P.; Fürtig, B.; Heilemann, M.; Hengesbach, M.; Schwalbe, H. Ligand-Modulated Folding of the Full-Length Adenine Riboswitch Probed by NMR and Single-Molecule FRET Spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 5512–5522.
- (107) Pushkarev, A.; Inoue, K.; Larom, S.; Flores-Uribe, J.; Singh, M.; Konno, M.; Tomida, S.; Ito, S.; Nakamura, R.; Tsunoda, S. P.; et al. A Distinct Abundant Group of Microbial Rhodopsins Discovered Using Functional Metagenomics. *Nature* **2018**, *558*, 595–599.
- (108) Ernst, O. P.; Lodowski, D. T.; Elstner, M.; Hegemann, P.; Brown, L. S.; Kandori, H. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 126–163.
- (109) Dugué, G. P.; Akemann, W.; Knöpfel, T. A Comprehensive Concept of Optogenetics. In *Progress in Brain Research*; Knöpfel, T., Boyden, E., Eds.; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2012; Vol. 196, pp 1–28.
- (110) Boyden, E. A History of Optogenetics: The Development of Tools for Controlling Brain Circuits with Light. *F1000 Biol. Rep.* **2011**, *3*, 1–12.
- (111) Vann, K. T.; Xiong, Z. G. Optogenetics for Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2016**, *8*, 1–8.
- (112) Hegemann, P.; Möglich, A. Channelrhodopsin Engineering and Exploration of New Optogenetic Tools. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 39–42.
- (113) Bamann, C.; Bamberg, E.; Wachtveitl, J.; Glaubitz, C. Proteorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837*, 614–625.
- (114) Friedrich, T.; Geibel, S.; Kalmbach, R.; Chizhov, I.; Ataka, K.; Heberle, J.; Engelhard, M.; Bamberg, E. Proteorhodopsin Is a Light-Driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 821–838.
- (115) Reckel, S.; Gottstein, D.; Stehle, J.; Löhr, F.; Verhoefen, M. K.; Takeda, M.; Silvers, R.; Kainosho, M.; Glaubitz, C.; Wachtveitl, J.; et al. Solution NMR Structure of Proteorhodopsin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 11942–11946.
- (116) Volkov, O.; Kovalev, K.; Polovinkin, V.; Borshchevskiy, V.; Bamann, C.; Astashkin, R.; Marin, E.; Popov, A.; Balandin, T.; Willbold, D.; et al. Structural Insights into Ion Conduction by Channelrhodopsin 2. *Science (80-.)*. **2017**, *358*, 1–8.
- (117) Becker-Baldus, J.; Bamann, C.; Saxena, K.; Gustmann, H.; Brown, L. J.; Brown, R. C. D.; Reiter, C.; Bamberg, E.; Wachtveitl, J.; Schwalbe, H.; et al. Enlightening the Photoactive Site of Channelrhodopsin-2 by DNP-Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 9896–9901.
- (118) Ritter, E.; Stehfest, K.; Berndt, A.; Hegemann, P.; Bartl, F. J. Monitoring Light-Induced Structural Changes of Channelrhodopsin-2 by UV-Visible and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 35033–35041.
- (119) Bamann, C.; Kirsch, T.; Nagel, G.; Bamberg, E. Spectral Characteristics of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 and Its Implication for Channel Function. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 686–694.
- (120) Berndt, A.; Yizhar, O.; Gunaydin, L. A.; Hegemann, P.; Deisseroth, K. Bi-Stable Neural State Switches. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 229–234.
- (121) Verhoefen, M. K.; Bamann, C.; Blöcher, R.; Förster, U.; Bamberg, E.; Wachtveitl, J. The Photocycle of Channelrhodopsin-2: Ultrafast Reaction Dynamics and Subsequent Reaction Steps. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3113–3122.
- (122) Mehler, M.; Eckert, C. E.; Leeder, A. J.; Kaur, J.; Fischer, T.; Kubatova, N.; Brown, L. J.; Brown, R. C. D.; Becker-Baldus, J.; Wachtveitl, J.; et al. Chromophore Distortions in Photointermediates of Proteorhodopsin Visualized by Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16143–16153.
- (123) Eckert, C. E.; Kaur, J.; Glaubitz, C.; Wachtveitl, J. Ultrafast Photoinduced Deactivation Dynamics of Proteorhodopsin. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 512–517.
- (124) Kato, H. E.; Zhang, F.; Yizhar, O.; Ramakrishnan, C.; Nishizawa, T.; Hirata, K.; Ito, J.; Aita, Y.; Tsukazaki, T.; Hayashi, S.; et al. Crystal Structure of the Channelrhodopsin Light-Gated Cation Channel. *Nature* **2012**, *482*, 369–374.

-
- (125) Schneider, F.; Grimm, C.; Hegemann, P. Biophysics of Channelrhodopsin. *Annu. Rev. Biophys.* **2015**, *44*, 167–186.
- (126) Nagel, G.; Szellas, T.; Huhn, W.; Kateriya, S.; Adeishvili, N.; Berthold, P.; Ollig, D.; Hegemann, P.; Bamberg, E. Channelrhodopsin-2, a Directly Light-Gated Cation-Selective Membrane Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13940–13945.
- (127) Feldbauer, K.; Zimmermann, D.; Pintschovius, V.; Spitz, J.; Bamann, C.; Bamberg, E. Channelrhodopsin-2 Is a Leaky Proton Pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 12317–12322.
- (128) Stehfest, K.; Hegemann, P. Evolution of the Channelrhodopsin Photocycle Model. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 1120–1126.
- (129) Cammann, K. *Instrumentelle Analytische Chemie - Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*, 1. Ausgabe.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, 2001.
- (130) Klán, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds : From Concepts to Practice*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, 2009.
- (131) Braslavsky, S. E. Glossary of Terms Used in Photochemistry , 3rd Edition. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 293–465.
- (132) Czeslik, C.; Seemann, H.; Winter, R. *Basiswissen Physikalische Chemie*, 3rd ed.; Vieweg+Teubner: Wiesbaden, 2009.
- (133) Likhtenstein, G. I. *Electron Spin Interactions in Chemistry and Biology: Fundamentals, Methods, Reactions Mechanisms, Magnetic Phenomena, Structure Investigation*, 1st ed.; Springer International Publishing: Basel, 2016.
- (134) Balzani, V.; Ceroni, P.; Juris, A. *Photochemistry and Photophysics: Concepts, Research, Applications*, 1st ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2014.
- (135) Atkins, P. W.; Paula, J. de. *Atkins' Physical Chemistry*, 8th ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006.
- (136) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science+Business Media, LCC: New York, 2006.
- (137) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
- (138) Wu, P. G.; Brand, L. Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 1–13.
- (139) Clegg, R. M. Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 103–110.
- (140) Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; Michl, J.; Balzani, V. *Handbook of Photochemistry*, 3rd ed.; Taylor & Francis Group: London, 2006.
- (141) Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. Relative and Absolute Determination of Fluorescence Quantum Yields of Transparent Samples. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1535–1550.
- (142) Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. Comparison of Methods and Achievable Uncertainties for Relative and Absolute Measurements of Photoluminescence Quantum Yields. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3431–3439.
- (143) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
- (144) Jobin Yvon. A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields Introduction: *Tech. Guid.* **2003**.
- (145) Ameloot, M.; VandeVen, M.; Acuña, A.; Valeur, B. Fluorescence Anisotropy Measurements in Solution: Methods and Reference Materials (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 589–608.
- (146) Shi, X.; Herschlag, D. Fluorescence Polarization Anisotropy to Measure RNA Dynamics. In *Methods in enzymology*; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2009; Vol. 469, pp 287–302.
- (147) Gonzalez, F. L.; Levi, V. Determination of the Molecular Size of BSA by Fluorescence Anisotropy. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2003**, *31*, 319–322.

- (148) Kapusta, P.; Erdmann, R.; Ortmann, U.; Wahl, M. Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Measurements Made Simple. *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 179–183.
- (149) Smith, T. A.; Ghiggino, K. P. A Review of the Analysis of Complex Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Data. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 022001.
- (150) Gottwald, W.; Wachter, G. *IR-Spektroskopie Für Anwender*, 1st ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 1997.
- (151) Günzler, H.; Gremlich, H.-U. *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*, 4th ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2003.
- (152) Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, 2004.
- (153) Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, 2007.
- (154) Thermo Scientific. Detectors for Fourier Transform Spectroscopy. *Appl. Note* **2007**, *50808*, 1–4.
- (155) Papular, L. *Mathematik Für Ingenieure Und Naturwissenschaftler Band2*, 13th ed.; Vieweg+Teubner: Wiesbaden, 2012.
- (156) Bruker Optik GmbH. *Opus / IR Referenzhandbuch*, 7th ed.; Bruker Optik GmbH, 2011.
- (157) Berera, R.; Grondelle, R.; Kennis, J. T. M. Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy: Principles and Application to Photosynthetic Systems. *Photosynth. Res.* **2009**, *101*, 105–118.
- (158) Islam, M. N.; Mollenauer, L. F.; Stolen, R. H.; Simpson, J. R.; Shang, H. T. Cross-Phase Modulation in Optical Fibers. *Opt. Lett.* **1987**, *12*, 625–627.
- (159) Strickland, D.; Mourou, G. Compression of Amplified Chirped Optical Pulses. *Opt. Commun.* **1985**, *56*, 219–221.
- (160) The Royal Swedish Academy of Sciences. Scientific Background on the Nobel Prize in Physics 2018: Groundbreaking inventions in Laser physics <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-physicsprize2018.pdf> (accessed Oct 18, 2018).
- (161) Eichler, J.; Eichler, H. J. *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*, 7th ed.; Springer-Verlag Berlin: Heidelberg, 2010.
- (162) Wedler, G. *Lehrbuch Der Physikalischen Chemie*, 5th ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2004.
- (163) Adam, G.; Läger, P.; Stark, G. *Physikalische Chemie Und Biophysik*, 5th ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2009.
- (164) Bisswanger, H. *Enzyme Kinetics Principles and Methods*, 3rd ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2002.
- (165) Vogt, A. D.; Di Cera, E. Conformational Selection or Induced Fit? A Critical Appraisal of the Kinetic Mechanism. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5894–5902.
- (166) Bruker Optik GmbH. *Vertex 80 User Manual*, 1st ed.; 2006.
- (167) Mergny, J.-L.; Lacroix, L. Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537.
- (168) Oxford Instruments NanoScience. *OptistatDN Operator's Handbook*; 2006.
- (169) Oxford Instruments. Nitrogen cryostat 77K, sample in exchange gas - OptistatDN <https://www.oxford-instruments.com> (accessed Sep 22, 2017).
- (170) Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; Lide, D. R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 2005.
- (171) Clark-MXR. *CPA-2001 User Manual*, 4th ed.; Clark-MXR, Inc., 2002.
- (172) Slavov, C.; Hartmann, H.; Wachtveitl, J. Implementation and Evaluation of Data Analysis Strategies for Time-Resolved Optical Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2328–2336.

-
- (173) Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data : Application to HIV Proteinase. *Anal. Biochem.* **1996**, *273*, 260–273.
- (174) Kuzmič, P. DynaFit-A Software Package for Enzymology. *Methods Enzymol.* **2009**, *467*, 247–280.
- (175) Myung, J.; Tang, Y.; Pitt, M. A. Evaluation and Comparison of Computational Models. *Methods Enzymol.* **2009**, *454*, 287–304.
- (176) Mülhardt, C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 6th ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2009.
- (177) Chomczynski, P. Solubilization in Formamide Protects RNA from Degradation. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3791–3792.
- (178) Dharmacon Inc. Dharmacon <http://dharmacon.horizondiscovery.com/custom-rna/> (accessed Oct 18, 2018).
- (179) Owczarzy, R.; Tataurov, A. V.; Wu, Y.; Manthey, J. A.; McQuisten, K. A.; Almabrazi, H. G.; Pedersen, K. F.; Lin, Y.; Garretson, J.; McEntaggart, N. O.; et al. IDT SciTools: A Suite for Analysis and Design of Nucleic Acid Oligomers. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W163–W169.
- (180) Cavaluzzi, M. J.; Borer, P. N. Revised UV Extinction Coefficients for Nucleoside-5'-Monophosphates and Unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1–9.
- (181) Cantor, C. R.; Warshaw, M. M.; Shapiro, H. Oligonucleotide Interactions. 3. Circular Dichroism Studies of the Conformation of Deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **1970**, *9*, 1059–1077.
- (182) Lane, L. B. Freezing Points of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Ind. Eng. Chem.* **1925**, *17*, 924.
- (183) Li, D. X.; Liu, B. L.; Liu, Y. shu; Chen, C. Predict the Glass Transition Temperature of Glycerol-Water Binary Cryoprotectant by Molecular Dynamic Simulation. *Cryobiology* **2008**, *56*, 114–119.
- (184) Banyay, M.; Sarkar, M.; Gräslund, A. A Library of IR Bands of Nucleic Acids in Solution. *Biophys. Chem.* **2003**, *104*, 477–488.
- (185) Gustmann, H.; Lefrancois, D.; Reuss, A. J.; Gophane, D. B.; Braun, M.; Dreuw, A.; Sigurdsson, S. T.; Wachtveitl, J. Spin the Light off: Rapid Internal Conversion into a Dark Doublet State Quenches the Fluorescence of an RNA Spin Label. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 26255–26264.
- (186) Snyder, L. R. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J. Chromatogr. A* **1974**, *92*, 223–230.
- (187) Snyder, L. R. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, *16*, 223–234.
- (188) Glasoe, P. K.; Long, F. A. Use Of Glass Electrodes To Measure Acidities In Deuterium Oxide. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188–190.
- (189) Englman, R.; Jortner, J. The Energy Gap Law for Radiationless Transitions in Large Molecules. *Mol. Phys.* **1970**, *18*, 145–164.
- (190) Bixon, M.; Jortner, J. Intramolecular Radiationless Transitions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 715–726.
- (191) Lin, F.; Pei, D.; He, W.; Huang, Z.; Huang, Y.; Guo, X. Electron Transfer Quenching by Nitroxide Radicals of the Fluorescence of Carbon Dots. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11801–11807.
- (192) Rane, V.; Kundu, S.; Das, R. Photophysical Studies on Covalently-Linked Naphthalene and TEMPO Free Radical Systems: Observation of a Charge Transfer State in the Ground State. *J. Fluoresc.* **2015**, *25*, 1351–1361.
- (193) Turner, D. H.; Sugimoto, N.; Kierzek, R.; Dreiker, S. D. Free Energy Increments for Hydrogen Bonds in Nucleic Acid Base Pairs. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3783–3785.
- (194) Stofer, E.; Chipot, C.; Lavery, R. Free Energy Calculations of Watson-Crick Base Pairing in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9503–9508.
- (195) Vendeix, F. A. P.; Munoz, A. M.; Agris, P. F. Free Energy Calculation of Modified Base-Pair Formation in Explicit Solvent: A Predictive Model. *RNA* **2009**, *15*, 2278–2287.

- (196) Protozanova, E.; Yakovchuk, P.; Frank-Kamenetskii, M. D. Stacked-Unstacked Equilibrium at the Nick Site of DNA. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 775–785.
- (197) Weigand, J. E.; Gottstein-Schmidtke, S. R.; Demolli, S.; Groher, F.; Duchardt-Ferner, E.; Wöhnert, J.; Suess, B. Sequence Elements Distal to the Ligand Binding Pocket Modulate the Efficiency of a Synthetic Riboswitch. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1627–1637.
- (198) Schläfer, H. L.; Kling, O. Bedeutung Isosbestischer Punkte Für Die Spektrophotometrische Untersuchung Chemischer Zeitreaktionen Und Gleichgewichte. *Angew. Chemie* **1956**, *68*, 667–670.
- (199) Dioumaev, A. K.; Brown, L. S.; Shih, J.; Spudich, E. N.; Spudich, J. L.; Lanyi, J. K. Proton Transfers in the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5348–5358.
- (200) Váró, G.; Brown, L. S.; Lakatos, M.; Lanyi, J. K. Characterization of the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1202–1207.
- (201) Mehler, M.; Scholz, F.; Ullrich, S. J.; Mao, J.; Braun, M.; Brown, L. J.; Brown, R. C. D.; Fiedler, S. A.; Becker-Baldus, J.; Wachtveitl, J.; et al. The EF Loop in Green Proteorhodopsin Affects Conformation and Photocycle Dynamics. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 385–397.
- (202) Börjesson, K.; Preus, S.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. Nucleic Acid Base Analog FRET-Pair Facilitating Detailed Structural Measurements in Nucleic Acid Containing Systems Nucleic Acid Base Analog FRET-Pair Facilitating Detailed Structural Measurements in Nucleic Acid Containing Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288–4293.
- (203) Iqbal, A.; Arslan, S.; Okumus, B.; Wilson, T. J.; Giraud, G.; Norman, D. G.; Ha, T.; Lilley, D. M. J. Orientation Dependence in Fluorescent Energy Transfer between Cy3 and Cy5 Terminally Attached to Double-Stranded Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 11176–11181.
- (204) Yan, Y.; Marriott, G. Analysis of Protein Interactions Using Fluorescence Technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 635–640.
- (205) Bood, M.; Sarangamath, S.; Wranne, M. S.; Grøtli, M.; Wilhelmsson, L. M. Fluorescent Nucleobase Analogues for Base-Base FRET in Nucleic Acids: Synthesis, Photophysics and Applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *14*, 114–129.
- (206) Stelzl, L. S.; Erlenbach, N.; Heinz, M.; Prisner, T. F.; Hummer, G. Resolving the Conformational Dynamics of DNA with Ångstrom Resolution by Pulsed Electron-Electron Double Resonance and Molecular Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11674–11677.
- (207) Erlenbach, N.; Endeward, B.; Schöps, P.; Gophane, D. B.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F. Flexibilities of Isoindoline-Derived Spin Labels for Nucleic Acids by Orientation Selective PELDOR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 16196–16201.
- (208) Grytz, C. M.; Kazemi, S.; Marko, A.; Cekan, P.; Güntert, P.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F. F. Determination of Helix Orientations in a Flexible DNA by Multi-Frequency EPR Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 29801–29811.
- (209) Gophane, D. B.; Endeward, B.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Conformationally Restricted Isoindoline-Derived Spin Labels in Duplex DNA: Distances and Rotational Flexibility by Pulsed Electron-Electron Double Resonance Spectroscopy. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15913–15919.
- (210) Marko, A.; Margraf, D.; Cekan, P.; Sigurdsson, S. T.; Schiemann, O.; Prisner, T. F. Analytical Method to Determine the Orientation of Rigid Spin Labels in DNA. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2010**, *81*, 1–9.
- (211) Keller, S.; Vargas, C.; Zhao, H.; Piszczek, G.; Brautigam, C. A.; Schuck, P. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5066–5073.
- (212) Scheuermann, T. H.; Brautigam, C. A. High-Precision, Automated Integration of Multiple Isothermal Titration Calorimetric Thermograms: New Features of NITPIC. *Methods* **2015**, *76*, 87–98.
- (213) Zhao, H.; Piszczek, G.; Schuck, P. SEDPHAT - A Platform for Global ITC Analysis and Global Multi-Method Analysis of Molecular Interactions. *Methods* **2015**, *76*, 137–148.
- (214) Brautigam, C. A. Chapter Five - Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. In *Analytical Ultracentrifugation*; Cole, J. L., Ed.; Methods in Enzymology;

Elsevier B.V.: Amsterdam, 2015; Vol. 562, pp 109–133.

- (215) Misra, V. K.; Draper, D. E. On the Role of Magnesium Ions in RNA Stability. *Biopolymers* **1998**, *48*, 113–135.

7 Anhang

In diesem Kapitel sind verschiedenste Abbildungen, Tabellen, Skripte und Texte zusammengestellt. Diese beinhalten zusätzliche Informationen, die für ein detailliertes Verständnis der im Hauptteil der Arbeit präsentierten Zusammenhänge nützlich sein könnten.

7.1 ζ_m^f als RNA-Fluoreszenzlabel

7.1.1 Photophysik und Quenchingmechanismus

7.1.1.1 Alternative Auswertungen der TCSPC-Messungen

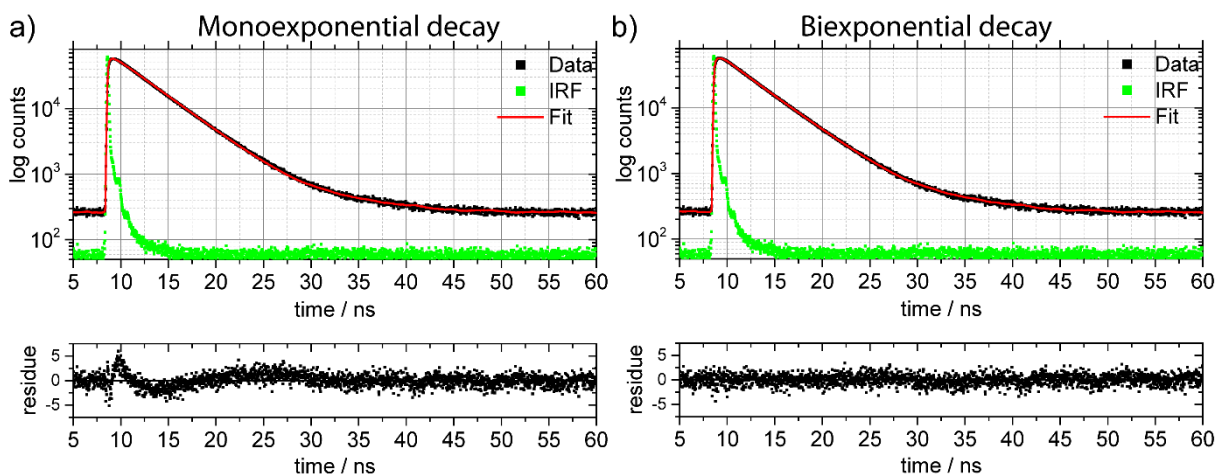


Abbildung 7.1. Vergleich der verschiedenen (mono- und biexponentiellen) Fluoreszenzlebensdaueranalysen von ζ_m^f (NaCacodylat, pH 7,4). Rekonvolution mittels a) monoexponentieller und b) biexponentieller Zerfallsfunktion.

Der Fluoreszenzzerfall von ζ_m^f kann alternativ auch nur mit einer Zerfallskomponente von 4,0 ns beschrieben werden. Im Vergleich zur Auswertung bzw. zur Rekonvolution mit zwei Zerfallskomponenten zeigt sich, dass τ_{av} sich nicht signifikant verändert (Abbildung 7.1, Tabelle 7.1). Allerdings ist der χ^2 -Wert der monoexponentiellen Auswertung signifikant größer als der Wert bei der biexponentiellen Auswertung. Außerdem ist im monoexponentiellen Fall ein deutliches Residuum der Rekonvolution oberhalb des Rauschniveaus festzustellen. Deshalb wird im Ergebniskapitel nur die biexponentielle Auswertung dieser Daten diskutiert.

Tabelle 7.1. Vergleich der verschiedenen (mono- und biexponentiellen) Fluoreszenzlebensdaueranalysen von ζ_m^f .

Probe		τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
H ₂ O	ζ_m^f	0,2	4,0 (100%)	-	1,7	4,1
	ζ_m^f	0,3	4,1 (96%)	1,4 (4%)	1,1	4,1

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Wie schon im Ergebniskapitel erwähnt, ähnelt die ns-Zerfallskomponente des ζ_m stark dem Fluoreszenzzerfall von ζ_m^f . Deshalb wurde zunächst vermutet, dass es sich bei dieser Signalkomponente, trotz Aufreinigung mittels HPLC, um eine Chromophorkontamination handeln könnte. Um den Einfluss dieser Kontamination auf das Signal zu korrigieren, wurde eine skalierte Subtraktion des ζ_m^f -Fluoreszenzzerfalls vom ζ_m -Fluoreszenzzerfall durchgeführt (Abbildung 7.2, Tabelle 7.2).

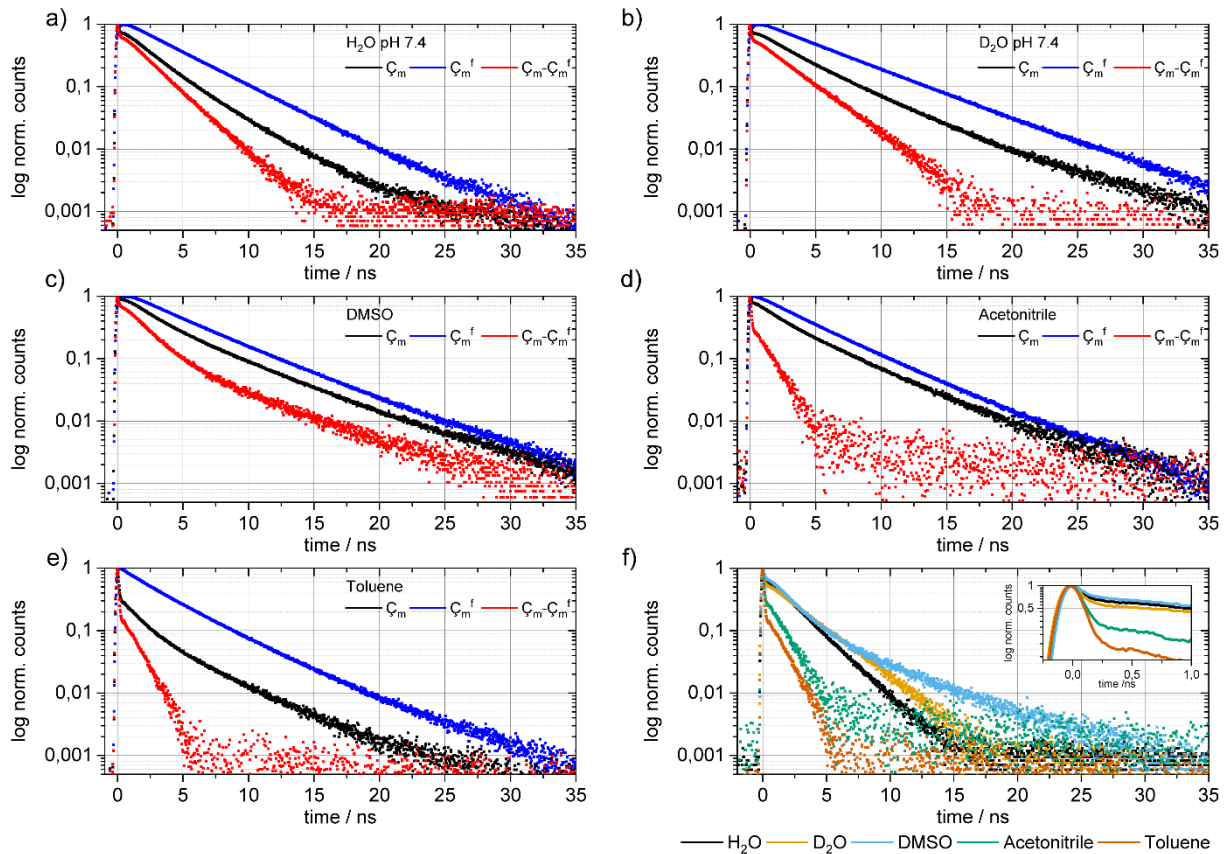


Abbildung 7.2. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von ζ_m und ζ_m^f in verschiedenen Lösungsmitteln (a–e) jeweils mit korrigiertem ζ_m -Fluoreszenzzerfall (skalierte Differenz von ζ_m und ζ_m^f). Vergleich der korrigierten ζ_m -Fluoreszenzzerfälle in Abhängigkeit des Lösungsmittels (f).

Dabei zeigte sich aber, dass es nicht möglich ist, die ns-Komponente vollständig zu subtrahieren. Im Speziellen ließ sich die kürzere ns-Komponente (τ_2), im Bereich von 2 ns, nicht subtrahieren. Allerdings beeinflusst diese Komponente die Lebensdaueranalyse nicht, da sie deutlich unter 1% zum Gesamtzerfall beiträgt. Trotzdem ist diese Komponente deutlich in den logarithmischen TCSPC-Abbildungen erkennbar. Entsprechend musste sowohl mit als auch ohne skalierte Subtraktion des ζ_m^f -Zerfalls von einer (sehr) schwachen ns-Komponente im ζ_m -Zerfall ausgegangen werden. Da sich letztlich zeigte, dass die Diskussion des Hauptquenchingmechanismus der ζ_m -Fluoreszenz völlig unabhängig von der Ausprägung dieser ns-Komponenten geführt werden kann, wurde auf den Subtraktionsschritt bei der Auswertung verzichtet. Dadurch konnte eine transparentere und klarere Auswertung der Fluoreszenzzerfälle erreicht werden.

Tabelle 7.2. Fluoreszenzlebenszeiten von ζ_m in verschiedenen Lösungsmitteln, nach skaliertem Subtraktion des entsprechenden ζ_m^f -Zerfalls.

Probe	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
H ₂ O	-	2,2 (<<1%)	0,003 (>>99%)	0,8	0,1
D ₂ O	-	2,8 (<<1%)	0,003 (>>99%)	1,8	0,1
DMSO	6,9 (<<1%)	1,9 (<<1%)	0,003 (>>99%)	1,1	0,2
Acetonitril	-	1,3 (<<1%)	0,004 (>>99%)	5,5	0,04
Toluol	-	1,2 (<<1%)	0,004 (>>99%)	8,1	0,02

τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

7.1.2 ζ_m^f in RNA-Modellsequenzen

7.1.2.1 Probenübersicht

Tabelle 7.3. Sequenzen und Zusammensetzung der verschiedenen ζ_m^f -markierten RNA-Modellsysteme.

Probenname	Sequenz
ds_ $\text{A}\zeta_m^f\text{A}$	5'-UAC-GCA- $\text{A}\zeta_m^f\text{A}$ -ACG-CAU-3' 3'-AUG-CGU-UGU-UGC-GUA-5'
ds_ $\text{C}\zeta_m^f\text{C}$	5'-UAC-GCA- $\text{C}\zeta_m^f\text{C}$ -ACG-CAU-3' 3'-AUG-CGU-GGG-UGC-GUA-5'
ds_ $\text{G}\zeta_m^f\text{G}$	5'-UAC-GCA- $\text{G}\zeta_m^f\text{G}$ -ACG-CAU-3' 3'-AUG-CGU-CGC-UGC-GUA-5'
ds_ $\text{U}\zeta_m^f\text{U}$	5'-UAC-GCA- $\text{U}\zeta_m^f\text{U}$ -ACG-CAU-3' 3'-AUG-CGU-AGA-UGC-GUA-5'
ss_ $\text{A}\zeta_m^f\text{A}$	5'-UAC-GCA- $\text{A}\zeta_m^f\text{A}$ -ACG-CAU-3'
ss_ $\text{C}\zeta_m^f\text{C}$	5'-UAC-GCA- $\text{C}\zeta_m^f\text{C}$ -ACG-CAU-3'
ss_ $\text{G}\zeta_m^f\text{G}$	5'-UAC-GCA- $\text{G}\zeta_m^f\text{G}$ -ACG-CAU-3'
ss_ $\text{U}\zeta_m^f\text{U}$	5'-UAC-GCA- $\text{U}\zeta_m^f\text{U}$ -ACG-CAU-3'

7.1.2.2 Statische Emissionsmessungen

Tabelle 7.4. Absolute Quantenausbeuten der einfach ζ_m^f -markierten einzel- und doppelsträngigen RNA-Modellsequenzen.

Probe	Quantenausbeute / %		ss/ds
	ds	ss	
A ζ_m^f A	25	54	2,2
CC ζ_m^f C	22	39	1,8
GG ζ_m^f G	26	42	1,6
UU ζ_m^f U	22	41	1,9
Mittelwert	24	44	1,8

Tabelle 7.5. Statische Fluoreszenzanisotropie der einfach ζ_m^f -markierten einzel- und doppelsträngigen RNA-Modellsequenzen.

Probe	Statische Anisotropie bei 20 °C		ds/ss
	ds	ss	
A ζ_m^f A	0,12	0,08	1,5
CC ζ_m^f C	0,14	0,11	1,3
GG ζ_m^f G	0,14	0,09	1,6
UU ζ_m^f U	0,17	0,09	1,9
Mittelwert	0,14	0,09	1,6

Tabelle 7.6. Schmelztemperaturen der einfach ζ_m^f -markierten doppelsträngigen RNA-Modellsequenzen, ermittelt durch die Emissionsänderung bei drei verschiedenen Nachweiswellenlängen.

Probe	T _{melt} @448 nm / °C	T _{melt} @461 nm / °C	T _{melt} @475 nm / °C	Mittelwert T _{melt} / °C
ds_A ζ_m^f A	67,4	67,3	67,3	67,3
ds_CC ζ_m^f C	81,2	81,3	80,6	81,0
ds_GG ζ_m^f G	75,9	75,7	75,7	75,8
ds_UU ζ_m^f U	70,1	69,9	70,4	70,1

7.1.2.3 MATLAB-Skript für die Emissionsschmelzanalyse

```
%Melfitting
%
%Script determines the amount of double stranded RNA in a CmF labelled RNA
sample

%-----
%The fitfunction is defined separately as meltfit.m:
%function Fitting = meltfit(x,lb_x,ub_x)
%global ds ss sample
%Fitting = sample - ((1-x)*ss + x*ds);
%end
%-----

option = optimset('Display','iter','TolFun',1e-30,... %options of fit
    'TolX',1e-60,'MaxIter',500,'MaxFunEvals',1000);

global ds ss sample %global variables

ds = ds_inp(123:475); % spectrum of 100% double strand. Cropped to exclude
excitation peak.
ss = ss_inp(123:475); % spectrum of 100% single strand. Cropped to exclude
excitation peak.
sample = sample_inp(123:475); % spectrum unknown amount of double and
single strand. Cropped to exclude excitation peak.

x=0.5; %start value
x_lb=0; %lower boundary
x_ub=1; %upper boundary

[fit,resnorm,residual] = lsqnonlin(@meltfit,x,x_lb,x_ub,option); %Fit of
function meltfit

%-----
%Plotting of results

figure
plot(fit*ds, 'r')
hold on
plot((1-fit)*ss, 'g')
plot(sample, 'k')
plot(fit*ds+(1-fit)*ss,'m')
plot(residual,'b')
legend ('ds', 'ss', 'sample', 'fit', 'res')
grid on

%-----
```

7.1.2.4 Fluoreszenzlebensdauermessungen

Tabelle 7.7. Vergleich der mittleren Fluoreszenzlebensdauern (τ_{av}) der einfach C_m^f -markierten einzel- und doppelsträngigen RNA-Modellsequenzen mit C_m^f in Lösung bei 20 °C.

Probe	τ_{av}	$\Delta \tau_{av}$	$1/\tau_{av}$
C_m^f	4,2	0,1	0,24
ds_ AC_m^fA	5,3	0,1	0,19
ss_ AC_m^fA	7,5	0,1	0,13
ds_ CC_m^fC	4,5	0,1	0,22
ss_ CC_m^fC	6,4	0,1	0,16
ds_ GC_m^fG	5,2	0,1	0,19
ss_ GC_m^fG	7	0,1	0,14
ds_ UC_m^fU	4,6	0,1	0,22
ss_ UC_m^fU	6,5	0,1	0,15

τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. $\Delta\tau_{av}$ = abgeschätzter Fehler der mittleren Fluoreszenzlebensdauer.

7.1.2.5 Temperaturabhängige Fluoreszenzlebensdauermessungen

Tabelle 7.8. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_ AC_m^fA .

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,5	4,6 (89%)	7,6 (11%)	1,2	5,3
30	1,4	4 (86%)	7,4 (14%)	1,1	5,0
40	1,0	3,6 (83%)	7,4 (17%)	1,1	4,9
50	0,8	3,2 (76%)	7,2 (24%)	1,1	5,0
60	0,7	2,8 (67%)	7 (33%)	1,1	5,3
70	0,5	2,6 (52%)	6,7 (48%)	1,1	5,6
80	0,4	3,3 (39%)	6,6 (61%)	1,0	5,9
90	0,4	3 (41%)	6,3 (59%)	1,1	5,6

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.9. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von $ss_A\dot{C}_m fA$.

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,5	6,4 (71%)	8,5 (71%)	1,1	7,5
30	1,3	6,1 (69%)	8,3 (69%)	1,1	7,3
40	1	5,6 (52%)	7,7 (52%)	1,2	7,1
50	0,9	5,1 (40%)	7,4 (40%)	1,1	6,9
60	0,7	4,7 (37%)	7,3 (37%)	1,1	6,8
70	0,6	4,2 (34%)	7 (34%)	1,0	6,5
80	0,5	3,9 (35%)	6,7 (35%)	1,1	6,2
90	0,4	3,5 (35%)	6,4 (35%)	1,1	5,9

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.10. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von $ds_C\dot{C}_m fC$.

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,7	4,1 (96%)	6,8 (4%)	1,1	4,5
30	1,7	3,4 (93%)	6 (7%)	1,3	4,0
40	1,6	2,9 (92%)	5,7 (8%)	1,3	3,6
50	1,2	2,5 (92%)	5,9 (8%)	1,3	3,3
60	1,0	2,2 (89%)	5,9 (11%)	1,3	3,3
70	0,8	1,9 (82%)	5,6 (18%)	1,3	3,5
80	0,5	1,8 (71%)	5,5 (29%)	1,3	3,9
90	0,4	1,8 (50%)	5,1 (50%)	1,2	4,3

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.11. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von $ss_C\dot{C}_m fC$.

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,5	5,1 (77%)	8,2 (23%)	1,1	6,4
30	1,3	4,4 (60%)	7,5 (40%)	1,1	6,3
40	1	4,1 (55%)	7,2 (45%)	1,1	6,1
50	0,7	3,7 (53%)	6,9 (47%)	1,1	5,8
60	0,5	3,4 (54%)	6,4 (46%)	1,1	5,3
70	0,5	3 (57%)	5,8 (43%)	1,1	4,8
80	0,4	2,7 (60%)	5,2 (40%)	1,1	4,2
90	0,3	2,4 (60%)	4,6 (40%)	1,2	3,7

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.12. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_GC_mfG .

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	2,3	4,7 (97%)	7,5 (3%)	1,3	5,2
30	2,1	4,2 (96%)	7,2 (4%)	1,4	4,7
40	1,7	3,7 (92%)	6,2 (8%)	1,3	4,3
50	1,4	3,3 (92%)	6,3 (8%)	1,3	3,9
60	1	2,9 (89%)	6 (11%)	1,2	3,7
70	0,8	2,5 (83%)	5,5 (17%)	1,2	3,6
80	0,5	2,3 (73%)	5 (27%)	1,2	3,6
90	0,3	2,2 (61%)	4,5 (39%)	1,2	3,5

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.13. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ss_GC_mfG .

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,6	5,6 (69%)	8,2 (31%)	1,1	7,0
30	1,3	5,4 (69%)	8 (31%)	1,1	6,7
40	1,1	5 (62%)	7,6 (38%)	1,1	6,5
50	0,8	4,7 (56%)	7,2 (44%)	1,2	6,2
60	0,6	4,2 (47%)	6,7 (53%)	1,1	5,9
70	0,5	3,7 (43%)	6,3 (57%)	1,2	5,6
80	0,5	3,2 (37%)	5,7 (63%)	1,1	5,2
90	0,4	3 (38%)	5,4 (62%)	1,2	4,9

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.14. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_UC_mfU .

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,6	4,2 (97%)	7,4 (3%)	1,1	4,6
30	1,4	3,8 (96%)	6,8 (4%)	1,2	4,2
40	1,3	3,3 (94%)	6,2 (6%)	1,2	3,8
50	1	3 (93%)	6,3 (7%)	1,2	3,6
60	0,7	2,6 (89%)	5,8 (11%)	1,2	3,4
70	0,6	2,3 (83%)	5,2 (17%)	1,1	3,4
80	0,4	2,1 (66%)	4,6 (34%)	1,2	3,5
90	0,3	1,9 (55%)	4,1 (45%)	1,2	3,3

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.
 τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.
 τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

Tabelle 7.15. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ss- $U\zeta_m^fU$.

Temperatur / °C	τ_{pop} / ns	τ_1 / ns	τ_2 / ns	χ^2	τ_{av} / ns
20	1,9	3,9 (36%)	6,8 (64%)	1,2	6,5
30	1,2	4,3 (40%)	6,7 (60%)	1,3	6,2
40	0,9	3,9 (46%)	6,5 (54%)	1,1	5,8
50	0,7	3,4 (49%)	6,1 (51%)	1,2	5,3
60	0,6	3 (51%)	5,7 (49%)	1,2	4,8
70	0,5	2,7 (55%)	5,2 (45%)	1,2	4,3
80	0,4	2,4 (54%)	4,7 (46%)	1,2	3,9
90	0,3	2,1 (52%)	4,1 (48%)	1,2	3,5

τ_{pop} = Lebenszeitkomponente mit negativer Amplitude, repräsentiert die Population des fluoreszierenden Zustands.

τ_n = Lebenszeitkomponente mit positiver Amplitude, repräsentiert die Depopulation des fluoreszierenden Zustands.

τ_{av} = mittlere Fluoreszenzlebensdauer. χ^2 = reduziertes Chi-Quadrat, als Maß der Anpassungsqualität.

7.1.3 ζ_m^f im neomycinbindenden Aptamer

7.1.3.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

Für die isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) wurde ein iTC200 Microcalorimeter (MicroCal, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) verwendet. Dabei wurde die Probenzelle des Geräts mit der zu untersuchenden RNA-Probe (Aptamer) gefüllt (rund 10 μ M RNA, 20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, pH 7,4). Anschließend wurde die Injektionsspritze mit einer Lösung des Liganden (75 μ M Neomycin, 20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, pH 7,4) befüllt. Nach Temperierung des Systems auf 20 °C sowie einer initialen Verzögerung von 120 s wurde die Messung mit einer ersten Injektion von 0,2 μ l gestartet. Anschließend wurden 20 Injektionen zu je 2,0 μ l in einem Abstand von jeweils 180 s gemacht. Dabei wurde die Probenzelle mit einer Rührgeschwindigkeit von 750 Umdrehungen pro Minute (12,5 Hz) kontinuierlich durchmischt.¹⁹⁷

Zur Auswertung der ITC-Messungen wurden die Injektionspeaks zunächst einzeln mittels des Programms NITPIC integriert. So konnte die mit jedem Injektionsschritt assoziierte Wärme bestimmt werden.^{211,212} Ausgehend von diesen Daten konnte dann eine Bindungsisotherme ermittelt werden. Diese Isotherme wurde anschließend mittels eines *one-side*-Bindungsmodells angepasst. Dazu wurde das Programm SEDPHAT verwendet.²¹³ Anhand der Anpassung war es schließlich möglich, die Dissoziationskonstante (K_D) zu bestimmen. Zur Darstellung der Messungen bzw. zur weiteren Datenverarbeitung wurde außerdem unter anderem das Programm GUSI verwendet.²¹⁴

7.1.3.1.1 Einfluss der Pufferbedingungen auf die Dissoziationskonstanten der markierten N1-Aptamerproben
Mittels ITC wurden die Dissoziationskonstanten der markierten N1-Aptamerproben sowie des unmarkierten Aptamers N1 bestimmt. Dabei wurde der verwendete Puffer (20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, pH 7,4) sowohl mit als auch ohne 10 mM $MgCl_2$ sowie 1 mM Spermidin eingesetzt. In Abbildung 7.3 und Abbildung 7.4 sind die entsprechenden ITC-Messungen sowie jeweils ein Vergleich der Bindungsisothermen aufgetragen. Wie anhand dieser Abbildungen sichtbar wird, ist die Qualität der Messungen vergleichsweise niedrig. Ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie Mehrfachbestimmungen wären nur durch einen unverhältnismäßig hohen Probenverbrauch möglich gewesen. Außerdem fällt auf, dass im Fall der ζ_m^f -markierten Proben das Aptamer-Ligand-Verhältnis am Wendepunkt der Bindungsisothermen nicht 1 ist. Dies lässt sich sehr wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Konzentrationsbestimmung der Aptamerproben zurückführen. Offenbar verändert die ζ_m^f -Markierung den Extinktionskoeffizienten der Aptamere.

Entsprechend sollten die in Tabelle 7.16 zusammengefassten Ergebnisse dieser Messungen nicht überinterpretiert werden. Wie allerdings schon im entsprechenden Ergebniskapitel angesprochen wurde, kann durch diese Messungen deutlich gezeigt werden, dass die markierten Proben im Vergleich zu dem unmarkierten Aptamer den Liganden deutlich schlechter binden. Außerdem bindet die Probe ζ_m^f22 den Liganden, unter den hier untersuchten Bedingungen, faktisch nicht. Diese beiden Aussagen treffen sowohl für die Untersuchungen mit als auch ohne 10 mM $MgCl_2$ und 1 mM Spermidin zu.

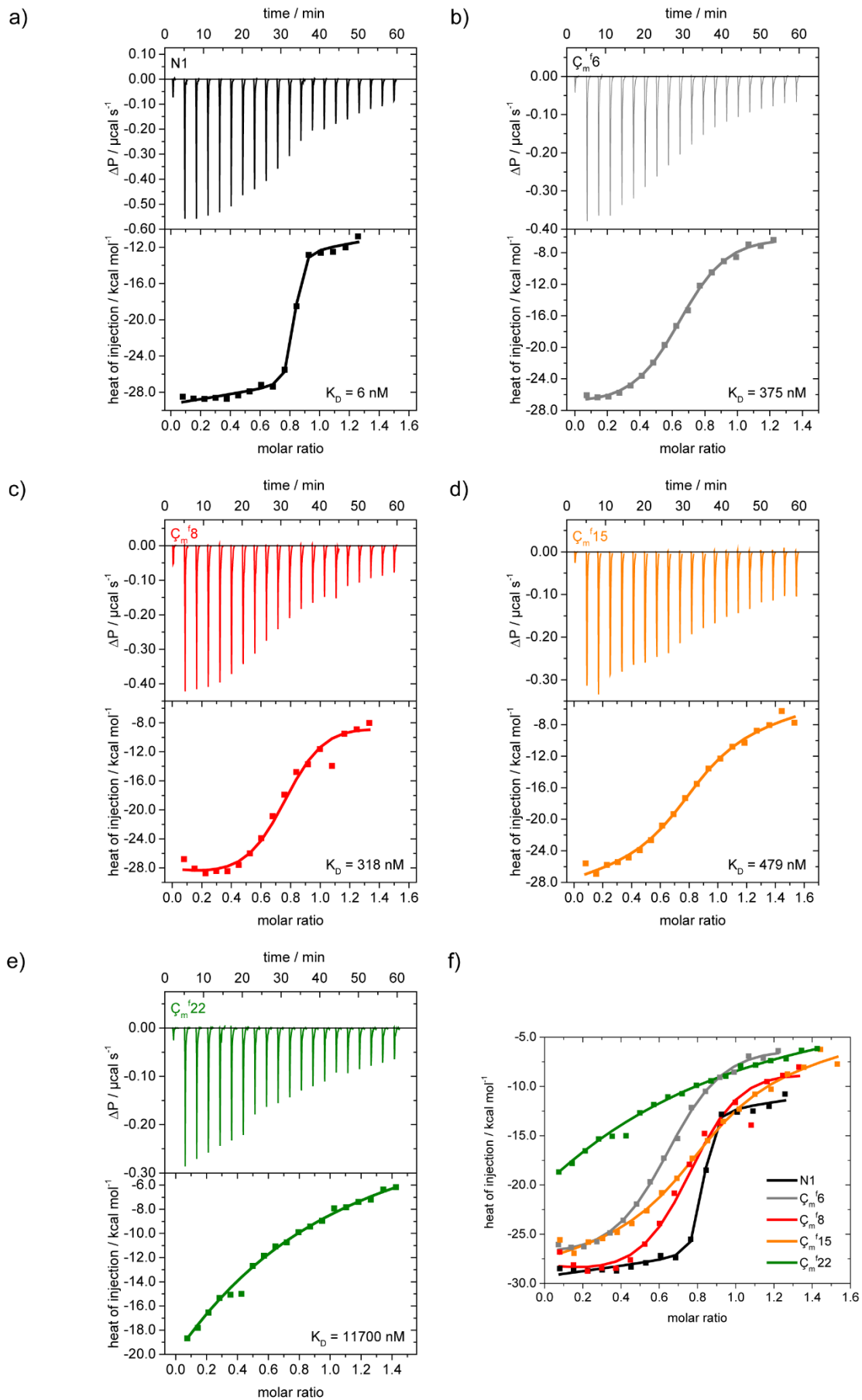


Abbildung 7.3. ITC-Messungen von a) N1, b) C_m^6 , c) C_m^8 , d) C_m^{15} , e) C_m^{22} und f) Vergleich der fünf Bindungsisotherme unter folgenden Pufferbedingungen: 20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, pH 7,4.

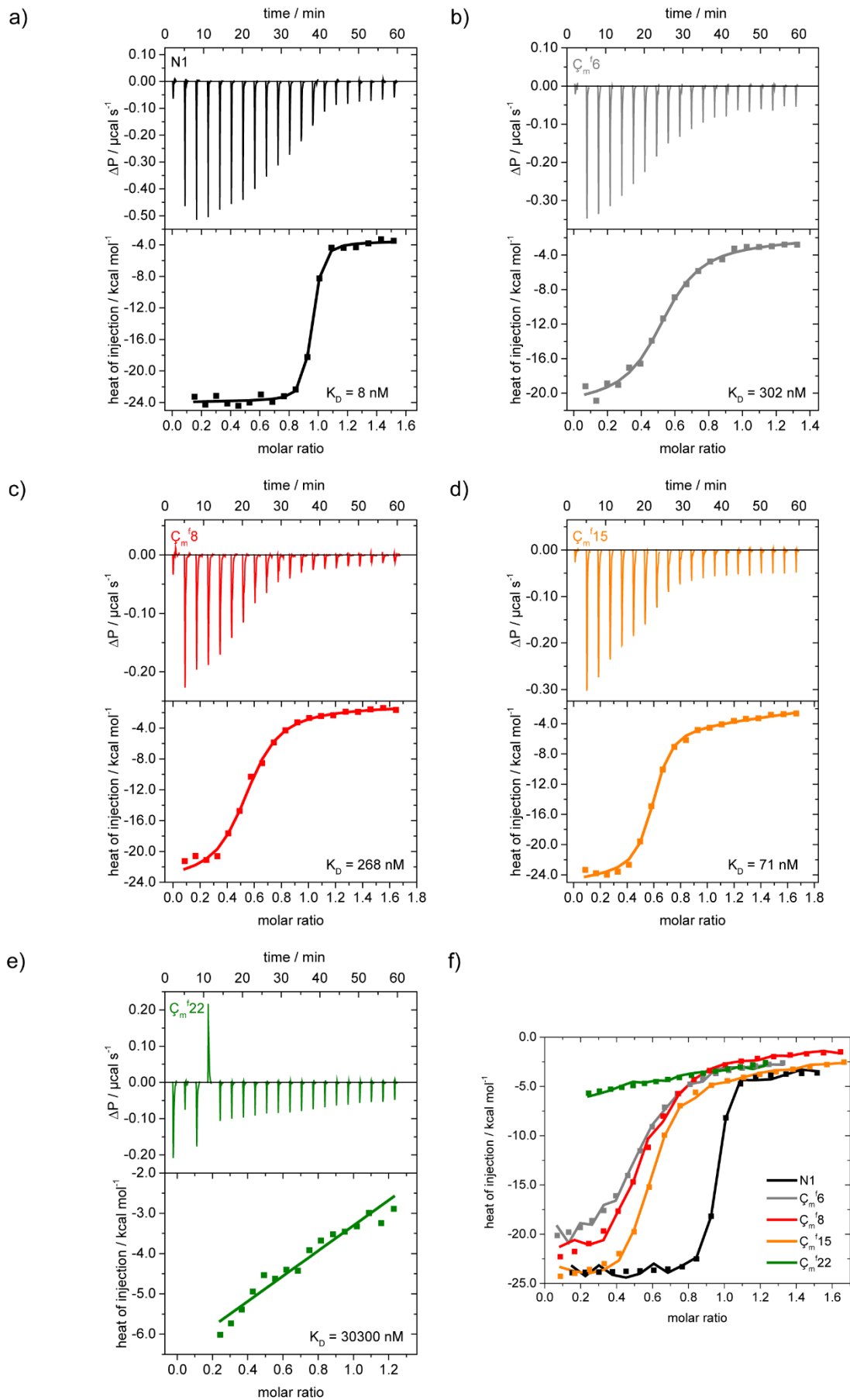


Abbildung 7.4. ITC-Messungen von a) N1, b) C_m^6 , c) C_m^8 , d) C_m^{15} , e) C_m^{22} und f) Vergleich der fünf Bindungsisotherme unter folgenden Pufferbedingungen: 20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Spermidin, pH 7,4.

Tabelle 7.16. Vergleich der Dissoziationskonstanten (K_D) der ζ_m^f -markierten N1-Aptamere sowie des unmarkierten N1-Aptamers bei verschiedenen Pufferbedingungen.

Probe	K_D / nM	
	Pufferbedingungen	
	20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, pH 7,4	20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Spermidin, pH 7,4
N1	6	8
ζ_m^f6	375	302
ζ_m^f8	318	268
ζ_m^f15	480	71
ζ_m^f22	11700	30300

Es wurde erwartet, dass sich durch Zusatz von MgCl₂ und Spermidin die Dissoziationskonstanten aller fünf Proben vergrößern, da sowohl Mg²⁺ als auch Spermidin unspezifisch an Nukleinsäuren binden und so mit Neomycin um die Bindung konkurrieren sollten.²¹⁵ Wie allerdings leicht anhand von Tabelle 7.16 zu erkennen ist, konnte dies hier nicht bestätigt werden. Im Fall von ζ_m^f6 , ζ_m^f8 und ζ_m^f15 ist die Bindungskonstante in Anwesenheit von Spermidin und Mg²⁺ kleiner als in deren Abwesenheit. Dies kann durch die schlechte Datenqualität erklärt werden, könnte aber auch auf eine leicht veränderte Konformation der Aptamere, in Abhängigkeit von den Pufferbedingungen, hindeuten. Dazu sind allerdings detailliertere Untersuchungen nötig.

7.1.3.2 Fluoreszenz-Stopped-Flow

Die Fluoreszenz-Stopped-Flow-Messungen wurden im sogenannten klassischen Modus (*classic mode*) durchgeführt. Dabei wurde die folgende Mischsequenz (Tabelle 7.17) verwendet:

Tabelle 7.17. Mischsequenz der Fluoreszenz-Stopped-Flow-Messungen.

Phase	1	2	3
Dauer / ms	1	10	9,5
Zugabe durch Spritze 1 / μ l	0	0	33
Zugabe durch Spritze 2 / μ l	0	0	33
Trigger	on	off	on

Wie schon oben beschrieben wurde, werden bei den Messungen insgesamt 8000 Punkte in drei Phasen digitalisiert. Im Ergebniskapitel der Arbeit sind nur die ersten 30 ms nach dem Ende des Mischprozesses gezeigt. In Abbildung 7.5 sind dagegen beispielhaft die kompletten gemittelten Rohdaten der Stopped-Flow-Messung von ζ_m^f8 aufgetragen. Hier sind die Signaländerungen während der Mischzeit zu erkennen. Außerdem ist zu sehen, dass nach 30 ms keine Signaländerungen mehr feststellbar sind.

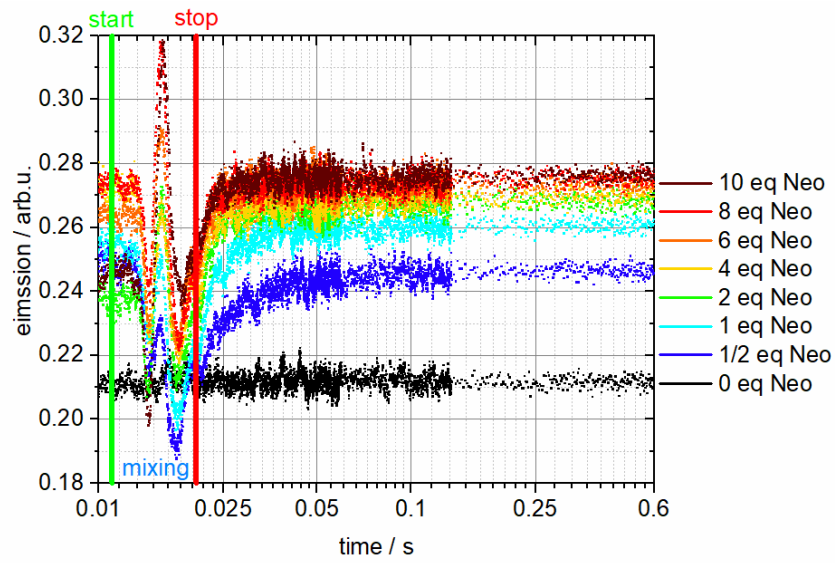


Abbildung 7.5. Gemittelte Rohdaten der ζ_m^f 8-Stopped-Flow-Messung. Hier ist der komplette aufgezeichnete Zeitbereich, inklusive Vorperiode und Mischzeit, dargestellt. Der Start- (start) und Endpunkt (stop) der Ligandenzugabe sind markiert.

7.1.3.3 Auswertung der ζ_m^f 6-Stopped-Flow-Messung - DynaFit4-Skript

[task]

```
data = progress
task = fit
model = onestep ?
```

[mechanism]

```
E + S <=> ES : k1 k-1
```

[constants]

```
k1 = 130 ?
k-1 = 3 ?
```

[responses]

```
E=0.094 ; fluorescence signal of labelled aptamer
S=0.000 ; fluorescence signal of ligand
ES=0.12 ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand
```

[concentrations]

[data]

```
directory ./Fit
extension txt
delay 0.0013 ; start of fit before time zero
offset = 0 ; signal offset
file eq0 | conc S = 0, E=1.33 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq05 | conc S = 1, E=1.33 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq1 | conc S = 2, E=1.33 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq4 | conc S = 8, E=1.33 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq6 | conc S = 12, E=1.33 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
```

[output]

```
directory ./Fit/Res
```

```
;------
```

[task]

```
data = progress
task = fit
model = twostep_no_back ?
```

[mechanism]

```
E + S ---> ES : k1
ES ---> ES* : kr
```

[constants]

```
k1 = 520.0 ?
kr = 178.0 ?
```

[responses]

E=0.094 ; fluorescence signal of labelled aptamer
S=0.000 ; fluorescence signal of ligand
ES=0.11 ? ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand
ES*=0.12 ? ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

;------

[task]

data = progress
task = fit
model = twostep ?

[mechanism]

$E + S \rightleftharpoons ES : k_1 k_{-1}$
 $ES \rightleftharpoons ES^* : k_r k_{r-1}$

[constants]

$k_1 = 675 ?$
 $k_{-1} = 109 ?$
 $k_r = 102 ?$
 $k_{r-1} = 35 ?$

[responses]

E=0.094 ; fluorescence signal of labelled aptamer
S=0.000 ; fluorescence signal of ligand
ES=0.11 ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand
ES*=0.125 ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

;------

[task]

data = progress
task = fit
model = michaelis ?

[mechanism]

$E + S \rightleftharpoons ES : k_1 k_{-1}$
 $ES \rightarrow ES^* : k_r$

[constants]

$k_1 = 682 ?$
 $k_{-1} = 180.0 ?$
 $k_r = 142.0 ?$

[responses]

E=0.094 ; fluorescence signal of labelled aptamer
S=0.000 ; fluorescence signal of ligand
ES=0.11 ? ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand
ES*=0.12 ? ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

[end]

7.1.3.4 Auswertung der C_m^f 8-Stopped-Flow-Messung - DynaFit4-Skript

[task]

data = progress
task = fit
model = onestep ?

[mechanism]

$E + S \rightleftharpoons ES$: k1 k-1

[constants]

k1 = 93.0 ?
k-1 = 5 ?

[responses]

E=0.1055 ; fluorescence signal of labelled aptamer
S=0.000 ; fluorescence signal of ligand
ES=0.1432 ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

[data]

directory ./Fit
extension txt
delay 0.0013 ; start of fit before time zero
offset = 0 ; signal offset
file eq0 | conc S = 0, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq05 | conc S = 1, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq1 | conc S = 2, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq2 | conc S = 4, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq4 | conc S = 8, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq6 | conc S = 12, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq8 | conc S = 16, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer
file eq10 | conc S = 20, E=2 ; S=concentration ligand, E=concentration labelled aptamer

[output]

directory ./Fit/Res

;------

[task]

data = progress

task = fit

model = twostep_no_back ?

[mechanism]

$E + S \rightarrow ES : k_1$

$ES \rightarrow ES^* : k_r$

[constants]

$k_1 = 235.0 ?$

$k_r = 505.0 ?$

[responses]

$E=0.1055$; fluorescence signal of labelled aptamer

$S=0.000$; fluorescence signal of ligand

$ES=0.10998 ?$; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

$ES^*=0.1432$; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

;------

[task]

data = progress

task = fit

model = twostep ?

[mechanism]

$E + S \rightleftharpoons ES : k_1 k_{-1}$

$ES \rightleftharpoons ES^* : k_r k_{r-1}$

[constants]

$k_1 = 208 ?$

$k_{-1} = 120 ?$

$k_r = 430 ?$

$k_{r-1} = 120 ?$

[responses]

$E=0.1055$; fluorescence signal of labelled aptamer

$S=0.000$; fluorescence signal of ligand

$ES=0.11216 ?$; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

$ES^*=0.1432$; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

;------

[task]

data = progress

task = fit

model = michaelis-menten ?

[mechanism]

$E + S \rightleftharpoons ES$: k_1 k_{-1}

$ES \rightarrow ES^*$: k_r

[constants]

$k_1 = 170$?

$k_{-1} = 0.0001$?

$k_r = 440$?

[responses]

$E=0.1055$; fluorescence signal of labelled aptamer

$S=0.0$; fluorescence signal of ligand

$ES=0.11$? ; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

$ES^*=0.1432$; fluorescence signal of labelled aptamer + ligand

[concentrations]

[end]

8 Indices

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
A	Absorbanz / Akzeptor / Aptamer
A, Ade	Adenin, Adenosin
A/D	Analog-zu-Digital
AIC	Akaike-Informationskriterium
AL	Aptamer-Ligand-Komplex
AL*	Aptamer-Ligand-Komplex, Zwischenzustand
AMP	Adenosinmonophosphat
AOM	akustooptische Modulator, <i>acousto-optic modulator</i>
ASW	adeninbindender Riboschalter, <i>adenine sensing riboswitch</i>
ATR	abgeschwächte Totalreflexion, <i>attenuated total reflection</i>
BBO	Beta-Barium-Borat-Kristall, β -BaB ₂ O ₄
BLQ	Blaulichlöschung, <i>blue light quenching</i>
BPR	blauabsorbierendes Proteorhodopsin, <i>blue proteorhodopsin</i>
BR	Bacteriorhodopsin
C	Cytosin
c	Konzentration
c.c.	komplex konjugiert, <i>complex conjugate</i>
ChR1, ChR2	Channelrhodopsin-1, Channelrhodopsin-2
CI	konische Zerschneidung, <i>conical intersection</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
CP	Cytoplasma
CPA	Verstärkung gechirpter Pulse, <i>chirped pulse amplification</i>
CT	Ladungstransfer, <i>charge transfer</i>
CW	kontinuierliche Strahlung, <i>continuous wave</i>
d	Schichtdicke
D	Donor, Dublett
D, Asp	Asparaginsäure
DAS	zerfallsassoziierte Spektren, <i>decay associated spectra</i>
DDM	n-Dodecyl β -D-Maltosid
DEPC	Diethylcarbonat
DLaTGS, DLTGS	deutertes L-Alanin-dotiertes Triglycinsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNP	dynamische Kernpolarisation, <i>dynamic nuclear polarization</i>

dPAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, <i>denaturing polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ds	Doppelstrang, <i>double strand</i>
DT	Dexter-Energietransfer
DTGS	deutertes Triglycinsulfat
E	Extinktion / Effizienz / Feldstärke
E, Glu	Glutaminsäure
EET	Energietransfer, <i>electronic energy transfer</i>
EIC	verstärkte interne Konversion, <i>enhanced internal conversion</i>
EISC	verstärktes Intersystem Crossing, <i>enhanced intersystem crossing</i>
em	Emission
EPR	Elektronenspinresonanz, <i>electron paramagnetic resonance</i>
eq	Äquivalente, <i>equivalent</i>
ESA	Absorption angeregter Zustände, <i>excited-state absorption</i>
ET	Elektronentransfer, <i>electron transfer</i>
ex	Anregung, <i>excitation</i>
EX	extrazellulärer Raum
f	Frequenz
FIR	fernes Infrarot, <i>far infrared</i>
FNRO	Fluorophor-Nitroxid-Verbindung
FQY	Fluoreszenzquantenausbeute, <i>fluorescence quantum yield</i>
FRET, FT	Förster-Resonanzenergietransfer (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
FWHM	Halbwertsbreite, <i>full width at half maximum</i>
G	Guanin, Gerätefaktor
GFP	grünfluoreszierendes Protein, <i>green fluorescence protein</i>
GLA	globale Lebenszeitanalyse, <i>global lifetime analysis</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GPR	grünabsorbierendes Proteorhodopsin, <i>green proteorhodopsin</i>
GPR _{E108Q}	grünabsorbierendes Proteorhodopsin E108Q Mutante, <i>green proteorhodopsin E108Q mutant</i>
GSB	Grundzustandsbleichen, <i>ground state bleach</i>
GSW	guaninbindender Riboschalter, <i>guanine sensing riboswitch</i>
GVD	Gruppengeschwindigkeitsdispersion, <i>group velocity dispersion</i>
h	Planck'sches Wirkungsquantum
hnRNA	heterogene Kern-RNA, <i>heterogeneous nuclear ribonucleic acid</i>
HOMO	höchst besetztes Molekülorbital, <i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
HX	Hypoxanthin
I	Intensität

Indices

IC	interne Umwandlung, <i>internal conversion</i>
IR	Infrarot
IRF	Instrumentenantwortfunktion, <i>instrument response function</i>
IS	Ulbricht Kugel, <i>integrating sphere</i>
ISC	Intersystem Crossing, <i>intersystem crossing</i>
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie, <i>isothermal titration calorimetry</i>
J	spektrales Überlappintegral
k	Boltzmannkonstante
k	Federkonstante
K, Lys	Lysin
Kd	Dissoziationskonstante
KF	Kleinflansch
kq	Quenchingrate
k _r	strahlende Rate
L	Ligand
L, Leu	Leucin
Laser	Licht-Verstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung, <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LE	lokal angeregter Zustand, <i>locally excited state</i>
LED	lichtemittierende Diode, <i>light-emitting diode</i>
LIN	flüssiger Stickstoff
LöMi	Lösungsmittel
LPR	Lipid-zu-Protein-Verhältnis, <i>lipid to protein ratio</i>
Lsg.	Lösung
LUMO	niedrigstes besetztes Molekülorbital, <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
m	Masse
m.a.	magischer Winkel, <i>magic angle</i>
MCT	Quecksilber Cadmium Telluride, <i>Mercury Cadmium Telluride, HgCdTe</i>
MIR	mittleres Infrarot, <i>mid-infrared</i>
miRNA	microRNA
mRNA	Boten-RNA, <i>Messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
N1	neomycinbindendes Aptamer
NaCacodylat	Natriumkakodylat
ND	Neutraldichtefilter
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NDB	Nukleinsäurendatenbank, <i>nucleic acid database</i>
Neo	Neomycin

NIR	nahes Infrarot, <i>near infrared</i>
NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	magnetische Kernspinresonanz, <i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte, <i>optical density</i>
ODE	Differentialgleichung erster Ordnung
OVC	äußere Vakuumkammer, <i>outer vacuum chamber</i>
p.a.	<i>pro analysi</i> , Reinheitsgrad
PC	fotoleitend, <i>photoconductive</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	Proteindatenbank, <i>protein data bank</i>
PELDOR	Gepulste Elektron-Elektron-Doppelresonanz, <i>pulsed electron electron double resonance</i>
PET	photoinduzierter Elektronentransfer, <i>photoinduced electron transfer</i>
PMT	Photoelektronenvervielfacher, <i>photomultiplier tube</i>
PR	Proteorhodopsin
PTFE	Polytetrafluorethylen
PV	Photovoltaik, <i>photovoltaic</i>
PVC	Polyvinylchlorid
Q	Quartett
Q, Gln	Glutamin
r	Abstand / Auslenkung / Anisotropie
Rio	Ribostamycin
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure, <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RSB	Schiff'sche-Base des Retinals, <i>retinal Schiff base</i>
RT	Raumtemperatur
S	Singulett
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis, <i>signal-to-noise ratio</i>
SC	Probenkammer
SE	stimulierte Emission, <i>stimulated emission</i>
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung, <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SErF	gestreckter Puls Erbium-dotierte Faser, <i>stretched-pulse Erbium-doped fiber</i>
SF-TDDFT	Spin-Dreh zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie, <i>spin-flip time-dependent density functional theory</i>
SHG	Frequenzverdopplung, <i>second harmonic generation</i>
shRNA	Haarnadel-RNA-Strukturen, <i>small hairpin RNA</i>
siRNA	kleine eingreifende RNA, <i>small interfering RNA</i>
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure, <i>small nuclear ribonucleic acid</i>
ss	Einzelstrang, <i>single strand</i>

Indices

T	Thymin / Transmission / Triplett
t	Zeit
TAS	transiente Absorptionsspektroskopie
tBDMS	tert-Butyldimethylsilylether
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, <i>time-correlated single photon counting</i>
TDDFT	zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie, <i>time-dependent density functional theory</i>
Ti:Sa	Titan-dotierter Saphir
T _{m_ab}	Schmelzpunkt, über Absorptionsspektroskopie
T _{m_em}	Schmelzpunkt, über Fluoreszenzspektroskopie
T _{m_sr}	Schmelzpunkt, über Fluoreszenzspektroskopie; Auswertung über spektrale Form
TMH	Transmembranhelices
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure, <i>transfer nuclear ribonucleic acid</i>
U	Uracil
Um	2'-O-Methyluridin
UMP	Uridinmonophosphat
UTR	untranslatierter Bereich, <i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett, <i>ultraviolet</i>
V	Volumen
vis	sichtbar, <i>visible</i>
VR	Schwingungsrelaxation, <i>vibrational relaxation</i>
WL	Weißlicht
WT	Wildtyp
XPM	Kreuzphasenmodulation, <i>cross-phase modulation</i>
ZFF	Zerofilling-Faktor

8.2 Abbildungsverzeichnis

2.1.	Struktur von ζ_m und ζ_m^f .	5
2.2.	Struktur und komplementäre Basenpaarung der Nucleobasen.	7
2.3.	NMR-Struktur des N1-Aptamers und Strukturformel von Neomycin B.	10
2.4.	Sekundärstrukturen des adenine- und des guaninbindenden Aptamers.	11
2.5.	GPR- und ChR2-Strukturmodell, jeweils mit Photozyklus.	14
2.6.	Jablonski-Diagramm.	18
2.7.	Försterresonanzenergietransfer.	22
2.8.	Förster- und Dexter-Mechanismus.	22
2.9.	Michelson-Interferometer mit einem Beispiel für die Interferenz zweier Wellen.	29
2.10.	ATR-Zelle.	31
2.11.	Chirped Pulse Amplification.	37
2.12.	Vergleich der Bindungsmechanismen.	41
3.1.	Stickstoff- und Trockenluftversorgung des FTIR-Spektrometers.	43
3.2.	FTIR-Spektrometer.	44
3.3.	Absorptionsschmelzkurven von unmarkierten RNA-Doppelsträngen.	48
3.4.	Tieftemperaturabsorptionsspektrometer.	51
3.5.	Transienter Absorptionsspektroskopieaufbau (TAS).	53
3.6.	TCSPC-Aufbau.	56
3.7.	Phosphoreszenzspektrometer.	58
3.8.	Fluoreszenz-Stopped-Flow-Messaufbau.	60
4.1.	Strukturformeln mit Nummerierungen der Nucleosidmonophosphate (NMPs).	68
4.2.	FTIR-Spektren der vier NMPs.	69
4.3.	FTIR-Spektren der RNA-Modellsequenzen ds_5A-5U und ds_5G-5C.	70
4.4.	FTIR-Spektren der RNA-Modellsequenzen ss_8A-2C und ss_8A-2G.	71
4.5.	FTIR-Spektren der RNA-Modellsequenzen ss_8U-2C und ss_8U-2G.	72
4.6.	FTIR-Spektrum der RNA-Modellsequenz ss_6A-2U-2G-8U.	72
4.7.	FTIR-Differenzspektren verschiedener Kombinationen aus Ligand und Aptamer.	74
4.8.	Absolutspektren und Differenzspektren von (isotopenmarkierten) Liganden.	75
4.9.	Isotopendifferenzspektren verschiedener Kombinationen aus Ligand und Aptamer.	76
4.10.	Struktur von ζ_m und ζ_m^f .	79
4.11.	Absorptions-, Fluoreszenz- sowie Phosphoreszenzspektren von ζ_m und ζ_m^f .	80
4.12.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m und ζ_m^f .	80
4.13.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m (versch. Detektionswellenlängen).	81

4.14	Absorption der Bandpassfilter und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m^f .	81
4.15.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m^f und ζ_m in versch. aprotischen LöMi.	82
4.16.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von ζ_m^f und ζ_m in H ₂ O u. D ₂ O bei pH 7,4.	83
4.17.	pH-Abhängigkeit der Absorption, der Emission sowie des Fluoreszenzzerfalls von ζ_m .	84
4.18.	Transientenkarten der Phosphoreszenzmessungen von ζ_m^f und ζ_m bei 77 K.	84
4.19.	Zeitaufgelöste Phosphoreszenzmessungen von ζ_m und ζ_m^f bei 77 K.	85
4.20.	Transiente Absorptionsmessungen von ζ_m^f und ζ_m .	85
4.21.	Zeitschnitte der transienten Absorptionsmessung von ζ_m^f und ζ_m .	86
4.22.	Transienten der transienten Absorptionsmessung von ζ_m^f und ζ_m .	86
4.23.	Vergleich der Zeitschnitte von ζ_m^f und ζ_m bei 1,5 ns.	87
4.24.	Photodynamik von ζ_m^f und ζ_m .	90
4.25.	Emissionsspektren von ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelsträngen bei 20 °C.	94
4.26.	Fluoreszenzschmelzkurven der ζ_m^f -markierten Einzel- und Doppelstränge.	96
4.27.	Temperaturabhängigkeit d. Fluoreszenzspektrums d. ζ_m^f -markierten Doppelstränge.	96
4.28.	Spektralaufgelöste Schmelzanalyse.	97
4.29.	Fluoreszenzzerfälle d. ζ_m^f -markierten ss und ds mit ζ_m^f in Lösung.	98
4.30.	Fluoreszenzzerfälle der ζ_m^f -markierten ss und ds.	98
4.31.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer der ζ_m^f -markierten ss.	100
4.32.	Temperaturabhängigkeit der τ_{av} der ζ_m^f -markierten ss und ds.	101
4.33.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer der ζ_m^f -markierten ds.	101
4.34.	Vergleich der Fluoreszenzanisotropiezerfälle der ζ_m^f -markierten ss und ds.	102
4.35.	Fluoreszenzanisotropiezerfälle der ζ_m^f -markierten ss und ds.	103
4.36.	Transientenkarte der Probe ds_A ζ_m^f A.	104
4.37.	Transienten der Transientenabsorptionsmessungen der ζ_m^f -markierten ds.	104
4.38.	ζ_m^f -markierte Positionen innerhalb des neomycinbindenden Aptamers.	106
4.39.	Emissionsspektren der vier ζ_m^f -markierten N1-Proben.	107
4.40.	Vergleich der Emissionsspektren der Proben ss_CC ζ_m^f C, ds_CC ζ_m^f C und ζ_m^f 22.	108
4.41.	Fluoreszenzschmelzkurven der ζ_m^f -markierten N1-Aptamere.	110
4.42.	Fluoreszenzzerfälle der verschiedenen ζ_m^f -markierten N1-Aptamere.	110
4.43.	Fluoreszenzanisotropiezerfälle der vier ζ_m^f -markierten N1-Aptamere.	111
4.44.	Fluoreszenz-Stopped-Flow-Experimente von ζ_m^f 6 und ζ_m^f 8.	112
4.45.	Fluoreszenz-Stopped-Flow-Experimente von ζ_m^f 6 inkl. Modellanpassungen.	113
4.46.	Fluoreszenz-Stopped-Flow-Experimente von ζ_m^f 8 inkl. Modellanpassungen.	114
4.47.	Cartoon des vorgeschlagenen Bindungsmechanismus.	115
4.48.	Vergleich der verschiedenen Einfriermethoden.	118

4.49.	Absolut- und Differenzspektren von GPR.	120
4.50.	Absolut- und Differenzspektren von GPR mit und ohne Glättung.	121
4.51.	Sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment von GPR.	122
4.52.	Kontinuierliches Temperaturverlaufsexperiment von GPR.	122
4.53.	Vergleich der Dunkelspektren von GPR bei 77 K und bei 290 K.	123
4.54.	Zeitverlaufsexperiment bei 250 K von GPR.	124
4.55.	Zeitverlaufsexperiment bei 250 K von GPR.	124
4.56.	Zeitverlaufsexperiment bei 77 K von GPR _{E108Q} .	126
4.57.	Sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment von GPR _{E108Q} .	127
4.58.	Kontinuierliches Temperaturverlaufsexperiment von GPR _{E108Q} .	128
4.59.	Zeitverlaufsexperiment bei 250 K von GPR _{E108Q} .	128
4.60.	GPR _{E108Q} nach BLQ.	129
4.61.	Sequenzielles Temperaturverlaufsexperiment von ChR2.	131
4.62.	Belichtungsprotokolle und entsprechende Differenzspektren von ChR2.	133
5.1.	FRET-Partner: ζ_m^f und $t_{C_{nitro}}$, Labelpositionen im N1-Aptamer.	137
8.1.	Vergleich der verschiedenen Fluoreszenzlebensdaueranalysen von ζ_m^f .	150
8.2.	Korrigierte zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von ζ_m und ζ_m^f in versch. LöMi.	151
8.3.	ITC. Puffer: 20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl.	159
8.4.	ITC. Puffer: 20 mM NaCacodylat, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Spermidin.	160
8.5.	Gemittelte Rohdaten der ζ_m^f -Stopped-Flow-Messung.	162

8.3 Tabellenverzeichnis

2.1.	Typische Zeitskalen strahlender und nichtstrahlender photophysikalischer Prozesse.	18
2.2.	Schematische Reaktionsgleichungen und Reaktionsordnungen.	39
3.1.	Ausgewählte Parameter des FTIR-Spektrometers mit Standardwerten.	46
3.2.	Polarisator- und Analysatorpositionen für Fluoreszenzanisotropiemessungen.	50
3.3.	Probenzusammensetzung für die FTIR-Bindungsstudien der purinbindenden Aptamere.	65
4.1.	Spektrale Position, Signalintensität u. Schwingungszuordnung markanter IR-Banden d. NMPs.	69
4.2.	Probennamen und Sequenzen der RNA-Modellstränge für die FTIR-Studie.	70
4.3.	Absorptionsmaximum/-minimum des $^{13}\text{C } ^{15}\text{N}$ Ade bzw. des Ade-Referenzsignals.	75
4.4.	Absorptionsmaximum/-minimum des $^{13}\text{C } ^{15}\text{N}$ HX bzw. des HX-Referenzsignals.	76
4.5.	Fluoreszenzlebensdauern u. Fluoreszenzquantenausbeuten von ζ_m und ζ_m^f in untersch. LöMi.	83
4.6.	Quantenmechanische Rechnungen von ζ_m^f und ζ_m .	87
4.7.	Dichtedifferenzen der niedrigsten angeregten Zustände von ζ_m^f und ζ_m .	88
4.8.	Fluoreszenzquantenausbeuten u. Fluoreszenzanisotropie d. ζ_m^f -markierten ss u. ds bei 20 °C.	94
4.9.	Schmelztemperaturen der unmarkierten und markierten Modellsequenzen.	95
4.10.	Thermodynamische Parameter der unmarkierten und markierten Modellsequenzen.	95
4.11.	Fluoreszenzlebensdauern der ζ_m^f -markierten ss und ds bei 20 °C.	99
4.12.	Rotationskorrelationszeiten der ζ_m^f -markierten ss und ds bei 20 °C.	103
4.13.	Sequenzen der ζ_m^f -markierten N1-Aptamere.	107
4.14.	Eigenschaften der verschiedenen ζ_m^f -markierten und unmarkierten N1-Aptamerproben.	108
4.15.	Fluoreszenzlebensdauern der ζ_m^f -markierten N1-Aptamere.	111
4.16.	Reaktionsgleichungen der getesteten Bindungsmodelle.	113
4.17.	Anpassung der versch. Bindungsmodelle an die ζ_m^f 6-Stopped-Flow-Transienten.	114
4.18.	Anpassung der versch. Bindungsmodelle an die ζ_m^f 8-Stopped-Flow-Transienten.	115
8.1.	Vergleich der versch. Fluoreszenzlebensdaueranalysen von ζ_m^f .	150
8.2.	Fluoreszenzlebenszeiten von ζ_m in versch. LöMi, nach skaliertem Subtraktion d. ζ_m^f -Zerfalls.	151
8.3.	Sequenzen und Zusammensetzung der versch. ζ_m^f -markierten RNA-Modellsysteme.	152
8.4.	Absolute Quantenausbeuten der ζ_m^f -markierten, ss und ds RNA-Modellsequenzen.	153
8.5.	Statische Fluoreszenzanisotropie der ζ_m^f -markierten, ss und ds RNA-Modellsequenzen.	153
8.6.	Schmelztemperaturen ζ_m^f -markierten ds RNA-Modellsequenzen.	153
8.7.	Mittlere Fluoreszenzlebensdauern der ζ_m^f -markierten, ss und ds RNA-Modellsequenzen.	155
8.8.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_ $\text{A}\zeta_m^f\text{A}$.	155
8.9.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ss_ $\text{A}\zeta_m^f\text{A}$.	156
8.10.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_ $\text{C}\zeta_m^f\text{C}$.	156

8.11.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ss_C ζ_m^f C.	156
8.12.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_G ζ_m^f G.	157
8.13.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ss_G ζ_m^f G.	157
8.14.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ds_U ζ_m^f U.	157
8.15.	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von ss_U ζ_m^f U.	158
8.16.	Dissoziationskonstanten der ζ_m^f -markierten und unmarkierten N1-Aptamere.	161
8.17.	Mischsequenz der Fluoreszenz-Stopped-Flow-Messungen.	161

9 Wissenschaftliche Beiträge

9.1 Eigene Publikationen in Zusammenhang mit dieser Arbeit

- Gustmann, H., Segler, A.J., Gophane, D.B., Reuss, A.J., Grünewald, C., Braun, M., Weigand, J.E., Sigurdsson, S.Th. and Wachtveitl, J. (2018), *Structure guided fluorescence labeling reveals a two-step binding mechanism of neomycin to its RNA aptamer*, **NAR**, under revision
- Gustmann, H., Lefrancois, D., Reuss, A.J., Gophane, D.B., Braun, M., Dreuw, A., Sigurdsson, S.Th. and Wachtveitl, J. (2017), *Spin the light off: rapid internal conversion into a dark doublet state quenches the fluorescence of an RNA spin label*, **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 19, 26255
- Becker-Baldus, J., Bamann, C., Saxena, K., Gustmann, H., Brown, L. J., Brown, R. C. D., Reiter, C., Bamberg, E., Wachtveitl, J., Schwalbe, H. and Glaubitz, C. (2015), *Enlightening the photoactive site of channelrhodopsin-2 by DNP-enhanced MAS NMR*, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 112, 9896

9.2 Andere eigene Publikationen

- Schmidt, A., Altincekic, N., Gustmann, H., Wachtveitl, J. and Hengesbach, M. (2018), *Protein microenvironment governs the suitability of labeling sites for single molecule spectroscopy of RNP complexes*, **ACS Chem. Biol.**, 13, 2472
- van Wilderen, L.J.G.W., Brunst, H., Gustmann, H., Wachtveitl, J., Broos J. and Bredenbeck, J. (2018), *Cyano-tryptophanes as dual infrared and fluorescence labels to assess structural dynamics in proteins*, **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 20, 19906
- Reuss, A.J., Grünewald, C., Gustmann, H., Engels, J.W. and Wachtveitl, J. (2017), *Three-State Fluorescence of a 2-Functionalized Pyrene-Based RNA-Label*, **J. Phys. Chem. B**, 121, 3032
- Schweighöfer, F., Dworak, L., Hammer, C., Gustmann, H., Zastrow, M., Rück-Braun, K. and Wachtveitl, J. (2016), *Highly efficient modulation of FRET in an orthogonally arranged BODIPY-DTE dyad*, **Sci. Rep.**, 6, 28638

9.3 Wissenschaftliche Vorträge und Präsentationen

Veranstaltung	Ort	Titel
Institutsseminar, 2014	Hirschegg, Österreich	Steady-state and time-resolved IR-spectroscopy of RNA samples
Gruppenseminar, SS 2014	Frankfurt am Main	First measurements on the fluorescence label C_m^f
Gruppenseminar, WS 2014/15	Frankfurt am Main	Bifunctional fluorescent spin-label (C -Spin)
SFB902 Winterschule, 2015	Obergurgl, Österreich	First time-resolved measurements on C -Spin
Gruppenseminar, SS 2015	Frankfurt am Main	FTIR on purine-sensing riboswitches
Mentorentreffen, 2015	Frankfurt am Main	1. Mentorentreffen
Gruppenseminar, WS 2015/16	Frankfurt am Main	Test of C_m^f properties with the help of a RNA benchmark sequence
Gruppenseminar, SS 2016	Frankfurt am Main	The C_m^f -project and the new phosphorescence setup
Mentorentreffen, 2016	Frankfurt am Main	2. Mentorentreffen
Gruppenseminar, WS 2016/17	Frankfurt am Main	Absolute measurements of fluorescence quantum yields with an integrating sphere
SFB902 Symposium, RNA Structural Biology, 2016	Bad Homburg	A multistep quenching mechanism yields a fluorescent RNA-label in disguise
Gruppenseminar, SS 2017	Frankfurt am Main	Time-resolved fluorescence anisotropy measurements
Mentorentreffen, 2017	Frankfurt am Main	3. Mentorentreffen
SFB902 Symposium, RNA Biology, 2017	Friedrichsdorf	Ligand binding dynamics of the neomycin aptamer monitored by a fluorescent cytidine analogue RNA-label
Gruppenseminar, WS 2017/18	Frankfurt am Main	Ligand binding dynamics of the neomycin aptamer monitored by a fluorescent cytidine analogue RNA-label
SFB902 Winterschule, 2018	Altglashütten	RNA dynamics monitored by a fluorescent cytidine analogue RNA-label
Institutsseminar, 2018	Hirschegg, Österreich	RNA dynamics monitored by a fluorescent cytidine analogue RNA-label

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Henrik Gustmann, erkläre an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich diese, hier vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

„Zeitaufgelöste Charakterisierung struktureller Änderungen von spezifisch modifizierter RNA“

selbstständig angefertigt und mich nicht anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen bedient habe. Insbesondere versichere ich, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Außerdem versichere ich, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ort, Datum

Unterschrift
